

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Agronomia

**SOLUÇÕES SALINAS E BAP NO CULTIVO *IN VITRO* DE
GABIROBEIRA**

Vitor Meirelles Roxo

Montes Claros - MG
2017

Vitor Meirelles Roxo

**SOLUÇÕES SALINAS E BAP NO CULTIVO *IN VITRO* DE
GABIROBEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do curso de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudineia Ferreira Nunes

Montes Claros

Instituto de Ciências Agrárias - UFMG

2017

Vitor Meirelles Roxo. **SOLUÇÕES SALINAS E BAP NO CULTIVO *IN VITRO***
DE GABIROBEIRA

Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Claudineia Ferreira Nunes

Prof.^a Claudineia Ferreira Nunes – Orientadora ICA/UFMG

Elka Fabiana Aparecida Almeida

Prof.^a Elka Fabiana Aparecida Almeida – ICA/UFMG

Laura Souza Santos

Laura Souza Santos – Mestranda ICA/UFMG

Montes Claros, 29 de junho de 2017.

Dedico aos meus pais, irmãs e avós pela sabedoria, carinho e amor que me passaram. Aos meus irmãos da República TULIPA'S que deram forças e motivações para concluir diversas tarefas, e aos meus amigos e colegas que me acompanharam nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha mãe Irene pelos conselhos, carinho, amor e dedicação a mim prestados, sempre buscando o melhor para todos seus filhos, educando-os da melhor maneira possível e zelando por todos. Ao meu pai Carlos, que sempre procurou me mostrar a importância da origem das equações matemáticas e suas fórmulas, desmembrando-as e obtendo a resposta, e conseqüentemente acabou me ensinando a procurar sempre nossas raízes, a base de nossas dúvidas, para que assim possamos chegar a uma conclusão.

Às minhas irmãs Carla e Letícia, que sempre (sempre mesmo) estiveram me ensinando feito mães, me protegendo e acolhendo, passando seus ensinamentos, falando sobre suas experiências, e procurando mostrar caminhos melhores a seguir. Ensinavam-me como mães, mas sem parecerem mães, aí se concentra toda a mágica. Muito embora a distância atrapalhe presença física, estamos sempre ligados uns aos outros por um sentimento maior. Vocês me fizeram amadurecer antes do tempo, encurtando alguns anos que estavam à frente, possibilitando que eu enxergasse a vida mais clara, ampliando minha visão para diversas formas de pensar sobre os valores da vida.

À minha Tia Sônia, que é também como uma segunda mãe, que com seu carinho e sua paz espiritual, me educou e fez de mim um ser de mais espiritualidade. Simples viagens se transformaram em experiências que jamais serão esquecidas. Aos meus avós, Milza e Clodoveu, pela sabedoria que me passaram, de uma forma delicada e muito carinhosa. Vó Milza, sei que em qualquer plano dimensional que você estiver, estará iluminando e orando por nós.

Ao meu padrinho Sérgio, que desde pequeno me ensinou a ouvir os sons que a vida emite. Na minha infância, lembro-me das sonoridades que você fazia e como aqueles gestos despertavam o meu interesse por aqueles sons, que entravam em meus ouvidos e torvam-se ritmos. Sua paixão pela música e sua preocupação com a equalização do som, foram absorvidos por mim e hoje sou um amante das sonoridades que a música proporciona. Sem ela a vida não caminha, a felicidade se ofusca, pois a música dá significado os momentos bons e ruins.

Aos meus irmãos que criei indo morar na República TULIPA'S, os quais sempre foram companheiros, e me proporcionaram muita felicidade: não irei esquecer jamais o que

essa casa me proporcionou, as histórias, os aprendizados, o amadurecimento, e a Lia nossa mãezona que sempre esteve com a gente.

Ao meu amigo irmão Henrique Marinzek Teixeira, com quem compartilhei e escutei novas ideias - boas ou ruins - eram faladas e contribuíram com novas maneiras de ver o mundo. É aquele amigo internacional, que não cansa de viajar, e com seu jeito tranquilo, me ensinou ver a vida com mais tranquilidade. Ao meu outro amigo Roberto Pilade Gambassi Junior, que foi companheiro de várias histórias e conseguiu me arrancar boas risadas, demonstrando a importância da amizade. À Parthenis dos Santos Batista, que sempre me influenciou na quebra de pensamentos ruins e com seu companheirismo me proporcionou momentos marcantes que serão levados durante a vida.

À Juliana Magalhães, por ter esbarrado aquela ponta do pé no meu e conseguiu se tornar a pessoa com quem eu mais falaria por horas seguidas sem jamais me cansar. Ajudou-me nas dificuldades para desenvolver este trabalho e de tantas outras maneiras, suportando o meu estresse nos momentos fatigantes. Ensinou-me a ver o mundo com mais simplicidade e a pensar mais no próximo, e com a sua 'cabeça erudita' me ajudou a elucidar minhas ações e emoções.

À minha orientadora Claudineia Ferreira Nunes, pela paciência e toda a calma dedicadas na condução do meu trabalho. Por sua amizade, responsabilidade e por transmitir seus conhecimentos com toda a maestria.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela oportunidade de estudo concedida e pela contribuição para a minha formação.

Ao norte de Minas Gerais, em especial a cidade de Montes Claros, onde vivenciei uma cultura que me permitiu valorizar a humildade e as realidades distintas da sociedade. Guardarei as lembranças que tive nesse norte mineiro e seus aprendizados para os anos que ainda serão vividos.

RESUMO

A gabioba (*Campomanesia pubescens* O. Berg) é uma espécie nativa do bioma Cerrado e seus frutos são apreciados in natura, na forma de doces, licores e vinhos. Suas folhas e cascas possuem propriedades medicinais e são usadas na medicina popular. A espécie se reproduz via semente ou estaquia, caracterizando o método convencional. Estudos recentes têm focado na propagação *in vitro* da espécie, porém, por ser nativa e lenhosa, sua propagação *in vitro* apresenta algumas limitações, ou seja, recalcitrância às condições *in vitro*. Diante disso o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP e das formulações salinas do meio de cultura MS no cultivo *in vitro* de gabirobeira por meio de segmentos nodais. Aplicou-se o delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 5 x 2, sendo cinco concentrações BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e duas concentrações (50% e 100%) das formulações salinas do meio de cultivo MS, constituído de oito repetições e um explante por tubo de ensaio. Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, distribuídos nos diferentes tratamentos. Passados 30 dias foram avaliadas as seguintes características: presença de brotos, contaminação, presença de raiz e oxidação. Aos 60 dias avaliou-se: presença de brotos, presença de folhas, número de folhas e comprimento do broto (cm). Concentrações entre 2 e 3 mg.L⁻¹ de BAP com meio de cultura MS 50% teve maior significância para as variáveis avaliadas, com destaque para indução de brotações. Concentrações mais elevadas de BAP, próximas de 4 mg.L⁻¹ não foram satisfatórias. Diante dos resultados pode-se inferir que para o cultivo da espécie *C. pubescens* O. Berg por meio de segmentos nodais é recomendada a utilização de meio de cultura MS com 50% das formulações salinas, suplementado de concentrações de BAP até 3mg.L⁻¹ para a obtenção de brotações com bom crescimento e desenvolvimento.

Palavras-chave: *Campomanesia pubescens* O. Berg, fitorreguladores, meio de cultura, indução de brotação, micropropagação

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Planta de gabirobeira destacando folhas (A), flores (B) e frutos (C)..... 13
- Figura 2 – Propágulo de gabirobeira de cultivo *in vitro* (A) e segmento nodal constituindo os explantes (B)..... 17
- Gráfico 1 – Porcentagem de brotações na primeira avaliação em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS..... 20
- Gráfico 2 – Porcentagem de brotações na segunda avaliação em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS..... 20
- Gráfico 3 – Porcentagem de folhas na segunda avaliação em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS..... 22
- Gráfico 4 – Números de folhas em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS..... 24
- Gráfico 5 - Comprimento do broto em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS..... 24

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos aplicados no experimento 18

Tabela 2 – Tabela do meio de cultura Murashige e Skooge (1962) constando a formulação salina original dos respectivos sais minerais 18

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA – Ácido indolacético

AIB – Ácido indolbutírico

ANA - Ácido naftalenoacético

BAP - 6 – benzilaminopurina

BOD - Biochemical Oxigen Demand

GA - Ácido giberélico

MS – Murashige e Skoog

TDZ - Tiazuron

WPM - Wood Plant Medium

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Cerrado	12
2.2 Aspectos gerais da gabirobeira	12
2.3 Propagação	13
2.4 Cultura de tecidos	13
2.4 Micropropagação	14
2.5 Meios de cultura	15
2.5.1 Reguladores de crescimento	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local	17
3.2 Material vegetal e preparação	17
3.3 Tratamento	17
3.3.1 Indução de brotações	19
3.4 Avaliações	19
3.5 Análise estatística	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Presença de brotos	19
4.2 Presença de folhas	21
4.3 Contaminação	22
4.4 Oxidação	23
4.5 Números de folhas	23
4.6 Comprimento dos brotos	24
4.7 Presença de raiz	25
5 CONCLUSÃO	26
6 REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado representa cerca de 21% do território nacional, sendo o segundo maior bioma brasileiro. É contemplado com uma rica biodiversidade, o que atrai mais atenção e preocupação quanto a sua conservação, pois segundo as estatísticas, 55% do Cerrado já se encontra desmatado (KLINK; MACHADO, 2005; MACHADO *et al.*, 2004). Segundo Ratter *et al.* (2003), 914 espécies de árvores e arbustos foram identificadas e registradas no bioma Cerrado, dentre essas espécie encontra-se a gabirobeira.

A gabiroba (*Campomanesia pubescens* O. Berg) é uma espécie da família Myrtaceae, seus frutos são normalmente consumidos in natura e também utilizados na fabricação de doces, vinhos e licores (VIEIRA *et al.*, 2006). Essa planta apresenta propriedades medicinais tanto em seus frutos como em suas folhas (PINHEIRO, 2006). Portanto, pesquisas relacionadas à sua propagação são de extrema relevância.

A espécie se reproduz via semente ou estaquia (FACHINELLO *et al.*, 1995), caracterizando o método convencional. Estudos recentes têm focado na propagação *in vitro* da espécie, porém, por ser nativa e lenhosa, sua propagação neste sistema apresenta algumas limitações, ou seja, recalcitrância a essas condições. A espécie apresenta certa resistência aos estímulos oferecidos, resultando em oxidação e conseqüente morte dos materiais *in vitro*.

O cultivo *in vitro* consiste basicamente na inoculação do explante (semente, órgão ou fragmento da planta usada para reprodução) em um meio asséptico contendo diferentes concentrações de sais (macro e micronutrientes), sacarose, agentes gelificantes, reguladores de crescimentos e condições ambientais controladas para o cultivo *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

São poucos os resultados efetivos obtidos com a multiplicação contínua da gabirobeira. Assim, o uso da micropropagação na produção de mudas de gabirobeira ainda não se justifica técnica e economicamente, sendo por enquanto, realizada somente a nível de pesquisa, visando a obtenção de protocolo de estabelecimento e multiplicação de materiais propagativos da espécie. Embora a micropropagação tem se mostrado economicamente viável para algumas espécies lenhosas como o café, eucalipto e teca, para a gabirobeira, pode se dizer que a micropropagação é tecnicamente viável para a clonagem de materiais, em escala reduzida.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP e das formulações salinas do meio de cultura MS no cultivo *in vitro* de gabirobeira por meio de segmentos nodais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cerrado

O Brasil apresenta a maior diversidade do planeta, distribuída em diferentes biomas: Amazônia, Caatinga, Pampa, Pantanal, Mata Atlântica e o bioma Cerrado, o qual exibe uma vasta biodiversidade vegetal, em uma área de aproximadamente 2.000.000 km², considerado o segundo maior bioma brasileiro em área, perdendo apenas para a Amazônia (BORLAUG, 2002). Seus recursos naturais vêm sofrendo grandes impactos devido à expansão agrícola, desmatamento e exploração predatória (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Em sua grande extensão territorial, observam-se diferentes constituições vegetais, florestais, sâvanicas lenhosas e campestres. Várias espécies compõem o cenário do cerrado e são aproveitadas para fins alimentares, medicinais, madeireiros, tintoriais, ornamentais e outros (ALMEIDA, 1998; AQUINO; OLIVEIRA, 2006). O potencial mais explorado é o seu aproveitamento alimentar, podendo ressaltar algumas espécies frutíferas, por exemplos: baru (*Dypterix alata* Vog.), pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), buriti (*Mauritia vinifera* Mart.), jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.), com destaque maior para a gabirobeira (*Campomanesia pubescens* O. Berg), objeto de estudo do presente trabalho.

2.2 Aspectos gerais da gabirobeira

A espécie *Campomanesia pubescens* O. Berg é nativa do Cerrado pertencente à família das Myrtaceas. Ela é comumente conhecida como gabirobeira, gabiropa e guabiropado-campo, conforme a região que é identificada (SOUZA; LORENZZI, 2008). A ocorrência dessa abrange os estados de São Paulo, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Santa Catarina e Minas Gerais (LEGRAND; KLEIN, 1977).

De acordo com Ferreira (1972), o gênero *Campomanesia* são subarbustos ou arbustos com estatura de 0,3 a 2 metros e apresenta ramos amarelados. Segundo classificação de Ferreira (1972), a gabirobeira apresenta folhas opostas, simples, inteiras com pontuações translúcidas, ápice agudo, base obtusa, membranáceas, levemente avermelhadas quando jovens, coriáceas oblongas com a face ventral pruinosa e dorsal amarelada quando adulta (FIGURA 1A). Suas flores são axilares isoladas, pedicelos glabros, de coloração branca, pentâmeras, dialipétalas, sépalas triangulares, agudas, ciliadas, pétalas ovais, conchiformes, androceu com muitos estames, anteras pequenas, rimosas, apresenta ovário ínfero, placentação axial, estigma captado (FIGURA 1B). Seu fruto é globoso, bacáceo com diâmetro

de 2,0 a 2,5 cm com 6 lóculos. Apresenta polpa amarelada quando madura. Sementes pequenas, discóides, reniformes e pardas (FIGURA 1C).

Figura 1 – Planta de gabirobeira destacando folhas (A), flores (B) e frutos (C)



Fonte: Do autor, 2017 (A e B); Ricardo Cardim, 2016

Seus frutos são consumidos principalmente na forma in natura, entretanto são utilizados também na confecção de licores, doces, sucos e cachaças. Além do consumo dos frutos, folhas e cascas são extraídas para o uso da medicina popular, ajudando em doenças do trato urinário e diarreia (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

2.3 Propagação

A propagação da gabiroba pode ser realizada de forma sexuada ou assexuada. Para Dias *et al.* (2012) e Hartmann *et al.* (2002) a propagação sexuada refere-se à multiplicação via semente, na qual ocorre uma maior variação genética, sendo importante para variabilidade das espécies. Porém, em questão comercial isso não é desejado, pelo fato de obter plantas desuniformes. Nesse caso, é mais utilizada para programas de melhoramento genéticos e para espécies que só proliferam desta maneira. A reprodução assexuada ou vegetativa reporta-se na multiplicação por partes da planta (estaca, bulbos, rizomas, etc), que são capazes de regenerar e produzir uma planta nova, idêntica à planta mãe, garantindo uniformidade nas populações, onde se destaca para o uso comercial.

Uma ferramenta muito utilizada para propagar espécies que apresentam alguma limitação na propagação convencional ou para propagar um elevado número de mudas homogêneas, em um pequeno espaço e menor tempo, é a cultura de tecidos de plantas.

2.4 Cultura de tecidos vegetais

Considerada como uma ferramenta de grande importância, a cultura de tecidos de plantas trata-se do cultivo de um explante (célula, tecido ou órgão) em um meio nutritivo artificial, em ambiente com condições assépticas, com temperatura e fotoperíodo controlado (CARVALHO *et al.*, 2011).

A cultura de tecidos de plantas tem como princípio fundamental a “totipotencialidade” das células, característica indispensável para que ocorra a regeneração de uma planta. Essa regeneração é fundamentada na capacidade das células vegetais se dividirem e organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas (KERBAUY, 1997; MANTELL *et al.*, 1994).

De acordo com Pinhal *et al.* (2011), a reprodução de espécies nativas via semente é dificultada pela heterogeneidade na maturação dos frutos, além de apresentar tipos diferentes de dormência, somando o fator de muitas destas sementes serem recalcitrantes. Por essa razão, explica-se a importância da cultura de tecidos em frutíferas do Cerrado. Vê-se a relevância nos seguintes exemplos: pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) (SANTOS *et al.*, 2006); cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile* St. Hill) (LONDE *et al.*, 2007) e mangabeira (*Hancornia speciosa*) (MACHADO *et al.*, 2004).

Diferentes técnicas compõem a área da cultura de tecidos de plantas, como por exemplo, a organogênese, com a formação de órgãos vegetais adventícios; a embriogênese somática, dando origem a embriões somáticos; o resgate de embriões, bastante utilizado para a recuperação de embriões que não encontram condições adequadas para o seu desenvolvimento; produção de haploides e duplo haploide, com a produção de plantas haploides seguida por duplicação de seus cromossomos e a micropropagação, técnica que envolve a produção de plantas em escala comercial (TORRES *et al.*, 1999). Por intermédio das técnicas supracitadas é possível obter novas plantas. A micropropagação é o destaque do nosso trabalho e trataremos desse tema com maiores detalhes.

2.5 Micropropagação

A micropropagação é uma técnica que vem sendo muito estudada em diferentes espécies vegetais. Ela é conduzida em condições assépticas e compreende múltiplos estágios que se inicia no estabelecimento, seguido pela multiplicação, alongamento e enraizamento, finalizando com a aclimatização das mudas (BASTOS *et al.*, 2007). Para o sucesso da micropropagação é necessário à obtenção de um protocolo específico, ajustado para a espécie de interesse. Como por exemplo, concentrações salinas do meio de cultivo, relação ótima entre fitorreguladores, ambiente e condições de cultivo.

Hoje em dia muitas lavouras são constituídas por mudas advindas da propagação vegetativa *in vitro*, destacando-se espécies frutíferas, florestais e ornamentais. A bananeira, o morangueiro e o abacaxizeiro são exemplos de espécies frutíferas micropropagadas a nível comercial. O eucalipto e a teca, representantes florestais e as ornamentais pode-se citar as orquídeas como carro chefe, seguida das bromélias, violeta africana e crisântemo (CID, 2014).

Há certas vantagens na utilização da micropropagação, entre elas existe a chance de reprodução de diversas plantas a partir de um explante inicial, produção independente da estação do ano em questão; plantas isentas de pragas e doenças; menor tempo para obtenção das plantas, menos espaço físico, homogeneidade, material idêntico a planta mãe e produção em escala comercial. Algumas limitações podem ser consideradas como desvantagens no cultivo *in vitro*, sendo elas: a falta de mão-de-obra capacitada para o manuseio das plantas e dos frascos; baixa taxa de sobrevivência das plantas na fase de aclimatização; contaminação *in vitro*; ocorrência de desordens morfológicas e fisiológicas (hiperidricidade); e o elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento (CID, 2014).

Alguns exemplos de espécies lenhosas que apresentam estudos relacionados à micropropagação: pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) micropropagado em meio WPM (Lloyd; Mc Cown, 1980), suplementado com benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) (SANTOS *et al.*, 2006); cerejeira (*Eugenia involucrata*) propagada via segmentos nodais em meio de MS com 50% das formulações salinas e utilização de citocininas. No mesmo trabalho foi testado o efeito de TDZ (16 e 32 μM) combinado a GA_3 (0; 10; 20 e 40 μM), adicionados em meio MS citado anteriormente (PAIM, 2011). Trabalhos com ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos) testando diferentes tipos de explantes (segmento apical caulinar e epicótilo) e meios nutritivos (WPM, MS, WPM/2 e MS/2) (PAIM, 2011) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) no qual os autores utilizaram segmentos nodais e brotações apicais inoculadas em meio MS suplementado com BAP, ANA, ácido indolacético (AIA) e 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (JARDIM *et al.*, 2010). Em todos os exemplos supracitados verifica-se a modificação dos meios de cultura utilizados, pois este é um fator de relevância na obtenção de mudas micropropagadas.

2.6 Meios de cultura

Há uma diversidade de meios utilizados para a micropropagação, sendo que a escolha do mesmo deve ser definida em função da espécie e tipo de cultivo que será realizado.

Os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). Nesse sentido, verifica-se que o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) vem favorecendo o crescimento e desenvolvimento de várias espécies. As formulações salinas do meio MS são bem concentradas, não sendo tão adequadas para algumas espécies. A literatura tem mostrado que a utilização de composições salinas menos concentradas tem fornecido melhores resultados para algumas espécies, como as lenhosas. Várias mudanças no padrão das formulações são propostas, na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro*, essas, visam principalmente, a redução ou incremento de alguns componentes (PASQUAL, 2001).

Para a micropropagação, os meios de cultura são preparados conforme a necessidade da espécie e são suplementados com reguladores de crescimento, os quais são responsáveis pelo crescimento e diferenciação do explante. Os reguladores de crescimento serão mais detalhados no próximo tópico.

2.6.1 Reguladores de crescimento

A planta em seu estado natural produz elementos químicos que expressam função de regularizar seus processos metabólicos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento. Esses elementos são encontrados em baixas concentrações nos tecidos e são denominados de hormônios ou substâncias de crescimento. Em contraponto, existem elementos sintéticos que desencadeiam atividades fisiológicas similares aos hormônios. Esses elementos recebem o nome de reguladores de crescimento ou fitorreguladores (PASQUAL, 2001).

Os grupos de hormônios vegetais e fitorreguladores fundamentais são compostos pelas auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Entre eles podemos destacar as auxinas e as citocininas, que são as principais responsáveis pela morfogênese e regulação de crescimento (PASQUAL, 2001).

As auxinas favorecem o desenvolvimento inicial do meristema e da extremidade do broto nos explantes. As citocininas são responsáveis por promoverem a síntese proteica. A combinação entre as duas estimulam a divisão celular e controlam a morfogênese, dando início ao crescimento ou diferenciação na cultura de tecidos vegetais (PASQUAL, 2001).

O BAP é uma citocinina sintética frequentemente utilizada na micropropagação. Na literatura é possível encontrar resultados que mostram sua eficiência na multiplicação de partes aéreas e na indução de gemas adventícias. Jardim *et al.* (2010) trabalharam com Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em meio de cultura MS acrescido de 4,0 mg.L⁻¹ de BAP e

obtiveram quantidades satisfatórias de brotações. Já Gutiérrez *et al.* (2011) trabalharam com pata-de-vaca (*Bauhinia cheilantha*) em meio de cultura WPM, suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP e verificaram maior número de brotos. O presente trabalho espera identificar uma concentração ótima de BAP capaz de sustentar a micropropagação da gabirobeira.

3 MATERIAL E MÉTODOS

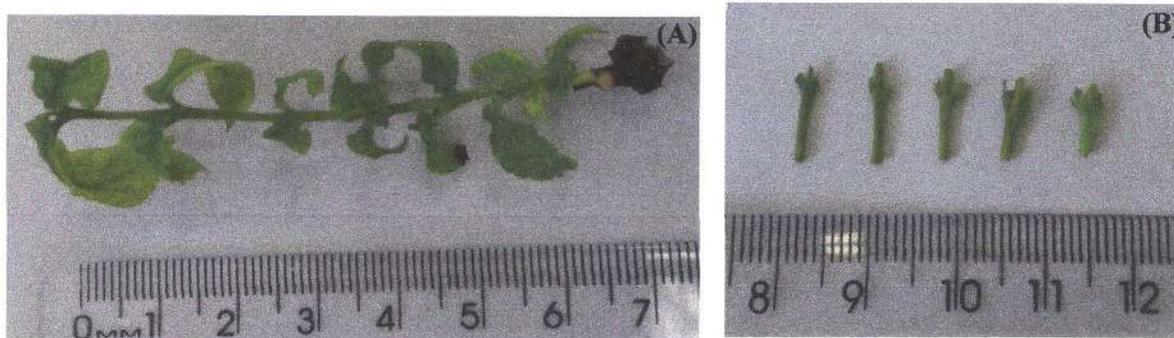
3.1 Local

O trabalho foi conduzido no laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias (CPCA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) *campus* Montes Claros, entre o período de agosto a dezembro de 2016.

3.2 Material vegetal e preparação

Como fonte de explante foram utilizados propágulos de gabirobeira pré-estabelecidos *in vitro*, com aproximadamente 7 a 10 cm de comprimento, oriundos do segundo subcultivo. O material foi fornecido pelo laboratório de Cultura de Tecido Vegetais da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG (FIGURA 2A). Como explante foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 1 cm contendo um par de gemas axilares (FIGURA 2B).

Figura 2 – Propágulo de gabirobeira de cultivo *in vitro* (A) e segmentos nodais constituindo os explantes (B)



Fonte: Do autor, 2017

3.3 Tratamento

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2, sendo cinco concentrações de 6 – benzilaminopurina (BAP): 0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹ e duas concentrações: 50% e 100% das formulações salinas do meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), constituído de oito repetições, sendo um explante por tubo de ensaio, como apresentado na Tabela 1. Na Tabela 2 encontra-se o meio MS em sua composição original.

Tabela 1 – Tratamentos aplicados no experimento.

Tratamentos	BAP (mg.L ⁻¹)	Soluções salinas do meio MS (%)
1	0	50
2	0	100
3	1	50
4	1	100
5	2	50
6	2	100
7	3	50
8	3	100
9	4	50
10	4	100

Tabela 2 – Tabela do meio de cultura Murashige e Skooge (1962) constando 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	
		CaCl ₂ .2H ₂ O	8800	
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

3.3.1 Indução de brotações

Para a instalação do experimento o meio MS foi suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinça e bisturi, os propágulos foram separados em segmentos nodais e inoculados individualmente em tubos de ensaio de 25x150mm, contendo 20 mL do meio de cultivo, de acordo com os diferentes tratamentos. A cultura foi mantida em ambiente de cultivo com condições ambientais controladas, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C.

3.4 Avaliações

Após 30 dias foram realizadas avaliações com base nas características: presença de brotos, presença de folhas, contaminação e oxidação. Aos 60 dias avaliou-se: presença de brotos, número de folhas, comprimento do broto (cm) e presença de raiz.

3.5 Análise estatística

As variáveis dependentes dicotômicas (binárias) foram ajustadas em regressão probit com o auxílio da função glm do software R. E para as variáveis dependentes quantitativas utilizou-se regressão linear, com o auxílio da função lm do software R.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Presença de brotos

No gráfico 1 e 2 encontram-se os resultados das duas avaliações (30 e 60 dias). Tanto na primeira como na segunda avaliação a formulação salina de 100% do meio de cultura MS promoveu a indução de brotos à medida que aumentou as concentrações de BAP até 2 mg.L⁻¹, correspondendo a aproximadamente 80%, com declínio dessa variável em concentrações superiores a 2 mg.L⁻¹.

Gráfico 1 – Porcentagem de brotações na primeira avaliação em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS

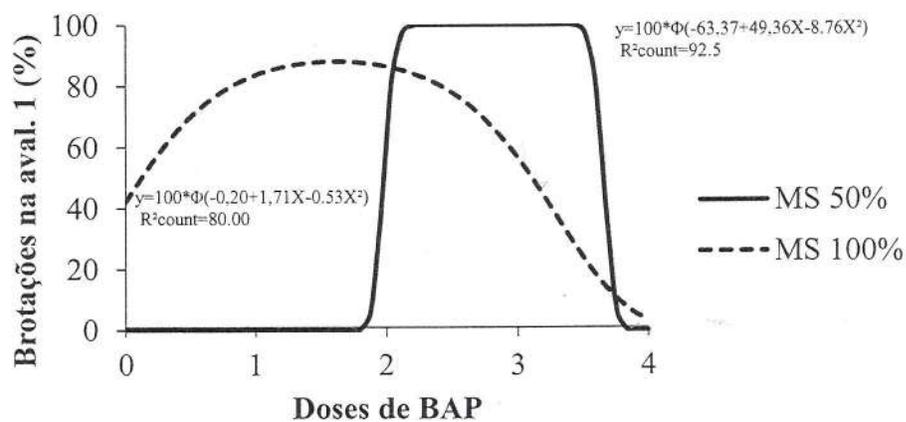
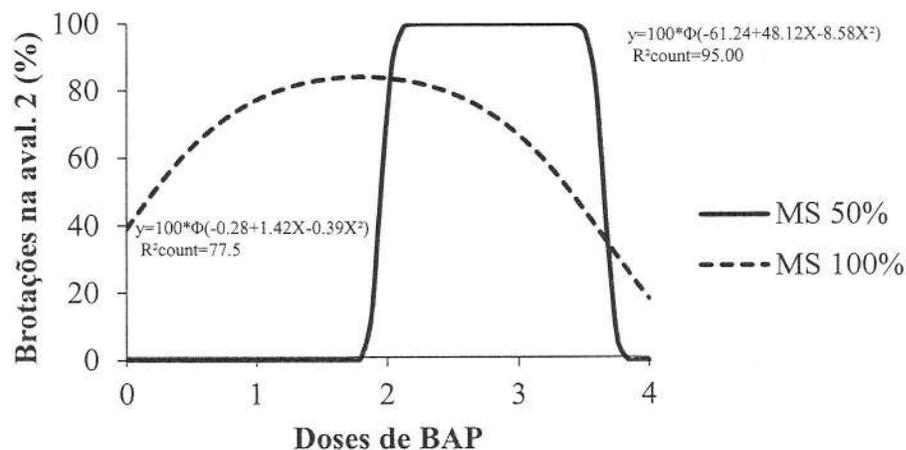


Gráfico 2 – Porcentagem de brotações na segunda avaliação em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS



Para o meio MS com 50% das formulações salinas, as brotações só surgiram a partir da adição de 2 mg.L⁻¹ BAP se mantendo até 3 mg.L⁻¹, correspondendo a 100% de

brotações. Conforme foi se aproximando da concentração de 4mg.L^{-1} houve um decréscimo chegando a 0% de brotações. Sendo assim, a dose de BAP 2 mg.L^{-1} tanto para o meio MS 100 e 50% é mais eficiente na indução de brotações, sendo que o meio de cultura MS 50% suplementado com concentrações entre 2 e 3 mg.L^{-1} de BAP apresentou maior eficácia quando comparado ao meio MS 100%.

Santos *et al.* (2006) trabalhando com pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) observaram que concentrações superiores a 1 mg.L^{-1} de BAP resultou em baixas brotações. Já Jardim *et al.* (2010) trabalhando com pau rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) observaram que doses com 4 mg.L^{-1} de BAP em meio MS apresentou maior significância para indução de brotações. No presente trabalho ficou claro que concentrações com 2 e 3 mg.L^{-1} de BAP para gabirobeira em meio MS 50% teve maior relevância para indução de brotações e concentrações elevadas próximas de 4 mg.L^{-1} da citocinina BAP podem ter causado fitotoxidez nos explantes e por isso não ocorreu a formação de brotos.

As plantas possuem hormônios vegetais que induzem a uma resposta fisiológica, seja formação de folha, raízes, brotos, dentre outros eventos. Estes não agem sozinhos e mesmo que haja a aplicação exógena de um hormônio vegetal sintético, no caso a citocinina BAP, outros hormônios que são produzidos pela planta também atuarão, contribuindo para a ação final. Neste trabalho, a relação entre os hormônios vegetais e o regulador de crescimento BAP em concentrações mais elevadas não contribuiu para uma resposta fisiológica satisfatória, ou seja, não favoreceu a formação de brotos.

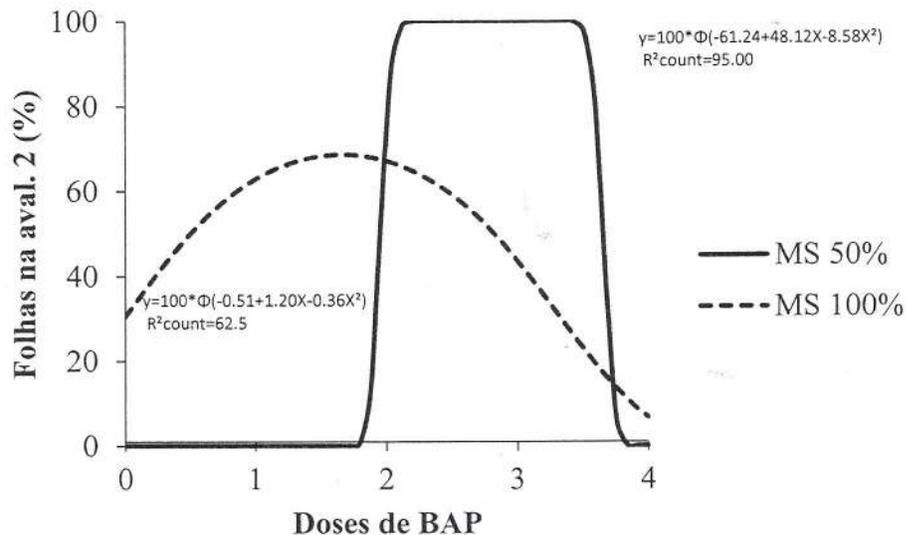
O resultado encontrado no trabalho é satisfatório quando se pensa em custos, uma vez que os macronutrientes, micronutrientes e reguladores de crescimento oneram bastante a produção de mudas micropropagadas nas biofábricas. A redução de tais componentes é satisfatória e de interesse no setor de pesquisas e de comercialização.

4.2 Presença de folhas

Observa-se no gráfico 3 maior porcentagem de folhas quando utilizada 50% das formulações salinas do meio de cultura MS suplementado com concentrações entre 2 e 3mg.L^{-1} de BAP, reduzindo essa variável em meios suplementados com concentrações superiores a 3mg.L^{-1} de BAP. Para o meio MS com 100% das formulações salinas observa-se a presença de folhas em meio de cultura com ausência de BAP e em meios com a adição de até 2 mg.L^{-1} , reduzindo a porcentagem de presença de folhas em meios com concentrações mais elevadas.

As citocininas são responsáveis pela síntese de proteína, e consequentemente promovem a divisão celular (PASQUAL, 2001), por isso maiores doses de BAP 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, sendo visto no presente trabalho.

Gráfico 3 – Porcentagem de folhas na segunda avaliação em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS



4.3 Contaminação

Não foi detectado contaminação em nenhum dos tratamentos. A ausência de contaminação pode ser explicada pelo fato da fonte de explante ser de um material já pré-estabelecido, o qual se encontrava em condições assépticas, permitindo que os explantes se encontrassem em melhores condições fitossanitárias. Outro fator que pode ter contribuído para o sucesso é o manuseio do explante no momento da incisão para obtenção dos segmentos nodais, ou seja, o procedimento foi efetuado em condições assépticas respeitando todos os procedimentos básicos padrões para evitar a entrada de agentes contaminantes.

A literatura relata que o princípio básico para o sucesso da cultura de tecidos decorre das medidas de prevenção e controle da contaminação microbiana. Esse controle é diretamente proporcional ao material de origem, assepsia e ambiente de manipulação, podendo estes proporcionar ou não um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos (LEIFERT *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2004). Tal relato comprova o êxito do presente trabalho. Em relação aos microrganismos

descritos como contaminantes, Blake (1988) cita bactérias, fungos, leveduras, vírus, ácaros, tripes e formigas, podendo estes causar danos de forma direta ou indireta no explante.

4.4 Oxidação

Em condições *in vitro*, explantes de espécies lenhosas apresentam uma certa fragilidade, ou seja, oxidam facilmente dependendo da componentes do meio de cultura, dos cortes realizados no explante, da luminosidade e do tipo de explante. No presente trabalho tomou-se o cuidado de colocar os explantes em ambiente de cultivo com ausência de luz por sete dias e depois a cultura foi mantida em fotoperíodo de 16h. No entanto, mesmo tomando os devidos cuidados houve presença de oxidação nos diferentes tratamentos, porém, os explantes conseguiram sobreviver e desenvolveram satisfatoriamente.

A oxidação é uma das dificuldades na propagação *in vitro* de lenhosas e ocorre pela reação de compostos fenólicos, que na presença de oxigênio causam escurecimento nos tecidos incisados, podendo levar ao colapso da cultura *in vitro*. Segundo Andrade *et al.* (2000) esses compostos acumulam-se em torno da superfície incisada, provocando alterações na composição do meio de cultivo e absorção de metabólicos. Tais problemas foram evidenciados no atual trabalho, tendo a necessidade de mais estudos para evitar ou reduzir essa oxidação, podendo ser empregados antioxidantes no meio de cultura.

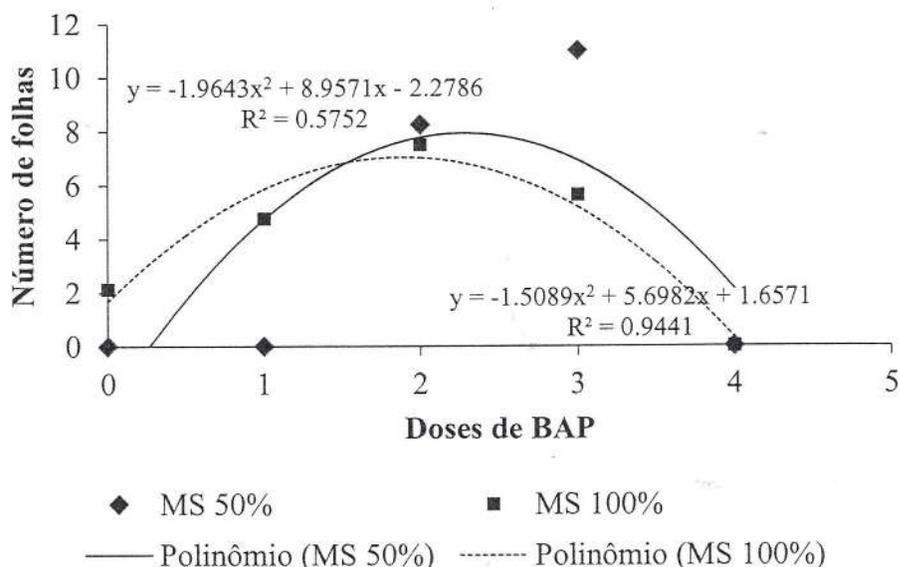
4.5 Números de folhas

O maior número de folhas obtido foi observado com o meio de cultura MS 50% suplementado com concentrações entre 2 e 3 mg.L⁻¹ de BAP, obtendo média de 10 folhas. Verificou-se também que a utilização da metade das formulações salinas do meio MS com ausência do regulador de crescimento BAP não promoveu o surgimento de folhas, ou seja, há a necessidade da suplementação do meio de cultura com BAP quando o objetivo é a obtenção o desenvolvimento das gemas presentes no segmento nodal. Para o meio MS 100% observa-se que tanto a ausência quanto a presença do BAP proporcionou o desenvolvimento das folhas, sendo os melhores resultados encontrados nas concentrações entre 2 e 3 mg.L⁻¹ de BAP, alcançando aproximadamente 6 e 8 folhas, respectivamente (GRÁFICO 4).

Resultado semelhante foi observado por Villa *et al.* (2005) trabalhando com amoreira-preta (*Rubus* sp.), onde os autores observaram um maior número de folhas em meio

MS com 150% das formulações salinas. Villa *et al.* (2006), trabalharam com videira (*Vitis* sp.) e para número de folhas obtiveram resultados superiores em meio MS 50%.

Gráfico 4 - Números de folhas em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS

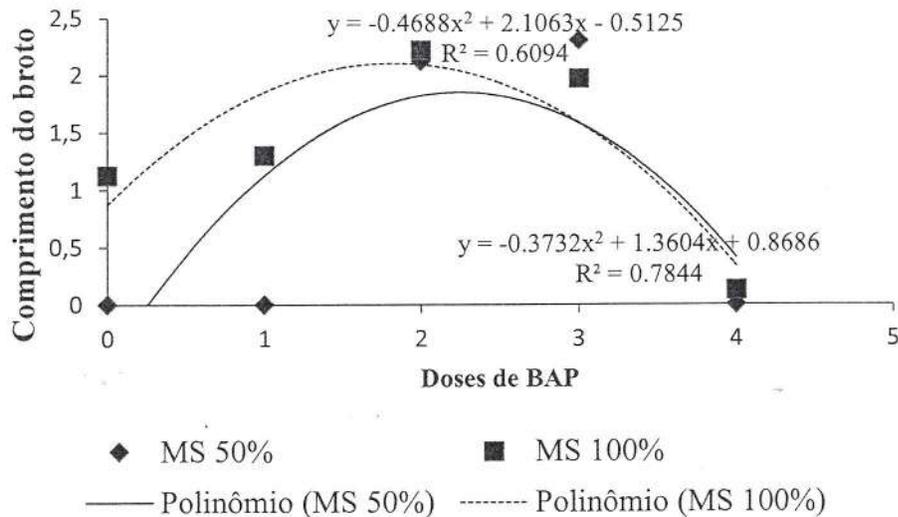


4.6 Comprimento do broto

É observado no gráfico 5 que o meio de cultura MS 100% com ausência e presença de BAP até a concentração de 2 mg.L⁻¹ favoreceu o comprimento de brotos, observando uma redução dessa variável em concentrações mais elevadas. Entretanto o meio MS 50% apresentou o maior comprimento de broto na concentração de 3 mg.L⁻¹ de BAP com média de 2,5 cm. O comportamento da curva dos polinômios MS 50% e MS 100% apresentam certa semelhança, ou seja, concentrações entre 2 e 3 mg.L⁻¹ de BAP são mais proeminentes para o desenvolvimento dos brotos em relação ao seu comprimento.

Villa *et al.* (2005), trabalhando com multiplicação *in vitro* da *Rubus* sp. constatou que o meio MS 50%, com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP obteve o maior comprimento de broto, diferindo dos resultados obtidos, que neste caso o maior comprimento de broto foi com 2 e 3 mg.L⁻¹ de BAP.

Gráfico 5 – Comprimento do broto em diferentes doses de BAP e concentrações de meio MS



4.7 Presença de raiz

Não foi constatada a presença de raiz em nenhum dos tratamentos, sendo que este resultado pode ser explicado pelo estudo de Grimaldi *et al.* (2008). Para os autores, o enraizamento *in vitro* de explantes de espécies lenhosas é limitado devido a fatores endógenos (hormônios, enzimas e diferenciação dos meristemas) e exógenos (relações hídricas; luminosidade; temperatura; meio de cultura; reguladores de crescimento, tipo de explante, nutrientes; carboidratos). A presença de citocinina e ausência de auxina no meio de cultura, pode promover a formação da parte aérea do explante e inibir a formação de raízes.

No presente trabalho não foi utilizado auxina, somente a citocinina BAP e mesmo na ausência desta, não houve o surgimento de raiz. Portanto pode-se inferir que a presença de citocinina no meio de cultura não interferiu na indução de raiz. Alguns estudos demonstram que a interação de citocininas com auxinas ajudam a promover a indução de raízes como relatado por Jadim *et al.* (2010) trabalhando com pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), que observaram maior número de raízes/ explantes na concentração de 3,0 mg.L⁻¹ de ANA, tornando necessários mais estudos para a espécie *Campomanesia pubescens* O. Berg.

A gabirobeira é uma frutífera de tamanha importância para a região do Norte de Minas e para os trabalhos que compreendem a produção de mudas dessa espécie, visando o interesse de conhecer melhor a fisiologia e o desenvolvimento da planta. O estudo em questão, abordou o estabelecimento de protocolo para a micropropagação de mudas e servirá de base científica para estudos de conservação *in vitro* da espécie e para pesquisas que tencionam a reintrodução desta na natureza.

5 CONCLUSÃO

As concentrações 2 e 3 mg.L⁻¹ de BAP promovem maiores quantidades de brotações via segmentos nodais. Tais concentrações possibilita um efeito positivo para o sucesso do cultivo *in vitro* da gabirobeira.

Para segmentos nodais a indução de brotações é mais eficiente com a utilização de metade das formulações salinas do meio de cultura MS, ou seja, o meio MS 50%, sendo o mais recomendado no cultivo *in vitro* da espécie estudada.

6 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. *et al.* Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.
- ALMEIDA, S.P. **Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes**. In: _____. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998. p. 247-281.
- AQUINO, F.G.; OLIVEIRA, M.C. **Reserva legal no bioma Cerrado: uso e preservação**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 22p.
- BASTOS, L.P. *et al.* Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007.
- BLAKE, J. Mites and thrips as bacterial and fungal vectors between plant tissue cultures. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 225, p. 163-166, 1988.
- BORLAUG, N.E. **Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead**. In: R. Bailey (ed.). Global warming and other eco-myths. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. p. 29-60, 2002.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, p.533-568, 1998.
- CARVALHO, A.C.P.P. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v.7, n.1, p. 30-60, 2011.
- CID, L.P.B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014.
- DIAS, P.C.; OLIVEIRA, L.S.; XAVIER, A. E WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestas lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, out./dez. 2012.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas, UFPEL, 1995, 178p.
- FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis nativos do D.F.: gabiobas, pitangas e araçás. **Cerrado**, Brasília, v. 4, n. 18, p. 11-16, 1972.

FERREIRA, M. A .; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A . **Aplicações da cultura dos tecidos no melhoramento genético de plantas**. In: TORRES, A . C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A . . Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 21-43.

FRÁGUAS, C. B.; PEREIRA, A. R.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. **Propagação *in vitro* de espécies ornamentais**. Lavras, UFLA, [s.d]. Disponível em: <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:4KLLKqylbi6cJ:www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/56-boletins-de-extensao%3Fdownload%3D1184:boletinsextensao+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>>. Acesso em: 5 de mai. 2017.

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-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.

GRIMALDI, F. *et al.* Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família *Rosaceae*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.7, n.2, p.160-168, 2008.

GUTIÉRREZ, I. E. M. *et al.* Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v. 41(2), p. 260-265, 2011.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7th. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

JARDIM, L.S. *et al.* Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, Amazonas, v. 40 (2), p. 275 – 280, 2010.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. **A conservação do Cerrado Brasileiro**. Megadiversidade, Brasília, DF, n.1, 2005.

LEGRAND, C. D.; KLEIN. R. M. **Flora ilustrada catararinense: Mirtáceas**. Itajaí, SC: MIRT, 1977. p. 219-330.

LEIFERT, C.; MORRIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for con-tamination problems in vitro. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Netherlands, v. 13, n. 2, p. 139-183, 1994.

LONDE, L.N. *et al.* Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, v.23, n.3, p.94-100, 2007. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6361>>. Acesso em: 21 maio 2017.

MACHADO, L.L. *et al.* Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.5, p.431-435, maio 2004.

MACHADO, R.B. *et al.* 2004. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A .; McKEE, R. A . **Técnicas de cultura de tecidos**. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A . Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-181.

OLIVEIRA, M. K. T.; BEZERRA NETO, F.; CÂMARA, F. A.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, R. M. O. Multiplicação *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). **Revista Caatinga**, v. 21, n. 4, p.129-134, outubro/dezembro de 2008.

PAIM, A. F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. E *Handroanthus chrysotrichus* (MART. ex DC) MATTOS**. 2011. 81 f., Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM. Disponível em : < http://cascavel.ufsm.br/tede/tde_arquivos/10/TDE-2011-11-08T141106Z-3321/Publico/PAIM,%20ALINE%20FERREIRA.pdf>. Acesso em : 21 maio. 2017.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. 2001. 127 f. Universidade Federal de Minas Gerais, UFLA, Lavras, MG, 2001.

PINHAL, H.F. *et al.* Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v.41, n.7, julho de 2011.

PINHEIRO, D. Pesquisadores de Ipameri estudam gabioba. **Jornal do Cerrado**, v.12, jun. 2006.

RATTER, J., BRIDGEWATER S.; RIBEIRO J.F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v.60, p 57-109, 2003. Disponível em: <http://www.pbmc.coppe.ufrj.br/es/component/docman/doc_view/989-ratterbridgewateretal2003>. Acesso em: 6 de maio 2017.

RIBEIRO C. A. A. S.; SOARES, V. P.; OLIVEIRA, A. M. S.; GLERIANI, J. M. O desafio da delimitação de Áreas de Preservação Permanente. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, p. 203-212, 2005

RODRIGUES, V. E. G; CARVALHO, D. A. de. **Plantas Medicinais no Domínio dos Cerrados**. Lavras: UFLA; 2001.

SANTOS, B.R. *et al.* Micropropagação de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.293-296, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v28n2/a31v28n2.pdf>>. Acesso em: 21 maio. 2017.

SILVA, D.B. da; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas do Cerrado**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 178p

SILVA, J. T. S. *et al.* The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulture**, Netherlands, v. 97, n. 3, p. 397-410, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGILL**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 132 p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Serviço de Produção de Informação – SPI**, Brasília, v. 2, 354 p. 1999.

VIEIRA, R.F.; COSTA, T.S.A.; SILVA, D.B. da; FERREIRA, F.R.; SANO, S.M. **Frutas nativas do cerrado da região Centro-oeste**. Brasília, DF: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, 2006. 320p.

VILLA, F. *et al.* Multiplicação in vitro da amoreira-preta ‘Ébano’ em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, maio/jun., 2005.

VILLA, F. *et al.* Multiplicação in vitro de porta-enxerto de videira em variações do meio MS.
Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá, v. 28, n. 3, p. 345-349, July/Sept., 2006.