



**CECÍLIA RAMOS DE OLIVEIRA SANT'ANA**

**INDUÇÃO DE BROTAÇÃO E CALOGÊNESE *in vitro* EM *Campomanesia rufa* (O. BERG) NIED**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**CECÍLIA RAMOS DE OLIVEIRA SANT' ANA**

**INDUÇÃO DE BROTAÇÃO E CALOGÊNESE *in vitro* EM *Campomanesia rufa* (O. BERG) NIED**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Renato Paiva, Ph.D.

Coorientador

Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva

**LAVRAS - MG**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Sant'Ana, Cecília Ramos de Oliveira.

Indução de Brotação e Calogênese *in vitro* de Casaqueira  
[*Campomanesia rufa* (O. Berg.) Nied.] / Cecília Ramos de Oliveira  
Sant'Ana. – Lavras : UFLA, 2016.  
63 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2016.

Orientador(a): Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Frutífera. 2. Gabiroba. 3. Micropropagação. 4. Cerrado. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CECÍLIA RAMOS DE OLIVEIRA SANT' ANA**

**INDUÇÃO DE BROTAÇÃO E CALOGÊNESE *in vitro* EM *Campomanesia*  
*rufa* (O. BERG) NIED**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2016.

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho      Embrapa/Café

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Fernanda Carlota Nery                      UFSJ

Prof. Renato Paiva, Ph.D.  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2016**



*A Deus,  
Pelo pouco que tenho a pedir  
e pelo muito que tenho a agradecer!*

## **OFEREÇO**

*Aos meus pais,  
**José Timóteo de Oliveira e**  
**Luzia da Silva Ramos de Oliveira,**  
e ao meu irmão, **Ricardo Ramos de Oliveira,**  
pelo amor, carinho, dedicação e companheirismo.*

## **DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha companhia e força em todos os momentos da minha vida.

À minha família, meu pai José, minha mãe Luzia e ao meu irmão Ricardo, pela fortaleza, amizade, companheirismo, pelo nobre amor e carinho.

Ao meu orientador e professor Renato Paiva, pela oportunidade, amizade e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao meu coorientador, Luciano Coutinho Silva, pelos ensinamentos, pela paciência e também pela amizade.

Aos meus amigos, Michele Valquíria dos Reis e Diogo Pedrosa Côrrea da Silva, pelos ensinamentos, paciência e atenção.

Aos meus amigos, Jéssica Cristina Teodoro, Juliene dos Reis Moreira, Márcia Justino, Elisangêla Gomide Minatti, Simonica Almeida, Lermen Forigua, Fernanda Moreira e Luciano Bueno dos Reis, pela amizade sincera, pelo carinho, pelas conversas e companheirismo.

Aos meus amigos do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia, em especial a Maria Helena (*in memoriam*), aos meus grandes amigos, Barrinha, Joel, Sr. Odorêncio, Dany, Evaristo, Dartagnan, obrigada pelas conversas, sorrisos e por tudo, meu muito obrigada a todos vocês.

A todos os meus amigos do Setor, pela amizade e companheirismo.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela amizade, aprendizado e paciência.

Aos membros da banca, Dr<sup>a</sup> Milene Alves de Figueiredo Carvalho e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda Carlota Nery, pela disponibilidade e contribuição.

E a todos que fizeram parte da minha caminhada acadêmica, meus amigos da graduação e do mestrado, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e realização dos meus sonhos, minha graduação em Ciências Biológicas e meu mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

MUITO OBRIGADA!

## **BIOGRAFIA**

CECÍLIA RAMOS DE OLIVEIRA SANT' ANA, filha de José Timóteo de Oliveira e Luzia da Silva Ramos de Oliveira, nasceu em 02 de junho de 1987 em São Paulo-SP. Aos 5 anos, estudou no Jardim da Infância no OZEN, e os primeiros anos do Ensino Fundamental I na Escola Estadual P.S.G. Monsenhor João Batista de Carvalho. Aos 9 anos, mudou-se para Teixeira-MG onde concluiu os estudos até o Ensino Médio em 2005, na Escola Estadual Dr. Mariano da Rocha. Em 2007, iniciou os estudos na Universidade Federal de Lavras, onde cursou inicialmente a graduação em Educação Física. Em 2010, iniciou os estudos de graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura). Durante o curso desenvolveu atividades vinculadas à iniciação a docência (PIBID/CAPES), iniciação científica (PIBIC/FAPEMIG) e projetos de extensão (PREUNI). Em 2014 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal sob orientação do Professor Renato Paiva, Ph.D., concluindo-o em fevereiro de 2016. Atualmente é professora efetiva no Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais.

*"Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.  
Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade  
e perseverança."*

*(Albert Einstein)*

*"Escuta o teu coração, ele conhece todas as coisas; pois onde ele estiver, é onde está o teu  
tesouro."*

*(Paulo Coelho)*



## RESUMO GERAL

A *Campomanesia rufa* (*C. rufa*) é uma espécie frutífera, nativa do Brasil. São escassas as informações a respeito dessa espécie e os estudos *in vitro* ainda são incipientes. Desta forma, objetivou-se desenvolver protocolos de germinação, multiplicação e calogênese para a espécie. Para a germinação *in vitro*, sementes foram inoculadas em meio de cultura MS suplementado com GA<sub>3</sub> (0; 2; 8; 32 e 128 µM). Para a multiplicação foram realizados três diferentes experimentos além da etapa de alongamento dos brotos. No primeiro experimento de multiplicação, os meios de cultura foram suplementados com três diferentes citocininas (BA, BAP ou TDZ) nas concentrações de 0; 2,25; 4,5 e 9,0 µM. No segundo experimento para a qualidade de luz, brotações foram inoculadas em meio de cultivo contendo 1µM de BA, BAP ou TDZ, e após a inoculação os explantes foram mantidos sob iluminação de lâmpadas fluorescentes brancas e sob iluminação de diodos emissores de luz. No terceiro experimento de multiplicação foi realizado em diferentes fotoperíodos (8, 12 e 16 horas), os explantes foram mantidos em meio de cultivo suplementado com 4,5 µM de BAP e sob iluminação de lâmpadas fluorescentes brancas. Para aprimorar o protocolo de multiplicação, foi realizado um experimento para alongar os brotos, para isso aplicou-se GA<sub>3</sub> em diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM). E para finalizar, foram realizados experimentos de controle de oxidação e calogênese na espécie. Para o controle da oxidação, o meio foi suplementado com diferentes concentrações de PVP (0; 100; 200; 400 e 800 µM) e para a indução de calos, foi aplicado o regulador 2,4-D (0; 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 µM) ao meio de cultura. A *Campomanesia rufa* apresentou uma baixa germinação no escuro (14%). Na etapa de multiplicação, o BAP a 5,62 µM induziu maior número de brotos (4,3), e as lâmpadas LEDs como fonte de luz combinado ao meio de cultura com 1µM de BAP induziu maior número de brotos (4,9). Os fotoperíodos de 8 e 12 horas tiveram os melhores resultados para número de brotos (7,3) e (5,4) aos 90 dias. Na concentração de 8 µM de GA<sub>3</sub> obteve-se o maior comprimento médio da *C. rufa* de (32,3 mm) e, o uso de PVP na concentração de 584,3 µM controla até (27,3%) a oxidação de explantes foliares jovens, já na indução de calos, o 2,4-D a concentração de 10 µM induz maior formação de calos (58,3%) na *C.rufa*. Portanto, podemos concluir que o uso do BAP é eficiente na indução de brotos, o PVP controla oxidação em segmentos foliares e o 2,4-D induz calos na *C.rufa*.

Palavras-chave: Plantas lenhosas. Micropropagação. Cultivo *In vitro*. Gabiroba. Cerrado.

## GENERAL ABSTRACT

The *Campomanesia rufa* (*C. rufa*) is a fruitful species native to Brazil. Information about this species is scarce and *in vitro* studies are still incipient. Thus, the present study aimed at developing germination, multiplication and calogenesis protocols for this species. For *in vitro* germination, seeds were inoculated in MS medium supplemented with GA<sub>3</sub> (0, 2, 8, 32 and 128 µM). For multiplication three different experiments were conducted in addition to the shoot elongation. In the first multiplication experiment, the culture media were supplemented with three different cytokinins (BA, BAP or TDZ) at 0, 2.25, 4.5 and 9.0 µM concentrations. In the second experiment, for light quality, shoots were inoculated into culture medium containing 1µM BA, BAP or TDZ. After inoculation, the explants were maintained under white fluorescent lamps and under light-emitting diodes. The third multiplication experiment was performed in different photoperiods (8, 12 and 16h). The explants were maintained in culture medium supplemented with 4.5 µM BAP under white fluorescent lamps. In order to improve the multiplication protocol, an experiment was performed to lengthen the shoots. To that end, different GA<sub>3</sub> concentrations (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 µM) were applied. Finally, experiments for oxidation control and calogenesis in the species were performed. For oxidation control, the medium was supplemented with different concentrations of PVP (0, 100, 200, 400 and 800 µM) and for callus induction, the regulator 2,4-D (0; 0, 1, 1.0, 5.0 and 10.0 µM) was applied to the culture medium. The *Campomanesia rufa* presented low germination in the dark (14%). In the multiplication step, BAP at 5.62 µM induced a higher number of sprouts (4.3) and LED lamps as the light source combined with the culture medium with 1µM BAP induced a higher number of sprouts (4.9). The 8h and 12h photoperiods showed the best results regarding the number of sprouts (7.3) and (5.4), respectively, at 90 days. The highest average *C. rufa* length (32.3 mm) was obtained at a GA<sub>3</sub> concentration of 8 µM. The use of PVP at a concentration of 584.3 µM controls up to 27.3% oxidation in young leaf explants. In callus induction, 2,4-D at the concentration of 10 µM leads to a higher callus formation (58, 3%). Therefore, we can conclude that the use of BAP is efficient in shoot induction, PVP controls oxidation leaf segments, and 2,4-D induces callus in *C.rufa*.

Keywords: Woody plants, Micropropagation, *In vitro* cultivation, Gabiroba, Cerrado.



## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1 <i>Campomanesia rufa</i> .....	16
2.2 Cultura de tecidos .....	19
2.3 Reguladores de crescimento e antioxidante .....	20
2.4 Influência da luz no cultivo <i>in vitro</i> .....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
3.2 Assepsia dos frutos e das sementes para o estabelecimento <i>in vitro</i> .....	24
3.3 Germinação <i>in vitro</i> .....	25
3.4 Indução de brotações em casaqueira .....	25
3.4.1 Indução de brotos a partir de diferentes fontes de citocininas .....	25
3.4.2 Qualidade de luz na indução de brotos em casaqueira .....	26
3.4.3 Indução de brotações em diferentes fotoperíodos .....	26
3.5 Alongamento <i>in vitro</i> de brotações de casaqueira utilizando o GA <sub>3</sub> .....	27
3.6 Controle da oxidação em folhas de casaqueira .....	27
3.7 Indução de Calos .....	28
3.8 Análises estatísticas .....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	29
4.1 Germinação <i>in vitro</i> .....	29
4.2 Indução de brotos a partir de diferentes fontes de citocininas .....	31
4.3 Qualidade de luz na indução de brotos em casaqueira .....	37
4.4 Indução de brotações em diferentes fotoperíodos .....	40
4.6 Controle de Oxidação em folhas de casaqueira .....	47
4.7 Calogênese .....	49
5 CONCLUSÃO .....	51
6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país com maior diversidade do mundo de acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2016), pois, abriga um vasto patrimônio genético.

Dentre os biomas brasileiros, temos o Cerrado, que ocupa 22% do território brasileiro (Ministério do Meio Ambiente, 2016). Considerado a savana brasileira, a sua fitofisionomia abriga muitas espécies com atributos medicinais e de interesse econômico.

Uma porção significativa dessas plantas do Cerrado está ameaçada de extinção ou precisa de maiores estudos, devido ao elevado endemismo e ao extrativismo predatório (KLINK; MACHADO 2005).

Entre as espécies endêmicas do Cerrado, está a *Campomanesia rufa*, uma espécie frutífera, lenhosa, pertencente à família Myrtaceae. Conhecida popularmente por casaqueira, gabioba ou guavira (PORTO; GULIAS, 2006; SILVA et al., 2009).

Assim como outras frutíferas nativas, a casaqueira é de difícil propagação no seu *hábitat* natural, pois, no gênero *Campomanesia* em algumas espécies as sementes apresentam baixa longevidade devido ao elevado teor de água que possuem quando o fruto se desprende da planta-mãe (SMANIOTTO et al., 2014; VALLILO et al., 2006). Desta forma, esse fator contribui para o aumentada respiração e conseqüentemente para a proliferação de micro-organismos, levando à deterioração do material vegetal (PINHAL et al., 2011).

Sendo assim, a micropropagação pode contribuir para a germinação de espécies lenhosas do Cerrado, as quais são difíceis de propagar naturalmente. A obtenção do material vegetal *in vitro*, contribui para a manutenção de banco de germoplasma e troca de material genético livre de doenças, ampliando as

possibilidades de pesquisa (DOUSSEAU et al., 2011).

A obtenção de um maior número de plantas é possível utilizando-se da micropropagação. Essa técnica possibilita a regeneração das plantas a partir de um segmento vegetal, com o uso de reguladores de crescimento, controle de fotoperíodo e luz (qualidade e quantidade) (TORRES et al., 2000; RADMAN et al., 2003).

Outra técnica da micropropagação é a calogênese. A partir dessa técnica é possível regenerar plantas, assim como na multiplicação via indução de brotos, pois, o calo, um aglomerado celular, é capaz de diferenciar-se em qualquer tecido vegetal (FLORES et al., 2007).

Portanto, o cultivo *in vitro*, é uma alternativa viável e eficiente para propagar plantas, ameaçadas de extinção ou vulneráveis, como a casaqueira, pois, podem-se obter mudas viáveis de maneira rápida, além de preservar os indivíduos já existentes (LAVANYA et al., 2014).

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo desenvolver protocolos de indução de brotação e calogênese em *Campomanesia rufa*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Campomanesia rufa*

O Cerrado brasileiro é considerado uma savana, que conta com uma biodiversidade ampla, tanto de animais quanto de vegetais (COUTINHO, 2006). Ao aprofundar-se na fitofisionomia deste bioma, é notável uma elevada representatividade de várias famílias de plantas, tanto lenhosas quanto herbáceas, e dentre as famílias das plantas lignificadas, temos a família Myrtaceae, que é considerada um dos mais importantes táxons dentro das Angiospermas brasileiras (GRESSLER; PIZZO; MORELLATO, 2006). Essa importância das Myrtaceae está ligada a interações ambientais (polinização e alimentação de animais silvestres) quanto a econômicas. No quesito econômico, essa família apresenta a produção de vários produtos úteis ao homem, como madeira, fármacos, cosméticos e gêneros alimentícios (CARDOSO-LEITE et al., 2004; PROENÇA; GIBBS, 1994).

No Brasil, existem aproximadamente 928 espécies de Myrtaceae catalogadas, sendo 707 endêmicas do Brasil de acordo com Forzza et al. (2010), e dentre as espécies endêmicas encontra-se no cerrado mineiro a *Campomanesia rufa*, ou popularmente conhecida como casaqueira. A casaqueira é uma espécie pouco conhecida no âmbito científico, assim como outras espécies do seu gênero, e possui um amplo potencial a ser pesquisado, contudo, requer uma exploração consciente, devido ao seu endemismo e poucos indivíduos catalogados.

A casaqueira é uma espécie lenhosa, frutífera e arbórea, com folhas simples e filotaxia oposta. A margem do limbo é inteira com morfologia elíptica, apresenta tricomas e nervura coletora marginal que é uma característica marcante na família Myrtaceae. Além de pontos translúcidos presentes no limbo foliar, que são glândulas produtoras de terpenos (VIEIRA, 2010).

O caule da *Campomanesia rufa* (Figura 1) apresenta córtex esfoliante e espesso, por este motivo em algumas regiões essa espécie é denominada popularmente de “casaqueira”. O hábito botânico varia de subarbusto de 0,3 m a árvores de até 15 m de altura (LANDRUM, 1982; VALLILO et al., 2006). A inflorescência é de coloração branca, podendo ser um dicásio ou uniflora, com média de três flores por pedúnculos (LANDRUM, 1982; OLIVEIRA et al., 2011).



Figura 1 Aspecto da planta adulta da casaqueira (*Campomanesia rufa*)

A *C. rufa*, além dos nomes casaqueira e gabioba, também pode ser conhecida popularmente por outros nomes, como guabioba, guavioba, guavirova e guavira (LIMBERGER et al., 2001; VIECILI et al., 2014). Além de também ter uma sinonímia científica, de *Abbevillea rufa* O. Berg, no entanto, não é muito usual na literatura (The International Plant Name Index, 1893).

A área de ocorrência da casaqueira é restrita a regiões de bosque e sub-bosque de Minas Gerais (SOBRAL et al.,2014) e devido ao endemismo dessa espécie, poucas descrições são encontradas a seu respeito (MORAIS & LOMBARDI, 2006).

Apesar da escassez de conteúdo na literatura referente à casaqueira, outras espécies do gênero por sua vez têm sido estudadas, como *C. xanthocarpa*, *C. adamantium*, *C. pubescens*, *C. guazumifolia*, *C. guaviroba* e *C. latifolia*. Algumas propriedades medicinais têm sido relatadas para o gênero *Campomanesia*, como adstringentes, no tratamento de gripe, hiperglicemia, hipercolestermia, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e antidiarreica (GUITIERREZ et al., 2008; RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Além da aplicação farmacológica do gênero *Campomanesia*, os frutos também são matérias-primas utilizadas na gastronomia, pois, apresentam um sabor adocicado ao paladar. Na literatura, há descrições sobre a produção de geleias, pavês, pudim, licores, sorvetes, doces, bolos e sucos a partir dessa fruta do Cerrado (PORTO; GULIAS, 2006). Devido às várias aplicações dos frutos, o consumo pelas indústrias pode ocorrer de forma extrativista e até mesmo predatória (AVIDOS; FERREIRA, 2003).

Todavia, não são apenas suas finalidades para o homem que torna as guabirobas plantas relevantes para a conservação, mas também sua importância ecológica. Haja vista, que algumas espécies de animais têm como fonte nutricional os frutos das guabirobeiras (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Desta forma, espécies como a *Campomanesia rufa* que possuem um valor ecológico, ambiental e comercial intrínseco a elas, devem ser preservadas, antes que passem de vulnerável a extintas na *Red-List*, conforme a *World Conservation Monitoring Centre* (1998).

## 2.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos ou cultivo *in vitro*, são técnicas voltadas ao cultivo de um explante (célula, tecido ou órgão) em meio nutritivo, sob condições controladas (luz, temperatura, pH, umidade), que tem por finalidade a propagação de um maior número de plantas em menor tempo e espaço, sendo esses vegetais livres de patógenos. Além de contribuir, com a conservação e troca de materiais provenientes de bancos de germoplasma (CARVALHO et al., 2011).

A eficiência com que se pode obter mudas de plantas, por meio do cultivo *in vitro*, faz dessa prática uma ferramenta biotecnológica excelente para as biofábricas. Pois, através do cultivo *in vitro*, é possível a produção de mudas de qualidade através de seleção genética, livres de patógenos e resistentes a pragas, além de produção de metabólitos secundários e transformação genética (CARVALHO et al., 2011; MARTINS; CARVALHO, 2012). Desse modo, através da cultura de tecidos é possível obter mudas uniformes de plantas, com procedência fitossanitária e em menor período de tempo (CARVALHO; VIDAL, 2003).

Basicamente, pode ser trabalhado na cultura de tecidos protocolos para assepsia, germinação, multiplicação, alongamento de brotos, enraizamento, aclimatização, calogênese, embriogênese e organogênese. A assepsia é o processo pelo qual o material vegetal passa para a esterilização, eliminando assim os microorganismos que estejam presentes na célula ou tecido da planta (QUISEN; ANGELO, 2008; RAPOSO et al., 2012).

A germinação é a etapa do biociclo de uma planta, em que o embrião sai do estado latente e retorna ao estado ativo. Esse processo fisiológico ocorre como resposta ao meio onde a semente se encontra, se as condições ambientais (radiação, temperatura, umidade, pH e nutrientes) se apresentarem favoráveis, então este embrião germinará (NONOGAKI, 2006).

A multiplicação das plantas *in vitro* pode ocorrer via organogênese, sob duas formas, direta ou indireta. Na organogênese direta, ocorre o surgimento de estruturas a partir de tecidos diferenciados. Já a organogênese indireta ocorre quando há a formação de calos (calogênese) para posteriormente regenerar as estruturas vegetais em brotos ou embriões (CARVALHO et al., 2006).

### **2.3 Reguladores de crescimento e antioxidante.**

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas, exógenas, aplicadas às plantas e desempenham funções semelhantes às substâncias endógenas e podem ser iguais quimicamente aos fito-hormônios, possibilitando alterar o crescimento e desenvolvimento das plantas (SILVA, 2014).

O ácido giberélico ( $GA_3$ ) é amplamente utilizado na cultura de tecidos não apenas no intuito de otimizar a germinação das plantas, mas também pode ser usado para alongar plantas. Atua também na quebra de dormência e ativação de enzimas ( $\alpha$ -amilases) que participam do catabolismo dos componentes do endosperma para posterior absorção pelo embrião. O  $GA_3$  também tem aplicação no alongamento de brotos, pois, através da plasticidade da parede celular das células vegetais promove o crescimento dos entrenós das plantas (GUIMARÃES et al., 2010; VIEIRA; MONTEIRO, 2002).

As citocininas atuam no processo de divisão celular nos tecidos vegetais, permitindo o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos vegetais. Através da quebra da dominância apical, permite o desenvolvimento das gemas axilares. Desta forma, reguladores que atuam como citocininas podem maximizar a produção de biomassa (GUIMARÃES et al., 2010; VILA et al., 2005).

As concentrações de citocininas exógenas aplicadas ao meio de cultivo, devem ser escolhidas cautelosamente, pois, quando a concentração é excedida, pode ser tóxica para o explante, tendo consequências como hiper-hidricidade,

inibição, encurtamento de brotos (ALI et al., 2008; BARRUETO CID, 2000; KHAN et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2012).

As auxinas são os fito-hormônios mais conhecidos no âmbito da pesquisa vegetal, sua ação principal é no alongamento e expansão celular de plantas. Nos tecidos essas substâncias além de serem aplicadas para estimular a divisão celular também contribuem para o desenvolvimento radicular de espécies lenhosas e não lenhosas *in vitro* (CENTELAS et al., 1999).

As auxinas também contribuem para a dominância apical e diferenciação vascular e quando aplicadas no caule promovem formação de raízes adventícias e também aumentam a frutificação (PEREIRA et al., 2003; WOODWARD; BARTEL, 2005). De acordo com Cangahuala-Inocente et al. (2007), o uso de auxinas, tais como, 2,4-D, picloran e dicamba, foram eficientes para induzir calogênese e embriogênese.

Além dos reguladores de crescimento, a aplicação de antioxidantes no meio de cultivo pode contribuir para refinar protocolos de micropropagação, pois, o acúmulo de polifenóis pode prejudicar o desempenho da regeneração nos explantes cultivados *in vitro*. A polivinilpirrolidona (PVP), evita a oxidação através da ação das enzimas fenolases, que conforme Pasqual e colaboradores (1997) aderem a quinonas e compostos fenólicos impedindo a expansão pelo meio de cultivo, controlando a oxidação.

#### **2.4 Influência da luz no cultivo *in vitro***

A luz é um fator ambiental importante para as plantas clorofiladas, pois, a morfogênese pode ser controlada por esse fator, sendo denominada fotomorfogênese. Não apenas a morfologia e anatomia do vegetal estão

relacionadas à luz, mas a bioquímica das plantas também está sob sua influência (RIBEIRO et al., 2009).

Deste modo, o fotoperíodo, o fluxo de fótons e a qualidade de luz intereferem no cultivo *in vitro*, pois, o primeiro está relacionado à duração, o segundo à quantidade e o terceiro e último ao comprimento de onda dos espectros de luz sob a planta (RIBEIRO et al., 2009).

Dentre os espectros luminosos, existe um intervalo denominado de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) que através da absorção pelas plantas desencadeia a síntese de ATP, sacarose e realocação de nitrogênio, que influenciará no crescimento e desenvolvimento do vegetal cultivado *in vitro*. As diferentes condições luminosas podem elevar ou diminuir a eficácia da transferência e a absorção de energia capturada pelas plantas (FAGAN et al., 2013; SOUZA et al., 2011).

A compreensão de diferentes espectros luminosos no cultivo *in vitro* de plantas frutíferas e lenhosas ainda é escassa (ERIG; SCHUCH, 2005). Sendo usual na cultura de tecidos, o uso de luz fluorescente branca nas salas de crescimento (KIM et al., 2004).

As maiores porcentagens de energia consumidas nos laboratórios de cultura de tecidos são provenientes das lâmpadas fluorescentes brancas, que contribuem para elevar o custo final das mudas. Para reverter esse quadro, atualmente têm-se utilizado as lâmpadas de Diodos Emissores de Luz (LEDs), que proporcionam comprimento de onda específico e produzem menor quantidade de calor (ROCHA et al., 2010).

A utilização de lâmpadas LEDs vermelhas e azuis pode ser uma alternativa para o cultivo de plantas *in vitro*. Pois, sabe-se que as luzes vermelha e azul são absorvidas pela clorofila A, que é a responsável pela eficácia fotossintética. Separadamente, sabe-se que a contribuição da luz azul está em estimular a síntese proteica que auxilia no processo fotossintético, além de

contribuir para o desenvolvimento de cloroplastos. E a luz vermelha está envolvida no processo inibitório da exportação da sacarose para tecidos aclorofilados (SAEBO; KREKLING; APPELGREN, 1995; VICTORIO; KUSTER; LAGE, 2007).

Todavia, o tempo de exposição e a qualidade espectral da iluminação por lâmpadas LEDs são fatores relevantes para obter respostas morfogenéticas desejadas, contudo, os *feedbacks* a esses dois fatores variam entre as espécies. A qualidade de luz está relacionada à plasticidade fisiológica e anatômica da expansão foliar, além de síntese de pigmentos como os carotenoides (tipo e quantidade), enverdecimento em plantas cultivadas *in vitro*, expansão cotiledonar, alongamento de caule e florescimento (VICTORIO; KUSTER; LAGE, 2007; BRAGA et al., 2009).

A extrapolação do tempo necessário de exposição em lâmpadas LEDs, pode ser prejudicial para as plantas. Dentre os danos fisiológicos, estão o elevado grau de oxidação aumento de peróxidos ( $H_2O_2$ ) e a redução da totipotência celular (GUPTA; SAHOO, 2015).

Além da qualidade de luz, o fotoperíodo, também interfere no crescimento e desenvolvimento das espécies, tais como, floração, frutificação, quedas de folhas e germinação (CÂMARA et al., 1997; OMETTO, 1981).

A luz, na cultura de tecidos, permite a manipulação das condições de cultivo, que contribui com a otimização dos protocolos de micropropagação, tornando os tecidos melhores e reproduzíveis, contudo, ainda são necessários maiores estudos que reportem a qualidade de luz e o fotoperíodo no cultivo *in vitro* de plantas lenhosas do cerrado (BRAGA et al., 2009).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais.

#### 3.1 Material Vegetal

Os frutos maduros foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Lavras (21°13'35.6"S/ 44°58'59.0"W) durante o período de fevereiro a abril (2014), o material vegetal foi estabelecido *in vitro* a partir de sementes.

Os explantes (folhas) utilizados para o controle de oxidação e calogênese foram provenientes de plantas pré-estabelecidas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIG; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, o pH foi ajustado para 5,8.

#### 3.2 Assepsia dos frutos e das sementes para o estabelecimento *in vitro*

Após a coleta dos frutos que estavam ligados à planta mãe, esse material foi imerso em uma solução de água destilada e hipoclorito de sódio 50% (v/v) com 2% de cloro ativo, durante 20 minutos, passando por três lavagens com água destilada. Posteriormente, os frutos foram colocados para secar em câmara de fluxo laminar durante 30 minutos.

A mucilagem aderida às sementes foi extraída manualmente por atrito entre as sementes e a superfície de uma peneira (furos de 1 mm de diâmetro, dimensões de 280 X 15 mm), e com a lavagem em água corrente. Em seguida, foi realizado um processo de assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar. Para isso, as sementes foram submersas em álcool 70% durante 30 segundos e

posteriormente imersas em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 20 minutos sob agitação constante e, em seguida, lavadas por três vezes em água destilada e estéril (SANT'ANA, 2014).

### **3.3 Germinação *in vitro***

Após a assepsia, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com 15 mL meio MS (MURASHIG; SKOOG, 1962), contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8. O meio foi suplementado com ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) nas concentrações de 0; 2; 8; 32 e 128 µM. O meio foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes, foram mantidos na ausência de luz, em sala de crescimento a uma temperatura de 25±2°C. Aos 90 dias, foram avaliados a porcentagem de germinação (%), comprimento da parte aérea (mm) e comprimento de raiz (mm).

### **3.4 Indução de brotações em casaqueira**

#### **3.4.1 Indução de brotos a partir de diferentes fontes de citocininas**

Segmentos caulinares de plantas estabelecidas *in vitro*, tiveram suas folhas excisadas, medindo 10 mm de comprimento e contendo duas gemas laterais, foram inoculados em meio MS (contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar) com diferentes citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP), 6-benziladenina (BA) ou thiadizuron (TDZ), nas concentrações de 0; 2,25; 4,5 e 9,0 µM. O meio teve o pH ajustado para 5,8 e foi posteriormente autoclavado a 121°C por 20 minutos. Após a inoculação os explantes, foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25°C, fotoperíodos de 16 horas e 36 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (DFFA). As avaliações foram feitas

aos 30, 60 e 90 dias, no qual avaliou-se o número de brotos e de gemas e o comprimento médio dos brotos (mm).

### **3.4.2 Qualidade de luz na indução de brotos em casaqueira**

Brotações com tamanho inicial de 30 mm de comprimento e contendo a gema apical foram inoculadas em meio MS contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 1 µM de BAP, BA ou TDZ. Após a inoculação das brotações, os tubos foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, sendo as fontes luminosas a luz branca fluorescente convencional (20W) com o valor de 44 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> para a DFFA e lâmpadas de diodos emissores de luz (LEDs) vermelho-azul (70: 30), com um valor de 98 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> para a DFFA. A DFFA, aferidas pelo quantômetro (modelo LI6400 XT- Li-Cor).

Após 90 dias, foram avaliados número de brotos, comprimento dos brotos superiores a 3 mm, números de folhas e de gemas.

### **3.4.3 Indução de brotações em diferentes fotoperíodos**

Segmentos nodais, com aproximadamente 5 mm de comprimento com duas gemas axilares e com ápice caulinar excisado, foram inoculados em meio MS suplementado com 4,5 µM de BAP, 0,4 g L<sup>-1</sup> de PVP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 e posteriormente autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob diferentes fotoperíodos (8, 12 e 16 horas) em temperatura de 25±2°C, e a DFFA aferida foi de 36 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpada branca fluorescente (20W).

Foram avaliados: número de brotos, comprimento dos brotos maiores que 3 (mm), número de gemas e folhas e sobrevivência (%) dos explantes durante os 30, 60 e 90 dias após a inoculação.

### **3.5 Alongamento *in vitro* de brotações de casaqueira utilizando o GA<sub>3</sub>**

Brotos provenientes de plantas pré-estabelecidas *in vitro*, com 15 mm de comprimento, foram inoculados em meio MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, 400 µM L<sup>-1</sup> de PVP e diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µM). Após a inoculação dos explantes, eles foram mantidos durante 30 dias em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 36 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> fornecida por luz branca. Após 30 dias, foram avaliados o comprimento dos brotos (mm) e o número de folhas das plantas após o uso do regulador de crescimento.

### **3.6 Controle da oxidação em folhas de casaqueira**

Explantes foliares jovens de aproximadamente 50 mm<sup>2</sup> da casaqueira (*C.rufa*) tiveram as laterais e o ápice do limbo foliar excisados, com três cortes transversais sobre a nervura principal para aumentar o contato com o meio de cultivo. Após o preparo dos explantes, eles foram inoculados em meio MS suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e diferentes concentrações de polivinilpirrolidona (PVP) (0; 100; 200; 400 e 800 µM L<sup>-1</sup>). Esse meio de cultivo teve o pH ajustado para 5.8 e foi esterilizado por processo de autoclavagem a 121°C por vinte minutos.

Os explantes foram mantidos durante 30 dias em sala de crescimento com temperatura de 25°C sob fotoperíodo de 16h com irradiância de 36 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Foi avaliada a porcentagem de oxidação (%) sob a área foliar a partir de uma

escala para diferentes níveis de oxidação (0, 25, 50 e 100%) conforme a Figura 1. Sendo (0%) ausência de oxidação no limbo foliar, (25%) laterais do limbo oxidadas, (50%) laterais e metade do limbo oxidado e (100%) limbo completamente oxidado.

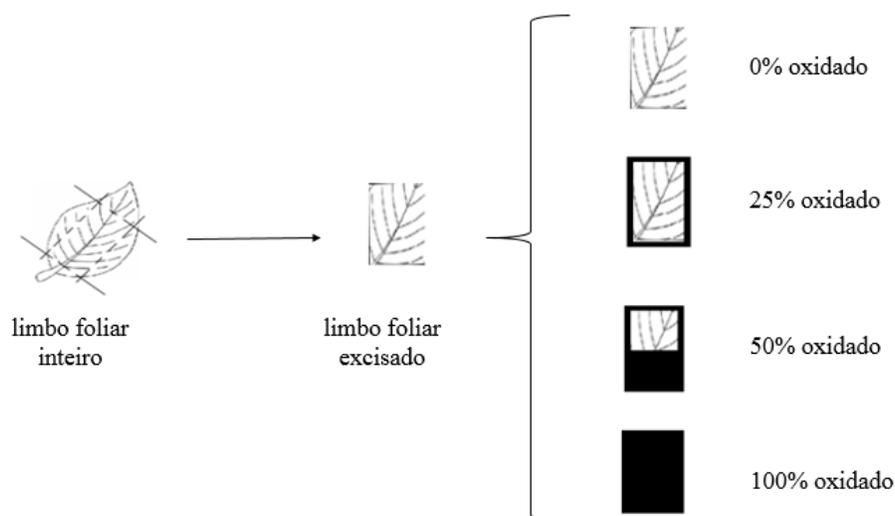


Figura 1 Escala dos níveis de oxidação em folhas de casaqueira. (0%) ausência de oxidação no limbo foliar, (25%) laterais do limbo oxidadas, (50%) metade do limbo oxidado e (100%) limbo completamente oxidado.

### 3.7 Indução de Calos

Explantos foliares jovens de aproximadamente 50 mm<sup>2</sup> de área foliar foram excisados em suas laterais e ápice do limbo foliar, com três cortes transversais sobre a nervura principal para aumentar o contato com o meio de cultivo. Após o preparo dos explantes, eles foram inoculados com a porção abaxial em contato com o meio de cultivo. E o meio de cultivo utilizado foi o MS suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,4 g L<sup>-1</sup> de PVP e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e diferentes concentrações (0; 0,1; 1,0; 5,0 ou 10 µM) de ácido 2,4-dicloro-

fenoxiacético (2,4-D).

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento durante 30 dias na ausência de luz, sob condições controladas (25°C, 70% de umidade relativa do ar), na ausência de fontes luminosas. Após esse período, avaliou-se a porcentagem de formação de calos nos explantes (%).

### **3.8 Análises estatísticas**

Os experimentos foram compostos por quatro repetições, em cada repetição havia cinco tubos de ensaio, contendo um explante por tubo. Seguiu-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC).

Para a análise estatística, aplicou-se ANAVA, sendo que para os dados quantitativos foi realizada regressão e para os qualitativos Scott-Knott,  $p < 0,05$ , utilizando o *software* SISVAR® (FERREIRA, 2014).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 Germinação *in vitro***

No experimento de germinação, a aplicação do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) em diferentes concentrações (0; 2; 8; 32 e 128 µM) no meio de cultivo combinado a ausência de luz, após 90 dias, não promoveu diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas. Desta forma, apenas 14% dos embriões germinaram no escuro, independente da concentração de GA<sub>3</sub> utilizada. O comprimento da parte aérea das plântulas teve uma média de 37,9 mm e do sistema radicular, 35,3 mm.

Estudos anteriores realizados com as sementes de casaqueira utilizaram ácido giberélico e luz branca, sobre a mesma temperatura de 25°C ±2, para a germinação da espécie *in vitro*, e os resultados obtidos mostraram-se superiores

ao presente estudo, sendo a média do percentual de germinação de 68% (SANT'ANA, 2014).

Outros estudos realizados com duas espécies do mesmo gênero da casaqueira, *Campomanesia guazumifolia* e *Campomanesia xanthocarpa*, evidenciaram que em *C. guazumifolia* não ocorre germinação no escuro, portanto, é definida como fotoblástica positiva. E a outra espécie, a *C. xanthocarpa* independente da presença ou ausência de luz no ambiente, os embriões germinam. Desta forma, o autor sugeriu que a preferência por ambiente iluminado para a ocorrência da germinação, assim como foi observado em embriões da espécie *C. guazumifolia*, ocorre devido a algumas espécies do gênero serem pioneiras. As plantas pioneiras naturalmente ocorrem em ambientes abertos ou em bordas de manchas de vegetação, que conseqüentemente recebem elevada quantidade de radiação luminosa, portanto, são adaptadas a este ambiente (SANTOS et al., 2004).

Entretanto, não apenas a *C. xanthocarpa*, mas outras espécies do gênero como a *C. guazumifolia* e até da família das gabiobas, como o *Psidium guineense* Swart (*P. guineense*), também se comportam indiferentes à iluminação no processo fisiológico da germinação (ARRIGONI-BLANK; 1997; BARBOSA et al., 2014). O Araçá (*P. guineense*) apresentou resultados semelhantes ao da casaqueira quando suas sementes foram submetidas a condições de ausência de luz, com germinação inferior a 20% (BARBOSA et al., 2014).

A germinação pelas sementes é de extrema importância, pois, através desse método é possível obter variabilidade genética e procedência fitossanitária dos vegetais, quando eles são cultivados *in vitro*. Sendo assim, posteriores estudos podem ser realizados para desenvolver protocolos que sejam eficientes e reproduzíveis, para a obtenção de plantas através da germinação.

## 4.2 Indução de brotos a partir de diferentes fontes de citocininas

Ao utilizar diferentes citocininas e concentrações na multiplicação *in vitro* da Casaqueira, foi observado que houve diferença significativa para o número de brotos, tanto para a interação (tempo e citocinina) quanto (concentração e citocinina) pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Na interação tempo e citocinina, o BAP apresentou as maiores médias de números de brotos, nas três avaliações consecutivas, ou seja, aos 30, 60 e 90 dias, e as médias foram: (1,3), (2,4) e (4,0), respectivamente. O BAP sobressaiu entre as demais citocininas (BA e TDZ) (Figura 2).

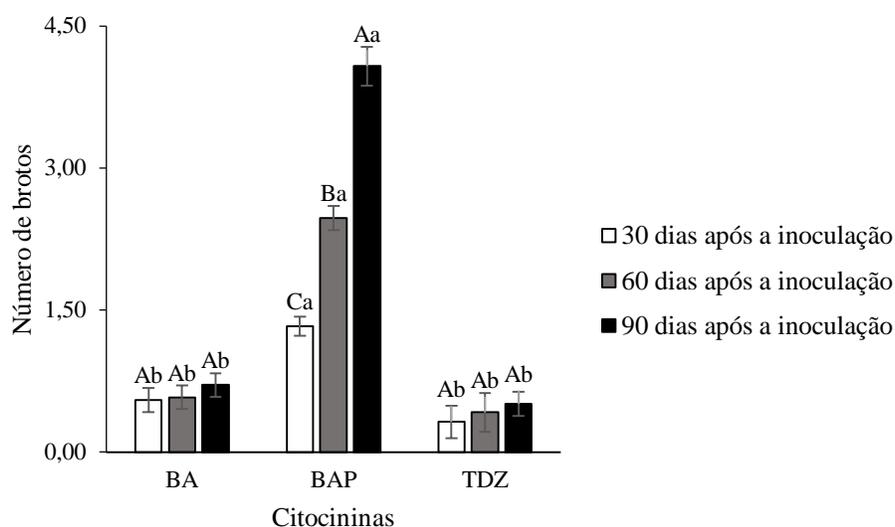


Figura 2 Número de brotos induzidos a partir de segmentos nodais de casaqueira em diferentes tempos após a inoculação (30, 60 e 90 dias), letras maiúsculas comparam os diferentes tempos dentro de cada citocinina e letras minúsculas comparam as diferentes citocininas em cada tempo. As letras maiúsculas idênticas dentro de cada citocinina e minúsculas idênticas dentro de cada tempo, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a um nível de 5% de probabilidade.

Na interação concentração e citocinina, ao se observar a curva de regressão correspondente ao regulador BAP, notou-se um comportamento

quadrático que atingiu o ponto máximo de número de brotos (4,2) na concentração de 5,6 $\mu$ M. As médias de números de brotos para o regulador BAP se sobressaíram sobre as médias dos demais reguladores de crescimento (BA e TDZ), mesmo com esses dois últimos reguladores também tendo suas respectivas curvas de regressão quadráticas (Figura 3).

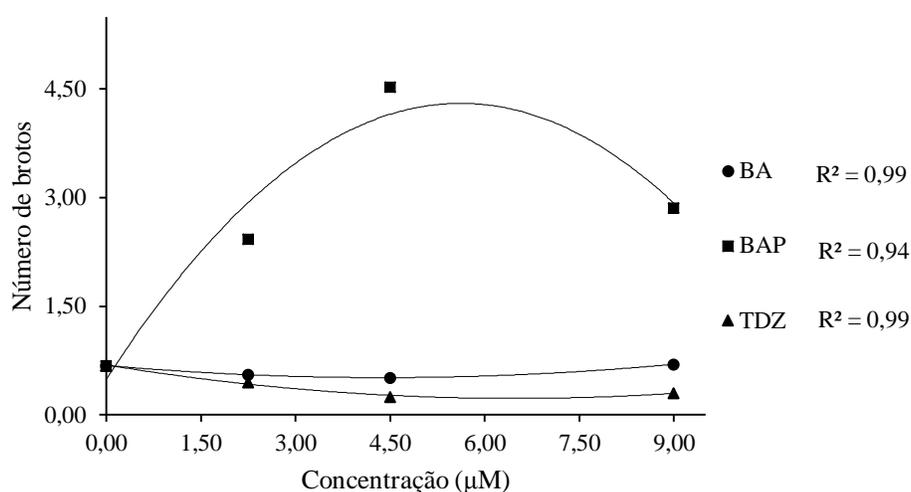


Figura 3 Número de brotos induzidos a partir de segmentos nodais de casaqueira, quando se utilizou diferentes concentrações (0; 2,25; 4,5 e 9,0 $\mu$ M) de BA, BAP ou TDZ. Equações das linhas de tendência: BA:  $y = 0,008455x^2 - 0,074579x + 0,685606$ ; BAP:  $y = -0,120688x^2 + 1,356734x + 0,4946$  TDZ:  $y = 0,011149x^2 - 0,144343x + 0,692879$ .

Na família Myrtaceae, há uma divergência de respostas na indução de brotação, ao se utilizar a citocinina BAP. Em Goiabeira (*Psidium guajava* L.), por exemplo, em concentrações inferiores a 1  $\mu$ M de BAP, houve indução de brotos (RAI et al., 2009). Entretanto, em Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) a concentração de 5  $\mu$ M de BAP formou o maior número de brotos (2,3) por explante, apresentando um comportamento semelhante ao da casaqueira na concentração de 4,5  $\mu$ M desse mesmo regulador de crescimento (SOUZA et al.,

2008) (Figura 4).

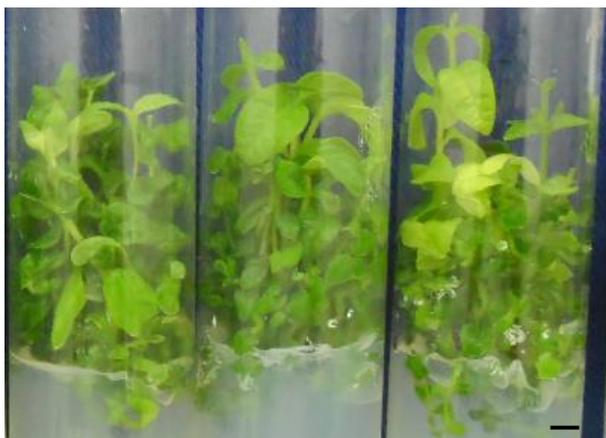


Figura 4 Brotos induzidos a partir de segmento nodal de casaqueira, utilizando 4,5  $\mu\text{M}$  de BAP. Barra = 1 cm.

Contudo, o uso de BAP na multiplicação de plantas da família Myrtaceae é indicado, pois, em uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.), guabijuzeiro (*Myrciantes punges* O. Berg) e eucalipto (*Eucalyptus grandis* W. Hill) esse regulador promoveu uma expressiva indução de brotos, favorecendo a propagação via assexuada (ANDRADE et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

As citocinas BA e TDZ induziram uma quantidade inferior de brotos quando comparadas ao BAP, sendo assim, esta última citocinina é recomendada para multiplicação de casaqueira. O TDZ promoveu formações de microbrotos, cujo comprimento foi inferior a 3 mm (Figura 5).

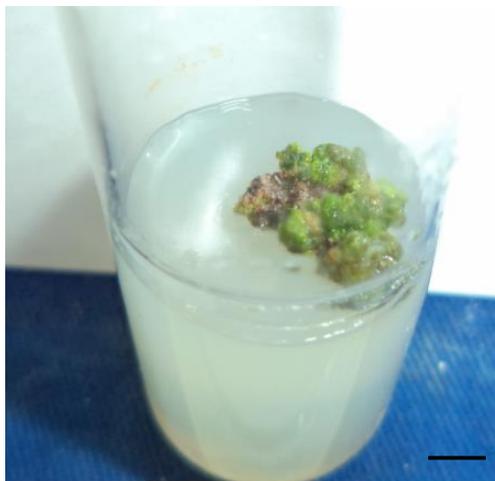


Figura 5 Microbrots (comprimento inferior a 3 mm) em segmento nodal de casaqueira na concentração de 2,25  $\mu\text{M}$  de TDZ. Barra: 1 cm

Em um estudo realizado com *Withania somnifera* L., aplicou-se diferentes concentrações de TDZ para a multiplicação *in vitro* dessa espécie, e as maiores médias para o número de brotos se manteve nas concentrações inferiores a 1  $\mu\text{M}$  (FÁTIMA; ANIS, 2011). Por conseguinte, o que pode ter influenciado a baixa quantidade de número de brotos na casaqueira quando se utilizou o TDZ, foram as concentrações elevadas desse regulador no meio de cultura. Na literatura, as descrições para aplicações de TDZ na multiplicação de plantas lenhosas são consideradas vestigiais, ou seja, inferiores a 1  $\mu\text{M}$  (SAN et al., 2014).

As citocininas BA e o BAP são considerados, por alguns pesquisadores, como substâncias semelhantes, pois, as substâncias derivam da adenina e possuem o mesmo peso molecular, contudo, existe uma diferença na nomenclatura (SILVA, 2012).

Neste estudo, com a casaqueira, os derivados da adenina apresentaram resultados discrepantes, o BAP foi o regulador que apresentou os melhores resultados na multiplicação *in vitro* em comparação ao BA. Todavia, isto pode ter ocorrido devido ao grau de pureza diferente entre esses reguladores de

crescimento, sendo o BA (95% 3-benziladenina) e o BAP (99% de benzilamina-6-purina).

Para o número de gemas axilares, foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Assim como para número de brotos, houve interação entre citocinina e concentração. A partir das análises de regressão realizadas foi constatado que as três citocininas comportaram-se quadraticamente, porém, o BAP, apresentou a maior média (3,5) em número de gemas axilares na concentração de 9,0  $\mu\text{M}$ . As médias da citocinina BA se sobressaíram sobre as médias do TDZ para gemas axilares (Figura 6).

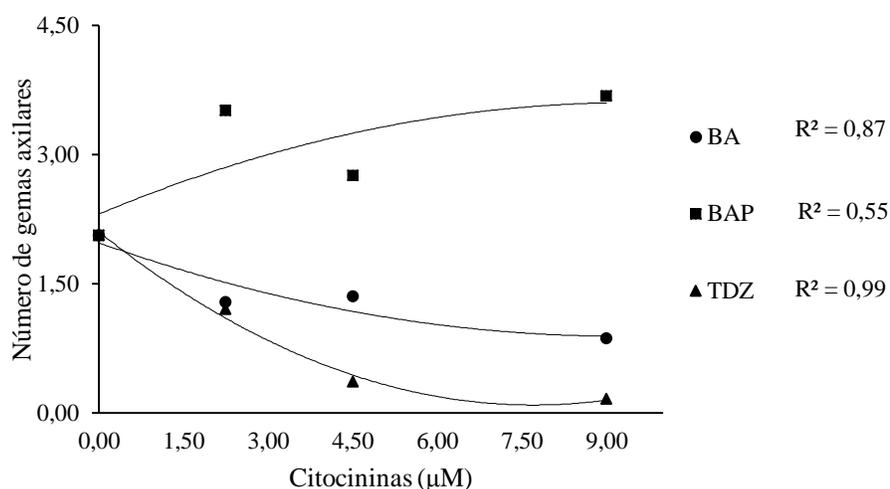


Figura 6 Número de gemas axilares, quando se utilizou diferentes citocininas (BA, BAP e TDZ) e concentrações (0; 2,25; 4,5 e 9,0 $\mu\text{M}$ ). Equações das linhas de tendência: BA:  $y = 0,0126x^2 - 0,2336x + 1,9733$ ; BAP:  $y = -0,0145x^2 + 0,2734x + 2,3076$ ; TDZ:  $y = 0,0338x^2 - 0,5215x + 2,0987$ .

Ao analisar a variável comprimento dos brotos, notou-se uma dupla interação entre os fatores, citocinina e concentração. As curvas de regressão ajustaram-se ao modelo quadrático para o BA e o BAP, porém, apresentou-se linear para o regulador TDZ. E a maior média do comprimento dos brotos

(7,7mm) foi obtida quando se aplicou BAP no meio de cultivo na concentração de 4,3 $\mu$ M (Figura 7).

Na Figura 7, constatou-se que o uso de BA e TDZ, em meio de cultivo para a casaqueira, proporcionou uma redução no comprimento dos brotos, indicando uma diminuição na biomassa dos explantes. Elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o número de brotos e o alongamento caulinar. Na literatura é reportada a toxicidade a elevadas concentrações de citocinina ao meio de cultura, principalmente daquelas citocininas que não são derivadas da adenina, assim como o TDZ que pertence ao grupo das fenilureias, portanto, como anteriormente descrito, recomenda-se utilizar concentrações inferiores a 1  $\mu$ M (FLORES et al., 2009; GEROGÉ et al., 2008).

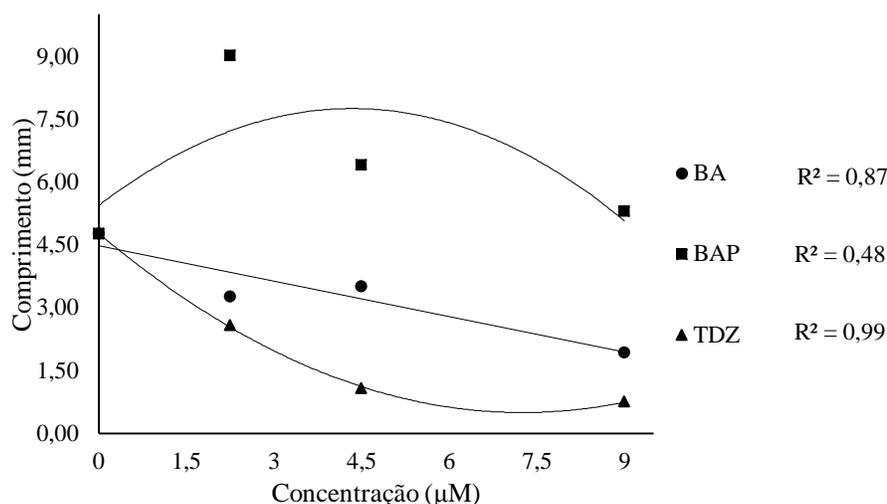


Figura 7 Comprimento das brotações, quando se utilizou diferentes citocininas (BA, BAP e TDZ) e concentrações (0; 2,25; 4,5 e 9,0 $\mu$ M). Equações das linhas de tendência: BA:  $y = -0,2822x + 4,476$ ; BAP:  $y = -0,1231x^2 + 1,0681x + 5,4336$  e TDZ:  $y = 0,0813x^2 - 1,1798x + 4,7772$ .

As citocininas são largamente utilizadas na etapa de multiplicação do cultivo *in vitro*, pois, induzem a divisão celular, sintetizam proteínas e atuam na

extensibilidade da parede celular, desta forma, contribuem para o aumento da indução de brotos. Isso é possível devido à quebra da dominância apical, que possibilita a expansão em número de brotos e de gemas axilares (MANTOVANI et al., 2001; ONO et al., 2004).

Portanto, a aplicação da citocinina BAP ao meio de cultivo MS, é recomendável para a multiplicação de casaqueira, obtendo-se assim maior número de brotos e gemas, e comprimento dos brotos (mm).

#### **4.3 Qualidade de luz na indução de brotos em Casaqueira**

Para os resultados encontrados, não foi observado interação entre qualidade de luz e tipos de citocininas. Somente tipo de citocininas, isoladamente, apresentou resultado significativo para todas as características avaliadas.

Conforme a Figura 8, os reguladores (TDZ e BAP) apresentaram maior número de brotos quando submetidos à iluminação com luz branca convencional (fluorescente), porém, quando a fonte de iluminação foram as lâmpadas LEDs, o BAP apresentou maior formação de brotos (4,9).

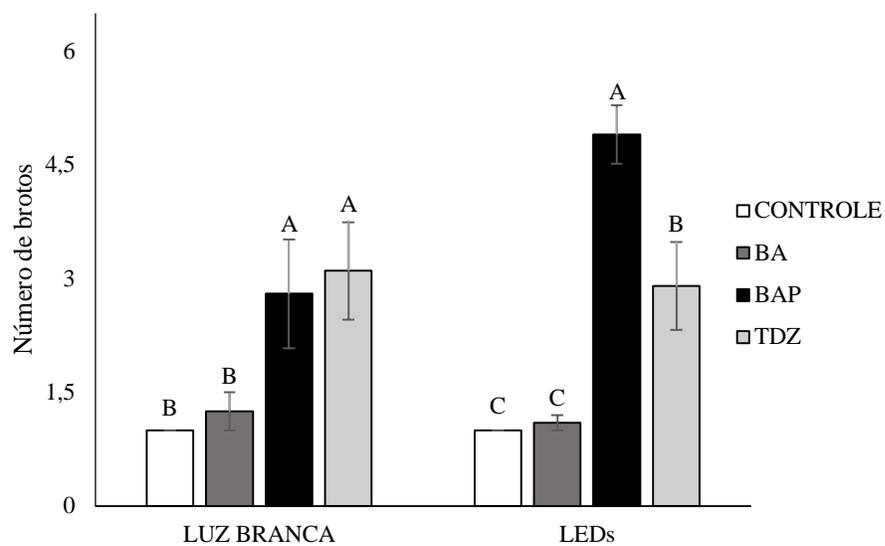


Figura 8 Número de brotos em casaqueira, sob diferentes fontes de luz (luz branca convencional- fluorescente e LEDs), Meio MS + 1 $\mu$ M (BA, BAP ou TDZ). Letras iguais dentro de cada fonte de luz (luz branca e leds), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para o número de gemas, a luz branca convencional associada ao tratamento com 1  $\mu$ M de BAP, resultou em maiores números de gemas axilares, sendo a média desse tratamento equivalente a 7,4 gemas/explantes (Figura 9).

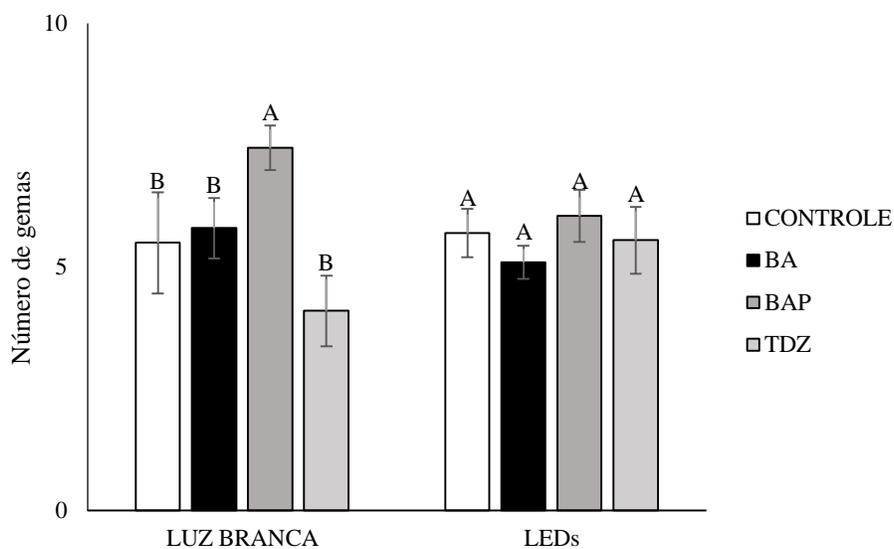


Figura 9 Número de gemas em caseira, sob diferentes fontes de luz (luz branca convencional fluorescente e LEDs), submetido ao meio MS + 1 $\mu$ M (BA, BAP ou TDZ). Letras iguais dentro de cada fonte de luz (luz branca e leds), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para o número de folhas, constatou-se as maiores médias (9,5) quando os explantes foram cultivados em meio suplementado com BAP sob luz branca. O BAP tem sido amplamente utilizado no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, devido a sua eficiência na indução de gemas adventícias e folhas (MOURA et al., 2001). No LED não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 10).

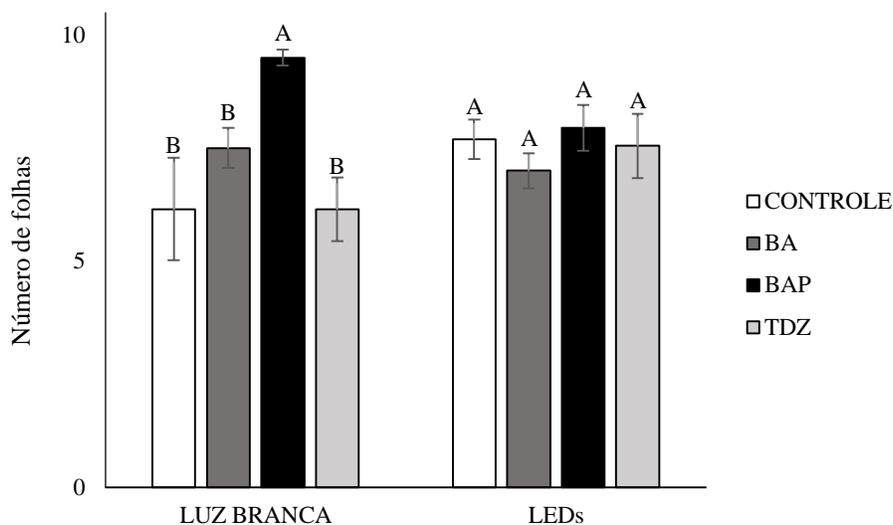


Figura 10 Número de folhas em casaqueira, sob diferentes fontes de luz (luz branca convencional fluorescente e LEDs), Meio MS + 1 $\mu$ M (BA, BAP ou TDZ). Letras iguais dentro de cada fonte de luz (luz branca e leds), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para a variável comprimento dos brotos, não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos. Sendo que os brotos apresentaram uma média de 22,13 mm. Estudos realizados com outra frutífera lenhosa, Amoreira-preta (*Rubus sp*), cultivada sob diferentes qualidades de luz apresentaram resultados semelhantes aos observados para a casaqueira. Neste estudo, não foi observado diferença significativa entre as lâmpadas leds e a luz branca (fluorescente) para o comprimento das plantas (ROCHA et al., 2013).

#### 4.4 Indução de brotações em diferentes fotoperíodos

Os resultados apresentaram interação tempo e fotoperíodo na indução de brotos em casaqueira. Inicialmente, aos 30 dias, não observou-se diferença significativa para a indução de brotação em todos os fotoperíodos. Nas avaliações

realizada aos 60 e 90 dias, os fotoperíodos de 8 e 12 horas apresentaram maiores médias de número de brotos (6,3 e 5,3 brotos aos 60 dias e 7,3 e 5,4 brotos aos 90 dias) (Tabela 1). Portanto, podemos afirmar que os fotoperíodos curtos (8 e 12 horas) são os melhores para induzir brotos, a partir dos segmentos nodais.

Tabela 1 Número de brotos (média  $\pm$  erro padrão) em diferentes fotoperíodos e tempos. UFLA. Lavras, 2015.

FOTOPERÍODO (HORAS)	TEMPO (DIAS)		
	30	60	90
8	2,50 $\pm$ 0,54 Ba	6,35 $\pm$ 1,28 Aa	7,30 $\pm$ 0,46 Aa
12	2,35 $\pm$ 0,80 Ba	5,35 $\pm$ 1,47 Aa	5,40 $\pm$ 0,09 Aa
16	1,10 $\pm$ 0,75 Aa	1,25 $\pm$ 0,59 Ab	0,80 $\pm$ 0,38 Ab

\*Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas e as maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Para a variável número de gemas, houve diferença significativa para a interação entre as variáveis tempo e fotoperíodo. Ao analisar o desdobramento aos 30 dias, constatou-se que os fotoperíodos de 8 e 12 horas apresentaram maior número de gemas. Aos 60 dias, o fotoperíodo de 12 horas apresentou a maior média para número de gemas (9,7) por explante, porém aos 90 dias, observou-se no fotoperíodo de 8 horas a maior média de número de gemas (7,6) (Tabela 2).

Tabela 2 Número de gemas (média  $\pm$  erro padrão) em diferentes fotoperíodos e tempos .  
UFLA. Lavras, 2015.

FOTOPERÍODO (HORAS)	TEMPO (DIAS)		
	30	60	90
8	5,60 $\pm$ 0,29 Ba	7,90 $\pm$ 0,69 Ab	7,60 $\pm$ 0,69 Aa
12	6,05 $\pm$ 0,55 Ba	9,75 $\pm$ 0,91 Aa	3,05 $\pm$ 0,27 Cb
16	2,10 $\pm$ 0,21 Ab	2,10 $\pm$ 0,85 Ac	1,05 $\pm$ 0,37 Ac

\* Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas e as maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Ao analisar e relacionar número de brotos e gemas, averigou-se que no fotoperíodo de 12 horas, o número de brotos não apresentou diferença significativa dos 60 para os 90 dias, contudo, o número de gemas sofreu uma redução de 9,7 para 3,0 gemas/explante. A média do número de brotos não variou devido ao surgimento de novos brotos, contudo, esses novos brotos continham número de gemas inferiores aos que senesceram. Desta forma, é aconselhável aos 60 dias realizar um subcultivo dos explantes, devido à presença de senescência nas plantas, relacionada à escassez de nutrientes no meio de cultivo e também pela presença de compostos fenólicos, ocasionando a oxidação (SANTOS et al., 2012).

Para a variável comprimento dos brotos, não foi observada diferença significativa. Para o número de folhas, aos 30 dias não houve diferença significativa entre os fotoperíodos inferiores a 16 horas. Na avaliação realizada aos 60 dias, o fotoperíodo de 12 horas apresentou a maior média (11,5) folhas/explante, mas, aos 90 dias a média para esta variável diminuiu, devido à senescência de algumas folhas. Assim, no fotoperíodo de 8 horas averigou-se a maior média (8,1) entre os demais fotoperíodos (Tabela 3).

Tabela 3 Número de folhas (média  $\pm$  erro padrão) em diferentes fotoperíodos e tempos. UFLA. Lavras, 2015.

FOTOPERÍODO (HORAS)	TEMPO (DIAS)		
	30	60	90
8	5,15 $\pm$ 0,45 Ba	8,60 $\pm$ 1,19 Ab	8,15 $\pm$ 0,57 Aa
12	5,90 $\pm$ 0,65 Ba	11,55 $\pm$ 1,47 Aa	6,30 $\pm$ 0,10 Cb
16	2,65 $\pm$ 0,96 Ab	2,70 $\pm$ 0,50 Ac	2,40 $\pm$ 0,85 Ac

\* Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas e as maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Moreira et al. (1999), ao verificarem como as condições fotoperiódicas interferiam no desenvolvimento da *Gomphrena macrocephala* A.St.-Hil., constataram que no fotoperíodo de 12 horas a média do número de folhas foi maior, e destacou-se entre os fotoperíodos de 8 e 16 horas. Neste mesmo estudo com *Gomphrena macrocephala*, os autores justificam que a maior produção de folhas pela planta pode ser em decorrência do fotoperíodo de 12 horas estar dentro da faixa natural de variação do fotoperíodo (10,5-13,5 horas) do estado de São Paulo onde foram coletadas as sementes.

Embora os laboratórios de cultura de tecidos utilizem de forma recorrente fotoperíodos na faixa de 12 a 16 horas, neste experimento, verificou-se que o fotoperíodo de 8 horas, é uma alternativa viável morfogeneticamente e economicamente para a espécie *Campomanesia rufa*. Isto porque neste menor fotoperíodo, houve elevado número de brotos com um consumo menor de energia elétrica (GRATTAPAGLIA et al., 1998).

Um menor tempo de exposição à radiação fotossinteticamente ativa, contribuiu para diminuir a foto-oxidação e fotoinibição, protegendo os pigmentos essenciais para as plantas que realizam a fotossíntese (clorofilas), além de proteger o fotossistema II (PSII) da fotoinibição, que contribuiu para diminuir a taxa de fotossíntese realizada pelo vegetal (STREIT et al., 2005).

Desta forma, pode-se concluir que aos 30, 60 e 90 dias, para a variável número de brotos, os melhores fotoperíodos foram os de 8 e 12 horas. Para o número de gemas, o fotoperíodo de 12 horas foi ideal até aos 60 dias, ao exceder esse tempo houve uma queda na média de gemas, o que vale ressaltar, a importância do subcultivo nesta fase, pois, nota-se oxidação e a senescência de alguns explantes. Aos 90 dias, apenas o fotoperíodo de 8 horas manteve sua média alta de número de gemas e não diferiu significativamente da avaliação dos 60 dias.

Para o número de folhas, o fotoperíodo de 12 horas foi o que apresentou as maiores médias até aos 60 dias, após esse período, inicia sucessivos eventos de abscisão foliar e aos 90 dias há uma queda de quase 50% na média de número de folhas. Sendo assim, esta variável reforça a importância do subcultivo aos 60 dias. O fotoperíodo de 8 horas também obteve médias superiores ao fotoperíodo de 16 horas, contudo para o número de folhas foi inferior ao de 12 horas até aos 60 dias, mas aos 90 dias teve a maior média dentre os demais tratamentos.

Portanto, os fotoperíodos inferiores a 16 horas, tiveram as maiores médias, por conseguinte, produziram maior biomassa com relação ao fotoperíodo de 16 horas propriamente dito. Desta forma, os fotoperíodos de 8 e 12 horas são viáveis para a multiplicação *in vitro* da casaqueira, tanto pela produção de biomassa, quanto pela economia de energia que é um dos percalços responsáveis pelo elevado custo de mudas provenientes de micropropagação.

#### **4.5 Alongamento *in vitro* de casaqueira utilizando o GA<sub>3</sub>**

Os brotos da casaqueira inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ácido giberélico apresentaram um alongamento significativo ( $p < 0,05$ ) aos 30 dias. O alongamento da casaqueira comportou-se de forma linear crescente a partir da concentração de 2,25  $\mu\text{M}$  à medida que se

aumentou a concentração de GA<sub>3</sub>, sendo o tratamento superior de 8 μM (Figura 11).

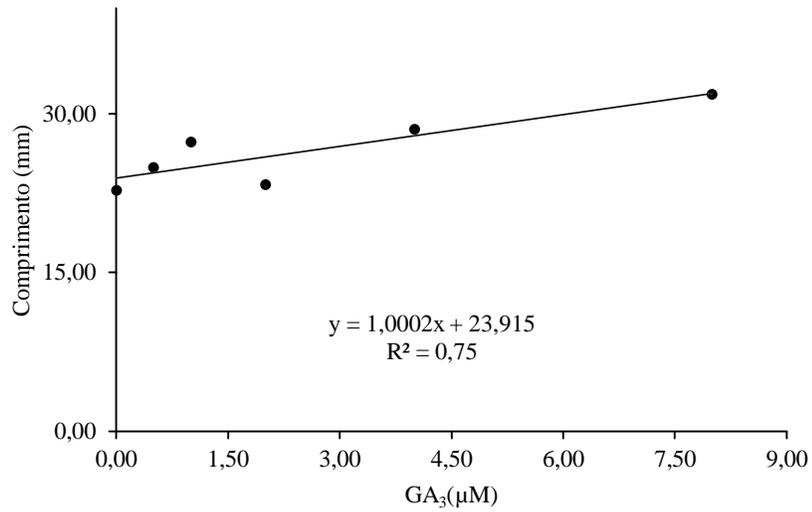


Figura 11 Alongamento em brotos de casaqueira em diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>.

Para o número de folhas, não houve diferença significativa entre os tratamentos com as diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>, a média geral para essa análise foi 6,2 folhas por explante (Figura 12).

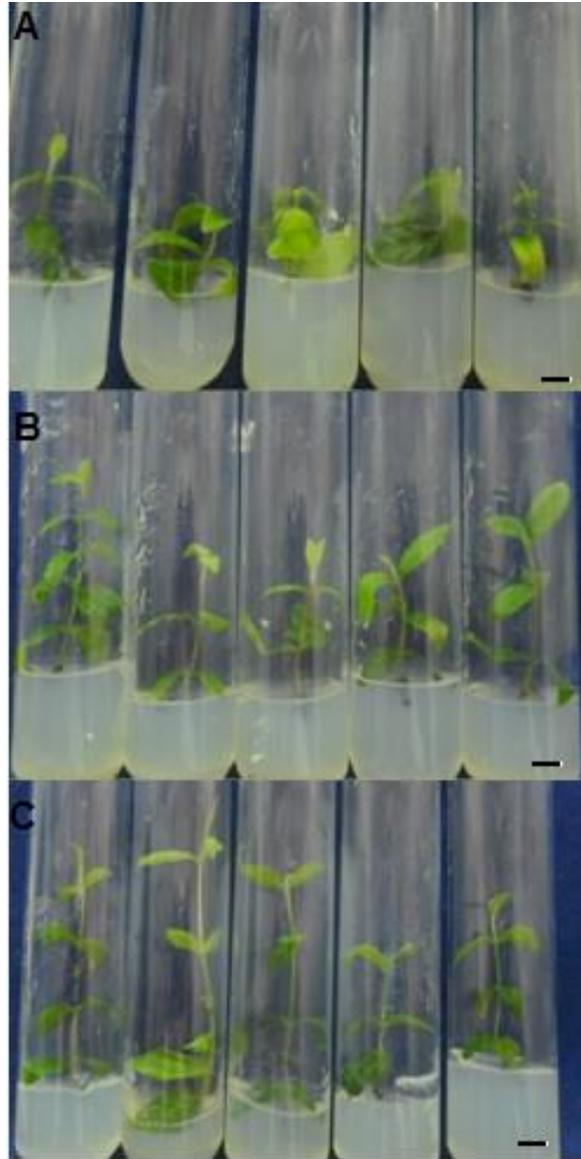


Figura 12 Brotações de casaqueira aos 30 dias, (A) sem a suplementação de GA<sub>3</sub>, (B) com a suplementação de 4 μM de GA<sub>3</sub>, (C) 8 μM de GA<sub>3</sub>. Barra: 1 cm.

Resultados semelhantes ao da casaqueira foram observados num estudo com abacaxi (*Ananas comosus* L.), conforme Dias et al. (2011), trabalhando com

alongamento utilizando o GA<sub>3</sub> observaram que este regulador aumentou significativamente o comprimento da parte aérea dos explantes até a concentração máxima de 5,7 µM. Da mesma forma, Gao et al. (2010), ao realizarem um experimento com a couve-nabiça (*Brassica napus*), na concentração de 1µM de GA<sub>3</sub>, obtiveram um aumento expressivo do comprimento do caule.

Por meio dos resultados constatou-se que a casaqueira teve seu caule alongado ao aplicar o ácido giberélico no meio de cultivo, e passou por alterações na sua arquitetura, pois, apresentou maior distância entre os entrenós e folhas expandidas na maior concentração de GA<sub>3</sub>.

#### 4.6 Controle de Oxidação em folhas de casaqueira

Os explantes foliares da casaqueira inoculados em meio MS acrescido de PVP apresentaram menor porcentagem de oxidação (27,3%) no ponto mínimo equivalente a 584,3 µM de PVP (Figura 13).

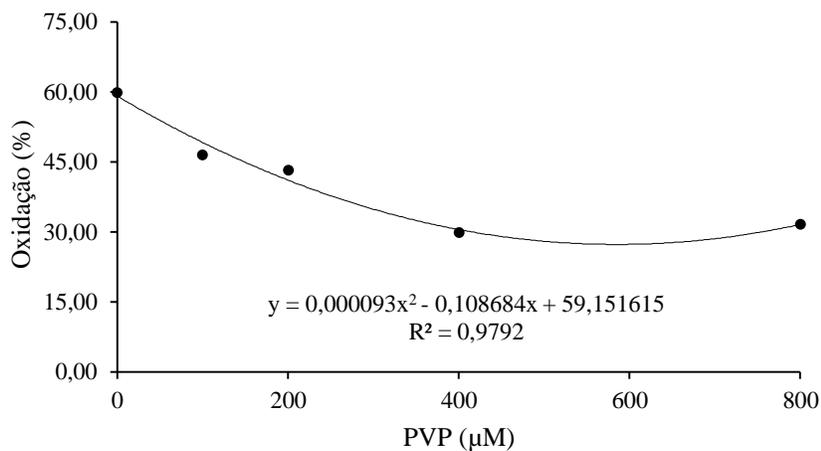


Figura 13 Porcentagem de oxidação em explante foliar de casaqueira em diferentes concentrações de PVP.

Ao inocular o explante no meio de cultivo desprovido de antioxidante, notou-se que 60% da área foliar apresentaram oxidação (Figura 3A). No tratamento no qual o meio de cultivo foi suplementado com 400  $\mu\text{M}$  de PVP, notou-se maior controle da oxidação (Figura 14).

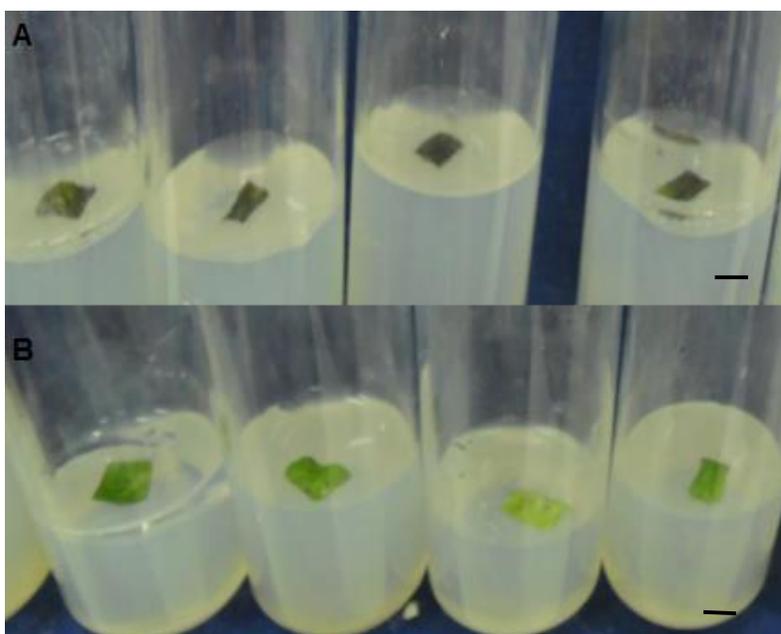


Figura 14 (A) Explantes foliares de casaqueira em meio de cultivo sem antioxidante (B) meio de cultivo com 400  $\mu\text{M L}^{-1}$  de PVP. Barra: 1 cm.

Estudos realizados sobre a aplicação do PVP em meio de cultura, no intuito de controlar a oxidação de espécies lenhosas *in vitro*, corroboram com os resultados da casaqueira. De acordo com Augusto (2001), ao se utilizar 1 e 2  $\text{g L}^{-1}$  de PVP no controle de oxidação de amoreira-preta (*Rubus sp*) tem-se resultados significativos de até 80% de controle de oxidação.

Do mesmo modo, Costa et al. (2007), ao estabelecerem o cultivo *in vitro* de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), testaram o composto antioxidante (carvão ativado e PVP) na tentativa de controlar a taxa de oxidação dos explantes da

espécie. Contudo, não houve diferença significativa entre ambos os antioxidantes, e a porcentagem de oxidação para  $2 \text{ g L}^{-1}$  de PVP foi de 3,2%.

Por conseguinte, o uso do PVP é eficiente no controle da oxidação de explantes foliares da casaqueira na concentração de  $584,3 \text{ } \mu\text{M}$ .

#### 4.7 Calogênese

Na calogênese, houve diferença significativa para a porcentagem de formação de calos entre as diferentes concentrações de 2,4-D. A concentração de  $10 \text{ } \mu\text{M}$  de 2,4-D foi a que apresentou maior porcentagem de calos (58,7%) (Figura 15).

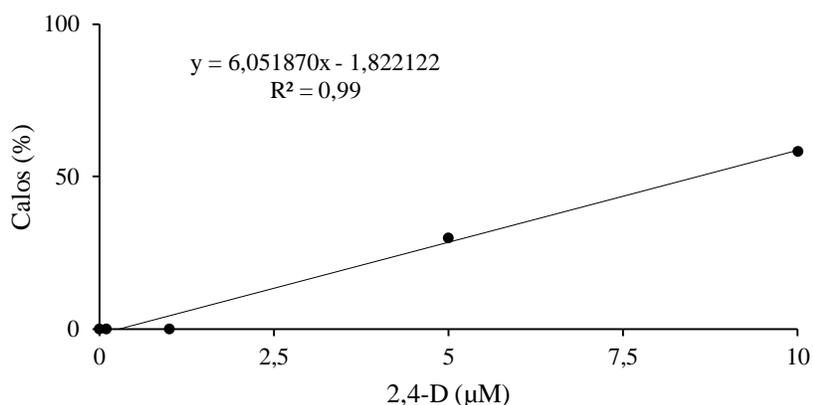


Figura 15 Porcentagem de calos de casaqueira formados a partir de folhas jovens de Casaqueira, em condições de ausência de luz sob diferentes concentrações de 2,4-D.

O 2,4-D induz tanto calos organogênicos quanto embriogênicos, a resposta do explante dependerá não somente do seu potencial genético de regeneração, mas também da concentração, condições de cultivo e tipo de explante. O regulador 2,4-D, em concentrações vestigiais (menores que  $1 \text{ } \mu\text{M}$ ), age

como auxina, pois, influencia na divisão e na dediferenciação celular, aumentando a potencialidade celular. Algumas espécies como *Aquilaria malaccensis*, *Achyranthes aspera*, e inclusive a casaqueira tiveram suas células dediferenciadas e responderam positivamente à indução de calos, quando em contato com o meio de cultivo suplementado com 2,4-D (BERED et al., 1998; JIMÉNEZ et al.,2005; NAZ E KHATOON, 2014; NOGUEIRA et al., 2007; SAIKIA; SHRIVASTAVA; SURESHKUMAR,2013).

Os calos podem apresentar várias tonalidades de branca a tons mais escuros tais como, os amarronzados. A pigmentação do calo é um indício para classificar o tipo de calo. Lamb et al, (2002) descrevem os calos organogênicos de aveia com tons esbranquiçados com formação de estruturas organizadas e os embriogênicos são friáveis e amarelados. Os calos da casaqueira apresentaram tonalidades na faixa do branco-amarelado, com aspectos granuloso e compactos (Figura 16)



Figura 16 Calos em segmento foliar de casaqueira, em meio MS+ 10 µM de 2,4-D. Barra: 1 cm.

Werner et al. (2009), ao induzirem calos em Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*), concluíram que os folíolos juvenis quando inoculados em meio MS suplementado com 45,2 µM de 2,4-D, induzem calos na espécie de *C. echinata*, corroborando com os dados obtidos neste trabalho para a casaqueira.

Desta forma, pode-se afirmar que o meio de cultivo suplementado com 10

$\mu\text{M}$  do regulador 2,4-D induz calos em casaqueira.

## 5 CONCLUSÃO

Na germinação da casaqueira, o uso do  $\text{GA}_3$  e a ausência de luz induz uma baixa porcentagem de germinação, sendo a média inferior a 15%.

O cultivo dos segmentos nodais, em meio MS suplementado com 5,62  $\mu\text{M}$  BAP, induz até 4,2 brotos em média na casaqueira.

Segmentos nodais de casaqueira induzem maiores números de brotos (4,9) quando inoculados em meio MS suplementado com 1  $\mu\text{M}$  de BAP sob iluminação de lâmpadas LEDs.

Recomenda-se os fotoperíodos de 8 horas para multiplicação de casaqueira, contudo, faz-se necessário um subcultivo aos 60 dias.

A suplementação do meio de cultivo com 8  $\mu\text{M}$   $\text{GA}_3$  proporciona maior alongamento de brotos da casaqueira.

A aplicação de PVP a 584,3  $\mu\text{M}$  no meio de cultivo MS demonstra ser eficiente no controle da oxidação em segmentos foliares de casaqueira.

A concentração de 10  $\mu\text{M}$  de 2,4-D promove maior formação de calos (58,7%) a partir de explantes foliares de casaqueira.

## 6 REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONCALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, dez. 2006.

ARRIGONI-BLANK, M.F., et al. Fenologia e germinação de guabiroba [*Campomanesia pubescens* DC.] Berg.: espécie de cerrado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, p.237-241, 1997.

ALI, A. et al. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pakistan Journal Botany**, Karachi, v.40, n.1, p. 139-149, 2008.

AUGUSTO, C.S.S. **Micropropagação da Amoreira-Preta cv. Brazos**. 2001. 132 p. Dissertação. (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2001.

AVIDOS, M.F.D.; FERREIRA, L.T. Frutos do Cerrado: preservação gera muitos frutos. **Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Goiânia, v.3, n. 15, p.36-41, 2003.

BARBOSA, V.M.; NOBREGA, M.A.S.; SANTIAGO, E.F. Respostas germinativas de *Psidium Guineense* Swartz (Myrtaceae) e plantas jovens amúltiplos fatores de estresse. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.18, n. 4, p.173-178, 2014.

BARRUETO CID, L.P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.) **Introdução aos hormônios vegetais**. Embrapa recursos genéticos e biotecnológicos. Brasília, 2000. p. 55-88.

BRAGA, F.T. et al. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n. 2, mar./abr. 2009.

BERED, F. et al. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 11, p. 1827-1833, 1998.

CARDOSO-LEITE, E. et al. Fitossociologia e caracterização successional de um fragmento de mata-ciliar, em Rio Claro/SP, como subsídio à recuperação da área. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v.16, n.1, p.31-41, jun. 2004.

CÂMARA, G.M.S. et al. Influence of photoperiod and air temperature on the growth, flowering and maturation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. spe, p. 149-154, 1997.

CANGAHUALA-INOCENTE, C.G. et al. Competência embriogênica em tecidos florais de *Acca sellonwiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p. 87-89, jul. 2007.

CARVALHO, A. C. P. P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras, v.7, n.1, 2011.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Criopreservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 26p. (Boletim Técnico - Documentos, 115).

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; LACERDA E MEDEIROS, M.J. **Fatores Inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 28p. (Documentos, 148).

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000.588p.

CENTELLAS, A.Q. et al. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, fev. 1999.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 13-23, mar. 2006.

COSTA, A. S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 68-72, 2007.

DIAS, M.M. et al. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de Ananás do Campo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.2, p.513-520, abr/jun. 2011.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.488-490, dez. 2005.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Regeneração *in vitro* de brotos e raízes adventícias de marmeleiro (*Cydonia oblonga* mill.) cvs. Mc e Adams, utilizados como porta-enxertos para a Pereira. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.4, p.419-424, 2005.

FATIMA, N.; ANIS, M. Thidiazuron induced high frequency axillary shoot multiplication in *Withania somnifera* L. Dunal. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v.5, n.30, p.6881-6687, dez. 2011.

FAGAN, E.B. et al. Lei de Beer e sua relação com a ecofisiologia de plantas. **Cerrado Agrociências. Revista do Centro Universitário de Patos de Minas**, Patos de Minas, v.4, p. 78-97, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, abr. 2014.

FLORES, R. et al. Embriogênese somática e organogênese indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p. 993-995, 2007.

FLORES, R. et al. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 292-299, 2009.

FORZZA, R. C. et al. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro, v.1, 2010.

GAO, Y. et al. Characterization of the gibberellic acid response of the *Brassica napus* L. em. Metzg. dwarf mutant *NDF-1*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdã, v. 57, n. 4, p. 481-485, 2010.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, 709 p

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH, 1998, part. 2, p.183-260.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 509-530, dez. 2006 .

GUIMARÃES, M.A. et al. Influência de temperatura, luz e giberelina na germinação de sementes de *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl (Brassicaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v.57, n.3, p. 372-376, mai./jun. 2010.

GUITIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v.117, n.1, p.1-27, 2008.

GUPTA, S.D.; SAHOO, T.K. Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchoides* Gaertn. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v.37, n.11, 2015.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, n. 1/2, p. 91-110, Nov. 2005.

KHAN, S.A. et al. Rapid micropropagation of three elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. **African Journal of Biotechnology**, Abuja, v.7, p. 2174-2180, 2008.

KIM, S.J.; HAHN, E.J.; HEO, J.W.; PAEK, K.Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.101, n.1-2, p.143-151, 2004.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**, New York v.19, n.3, p.707-713, 2005.

LAMB, C. R. C. et al. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 123-130, 2002.

LANDRUM, L.R. The development of the fruits and seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittonia**, New York, v.34, n.2, p.220-224, 1982.

LAVANYA, A.R. et al. Indirect organogenesis from various explants of *Hildegardia populifolia* (Roxb.) Schott & Endl. – A threatened tree species from Eastern Ghats of Tamil Nadu. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Cairo, v.12, p.95-101, 2014.

LIMBERGER, R.P. et al. Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal Essential Oil Research**, Boca Raton, v. 13, 2001.

MARTINS, C.R.; CARVALHO, A.C.P.P.; Avanços da cultura de tecidos na micropropagação de plantas. **III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas**. Aracaju, p.28-32, 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**. Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 04 fev. 2016.

MANTAVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; 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, 2001.

MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. A Família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil, **Lundiana**, Belo Horizonte, v.7, n.1, p.3-32, 2006.

MOREIRA, M. F.; VIEIRA, C. C. J.; ZAIDAN, L. B. P. Efeito do fotoperíodo no crescimento e no padrão de acúmulo de frutanos em plantas aclimatizadas de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 397-403, 1999.

MOURA, T.L.et al. Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p. 240-245, ago. 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagem, v.15, p.473-497, 1962.

NAZ, S.; KHATOON, K. The effect of auxins on callus induction in *Achryanthes aspera*. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 46, n. 6, p. 2203-2207. 2014.

NASCIMENTO, A.C. et al. AIB e BAP no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Revista Acadêmica. Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v.6, n.2, p.223-228, 2008.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NONOGAKI, H. Seed germination the biochemical and molecular mechanisms. **Breeding Science**, Tokyo, v.56, n.2, p.93-105, 2006.

OLIVEIRA, M. C.; SANTANA, D. G.; SANTOS, C.M.; Biometria de frutos e sementes e emergência de plântulas de duas espécies de frutíferas do gênero *Campomanesia*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n.2, p.446-455, 2011.

OMETTO, J.C. **Bioclimatologia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981.440p.

ONO, E.O.; JUNIOR, J.F.G.; RODRIGUES, J.D. Reguladores vegetais na quebra de dominância apical de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p. 348-350, ago. 2004.

PASQUAL M; HOFFMANN A; RAMOS J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE. 1997. 159 p.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. de L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, set. 2003.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

PORTO, A.C.; GULIAS, A.P.S.M.; Gabiroba. In: \_\_\_\_\_ **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, 2006. p. 164-173.

PROENÇA, C.E.B.; P.E. GIBBS. 1993. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. **New Phytologist**, Yokohama, v.126, n. 2, p. 343-34, 1994.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Embrapa Amazonia Ocidental, Manaus, 2008. 48 p.

RADMAN, E.B.; GONÇALVES, E.D.; FORTES, G.R.L. Concentrações de ácido indolbútrico e períodos de escuro, no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n. 1, p. 124-126, abr. 2003.

RAI, M.K.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. **Journal of fruit and Ornamental Plant Research**, Skierniewice, v. 17, n.1, p.29-38, 2009.

RAPOSO, A. et al. **Protocolo de micropropagação para as espécies *Piper hispidinervum* e *P. aduncum***. Rio Branco: Embrapa Acre, 2012. 6 p. (Embrapa Acre - Circular técnica, 63)

RIBEIRO, M.N.O. et al. Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n. 8, p. 2388-2393, nov. 2009.

ROCHA, P.S.G. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.9, p. 1922-1928, set. 2010.

ROCHA, P. S. G. et al. Diodos emissores de luz (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy. **Horticultura Argentina**, Buenos Aires, v.32, p. 14-19, 2013.

RODRIGUES, V.E.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: Ed. Ufla, 2001. 180p.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.

SAIKIA, M.; SHRIVASTAVA, K.; SURESHKUMAR, S.S. Effect of culture media and growth hormones on callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam., a medicinally and commercially important tree species of north east India. **Asian Journal of Biological Sciences**, Kuala Lumpur, v.6, p.96-105, 2013.

SAN, B.; KARAKURT, Y.; DONMEZ, F. Effects of thidiazuron and activated charcoal on *in vitro* shoot proliferation and rooting of Myrtle (*Myrtus communis* L.). **Journal of Agricultural Sciences**, New York, v. 21, p. 177-183, 2015.

SANT'ANA, C. R. O. **Cultivo *in vitro* de *Campomanesia rufa* [Berg.] Nied.** Lavras 2014. 40 p. Monografia (Graduação Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

SANTOS, C.M.R.; FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n.2, p.13-20, 2004.

SANTOS, T.C. et al. Conservação *in vitro* de acessos de vetiver *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.6, p. 963-970, nov./dec. 2012.

SILVA, J. A. T. Is BA (6-benzyladenine) BAP (6-benzylaminopurine)? **The Asian and Australian Journal of Plant Science and Biotechnology** (Special Issue 1), p. 121–124, 2012.

SILVA et al. Caracterização física, química e fisiológica de gabiroba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 29, n.4, p. 803-809, out./dez. 2009.

SILVA, T. et al. Germinação de sementes de melância sob diferentes métodos de tratamento com reguladores vegetais. **Scientia Plena**, Aracaju, v.10, n.3, p.1-15, 2014.

SMANIOTTO, T.A.S. et al. Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 4, p. 446-453, 2014.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014.

SOUZA, L. S. et al. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O. BERG) D. LEGRAND. **Revista brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, p. 691-697, 2011.

SOUZA, M. da C.; MORIM, M. P. Subtribos *Eugeniinae* O. Berg e *Myrtinae* O. Berg (Myrtaceae) na Restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 652-683, 2008.

STREIT, N.M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, mai./jun. 2005.

THE INTERNATIONAL PLANT NAME INDEX. *Myrtaceae Campomanesia rufa* Nied. Natürlichen Pflanzenfamilien. [Engler & Prantl] v. 7, n. 73, 1893.

TORRES, A.C. et al. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília. Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

VALLILO, M. I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambesséde) O. Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 725-955, 2006.

VASCONCELOS, A.G.V. et al. Hiperhidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p. 837-844, mai. 2012.

VICTÓRIO, C. P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* roxb. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.213-215, 2007.

VIECILI, P.R.N. et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**, Zurich, v.234, p.85-92, 2014.

VIEIRA, F.C.S. **Myrtaceae Juss. no Alto Quiriri, Garuva, Santa Catarina, Brasil**. São Paulo: USP, 2010.

VIEIRA, E.L.; MONTEIRO, C.A. Hormônios vegetais. In: CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A.; KLUGE, R.A.M. **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**, Maringá: Eduem, p.79-104. 2002.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* de Amoreira-Preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n.3, p. 582-589, mai./jun. 2005.

WERNER, E. T. et al. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 987-996, dez. 2009

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B.; Auxin: Regulation, Action, and Interaction. **Annals of Botany**, Oxford, v.95, n.5, p. 707-735, 2005.

WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE. 1998. *Campomanesia rufa*. The IUCN Red List of Threatened Species 1998: e.T35334A9927548.