

**CULTIVO *IN VITRO* E ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS DE CAGAITEIRA
(*Eugenia dysenterica* DC.)**

CRISTIANO MARTINOTTO

2004

CRISTIANO MARTINOTTO

CULTIVO *IN VITRO* E ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS DE CAGAITEIRA

(*Eugenia dysenterica* DC.)

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

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de
Processos Técnicos da**

Biblioteca Central da UFLA

Martinotto, Cristiano

Cultivo *in vitro* e aspectos morfofisiológicos de cagaiteira (*Eugenia
dysenterica* DC.) / Cristiano Martinotto. – Lavras : UFLA, 2004.

84 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cultivo *in vitro*. 2. Cerrado. 3. Frutífera nativa. 4. Anatomia vegetal. 5.
Myrtaceae. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.42

CRISTIANO MARTINOTTO

**CULTIVO *IN VITRO* E ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS DE CAGAITEIRA
(*Eugenia dysenterica* DC.)**

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

Aprovada em 06 de agosto de 2004.

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

UFLA

Pesq. Dr. Guilhermê Augusto Canella Gomes

Indústria Química
Kimberlit Ltda



Prof. Renato Paiva, PhD.
DBI/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus.

Aos meus pais, Valentim Martinotto e

Maria Ondina dos Santos Martinotto,

DEDICO

Aos meus irmãos, Fernando, Davi, Graziela e familiares.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, nunca me desamparando nos momentos difíceis.

Aos meus pais, por todo o amor, privações e esforço que tiveram para que eu chegasse até aqui, e a meus irmãos, Fernando, Davi e Graziela, por todo o apoio e carinho.

Ao Prof Renato Paiva, PhD, pela amizade, incentivo e orientação na condução de meus trabalhos.

Ao Prof Dr. Evaristo Mauro de Castro, pela preciosa ajuda e sugestões na área de Anatomia Vegetal.

Ao Dr Jeferson Luiz Dallabona Dombroski e Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, pelas sugestões e auxílio durante o curso e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de mestrado e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia: Mauro, Ester Solange, Maria Helena, Izonel, Evaristo, Dartagnan, Joel, Odorêncio e Barrinha.

A todos os colegas de curso, em especial ao Breno, Raírys, Bel, Fernanda, Espeto, Samantha, Cíntia, Gustavo, Peterson e Rodrigo, pela convivência agradável e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos Gisele e Lucas, pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao Américo, Alzira, Altivo e Maria Helena, pela amizade, acolhida e auxílio na coleta de sementes utilizadas nos experimentos.

Aos alunos de iniciação científica e estagiários, Patrícia, Alvinho, Leticia, Eduardo, Luciano, Roberta, Emmanuelli, Isabel e Lucas, por estarem sempre dispostos, pela valiosa ajuda na montagem dos experimentos, coleta de dados e análises laboratoriais.

Aos amigos do GPP, GOU e Comunidade N. Sr. das Mercês, pelo apoio e votos de sucesso durante minha caminhada nos estudos e na fé.

A todos que não foram citados e que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a conclusão de mais esta etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

CRISTIANO MARTINOTTO, filho de Valentim Martinotto e Maria Ondina dos Santos Martinotto, nasceu em 15 de fevereiro de 1977 em Porto Alegre, RS. Ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Mato Grosso em 1997. Desde o início, como bolsista de iniciação científica (CNPq-PIBIC), participou de atividades de pesquisa com sistemas agroflorestais utilizando espécies de uso múltiplo do Cerrado e propagação destas espécies, sob a orientação do Dr. Ivo Pereira de Camargo (*in memoriam*). Posteriormente trabalhou no levantamento do uso de pesticidas no estado de Mato Grosso, orientado pela Dra. Oscarlina Lúcia dos Santos Weber e no cultivo *in vitro* de espécies nativas do Cerrado, sob orientação do Dr. Jeferson Luiz Dallabona Dombroski. Ingressou em 2002 no Curso de Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, sob a orientação do Prof Renato Paiva, PhD, concluindo-o em 2004.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Descrição da espécie.....	2
2.2 Usos da espécie.....	6
2.3 Propagação da cagaiteira.....	8
2.3.1 Propagação sexuada.....	8
2.3.2 Propagação assexuada.....	10
2.4 Micropropagação de plantas.....	11
2.5 Indução e estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i>	14
2.6 Enraizamento <i>in vitro</i>	16
2.7 Aclimatização.....	17
2.8 Aspectos da anatomia foliar.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Germinação <i>in vitro</i>	20
3.2 Desinfestação de explantes foliares obtidos de plantas cultivadas em sala de crescimento.....	21
3.3 Efeito do BAP e ANA na organogênese em segmentos nodais.....	21
3.4 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	23
3.5 Indução de calos em explantes foliares.....	23
3.6 Indução de calos em segmentos nodais.....	24
3.7 Plasticidade anatômica das folhas de cagaiteira.....	24
3.8 Aclimatização e aspectos morfofisiológicos.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Germinação <i>in vitro</i>	29

4.2 Desinfestação de explantes foliares obtidos de plantas cultivadas em sala de crescimento.....	34
4.3 Efeito do BAP e ANA na organogênese em segmentos nodais.....	37
4.3.1 Brotações superiores a 5 mm.....	37
4.3.2 Brotações totais.....	40
4.4 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações.....	44
4.5 Indução de calos em explantes foliares.....	45
4.6 Indução de calos em segmentos nodais.....	47
4.7 Plasticidade anatômica das folhas de cagaiteira.....	51
4.7.1 Espessura do limbo foliar.....	54
4.7.2 Densidade estomática.....	56
4.7.3 Diâmetro polar e equatorial de estômatos.....	58
4.8 Aclimatização e aspectos morfofisiológicos.....	60
4.8.1 Crescimento.....	61
4.8.2 Densidade estomática.....	62
4.8.3 Diâmetro polar e equatorial de estômatos.....	65
4.8.4 Espessura do limbo foliar.....	68
4.8.5 Fluorescência.....	70
5 CONCLUSÕES.....	73
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

RESUMO

MARTINOTTO, Cristiano. **Cultivo *in vitro* e aspectos morfofisiológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.).** 2004. 84 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A cagaiteira é uma árvore frutífera nativa do cerrado com elevado potencial econômico, social e ecológico, destacando-se pelo sabor de seus frutos e elevada produtividade. Este trabalho teve por objetivo estudar o cultivo *in vitro* e aspectos morfofisiológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) em diferentes condições de cultivo e durante sua aclimatização. Durante a fase de estabelecimento *in vitro* foi verificado que o melhor tratamento para germinação (88,25%) e que induziu o menor número de plântulas anormais (12%) foi o com sementes desprovidas de seu tegumento, tanto na luz quanto no escuro. Na desinfestação de explantes foliares, o melhor resultado foi obtido com a imersão destes em álcool 70% por 60 segundos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo por 20 minutos. A utilização de 2,4-D e TDZ não foi eficiente na indução de calos em explantes foliares. A utilização de 3,0 mg L⁻¹ foi eficiente na indução de calos em segmentos nodais de cagaiteira. Na indução de brotações maiores que 5 mm, o melhor resultado (2,5 brotações por explante) foi obtido com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de BAP acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ANA. Na fase de enraizamento de brotações provenientes do cultivo *in vitro*, o AIB não foi eficiente na indução de raízes nas concentrações utilizadas. Os substratos plantmax e plantmax + vermiculita proporcionaram maior desenvolvimento em plântulas em fase de aclimatização, sendo o substrato plantmax + húmus prejudicial, pois causou desfolha inicial, atrasando o desenvolvimento destas. Estudos anatômicos por meio de cortes histológicos demonstraram que plântulas em ambiente *in vitro* apresentam seus tecidos menos desenvolvidos que plantas cultivadas em sala de crescimento e a campo. Durante a fase de aclimatização ocorreram modificações morfofisiológicas nos tecidos foliares, os quais conferiram a estes melhor adaptação ao ambiente em que foram cultivadas, apresentando ainda aumento na eficiência fotossintética, durante esta fase.

* Comitê Orientador: Renato Paiva - UFLA (Orientador), Jeferson Luiz Dallabona Dombroski (UFMT); Evaristo Mauro de Castro (UFLA) e Patricia Duarte de Oliveira Paiva (UFLA).

ABSTRACT

MARTINOTTO, Cristiano. *In vitro* cultivation and morphophysiological aspects of cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) 2004. 84p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The cagaiteira is a native fruit tree from cerrado with high economical, social and ecological potential, mainly due to its fruit flavor and high yield. This work aimed to study the *in vitro* cultivation and morphophysiological aspects of cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) in different conditions of cultivation and during its acclimatization. During the *in vitro* establishment phase, the best treatment for germination (88.25%) that also induced the lower number of abnormal plants (12%) was the use of seeds without tegument maintained in the absence or presence of light. In leaf explants disinfections, the best result was obtained with the immersion of the tissue in ethanol 70% for 60 seconds, followed by the immersion in sodium hypochloride with 1% active chlorine for 20 minutes. The use of 2,4-D and TDZ was not efficient in callus induction on leaf explants. The use of 3.0 mg L⁻¹ was efficient for callus induction in nodal segments. The best results to obtain shoots higher than 5mm (2.5 shoots per explant) was obtained using 2.0 mg L⁻¹ BAP containing 0.1 mg L⁻¹ NAA. The use of IBA was not efficient to induce rooting in shoots obtained *in vitro*. While the substrates plantmax and plantmax + vermiculite caused higher plantlet development during the acclimatization phase, plantmax + humus was harmful causing leaf senescence which delayed its development. Anatomical studies from histological preparations showed that plantlets originated *in vitro* presented less developed leaf tissues compared to plantlets maintained in growth room and in the field. During the acclimatization phase, morpho-physiological modifications were observed in leaf tissues, which conferred better adaptation in this environment as well as an increase in the photosynthetic efficiency.

*Guidance Committee: Renato Paiva - UFLA (Advisor), Jeferson Luiz Dallabona Dombroski (UFMT); Evaristo Mauro de Castro (UFLA) e Patrícia Duarte de Oliveira Paiva (UFLA).

1 INTRODUÇÃO

A cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), pertencente à família Myrtaceae é uma espécie frutífera nativa do Cerrado. Apresenta propriedades medicinais, sendo indicada como planta melífera, ornamental e para o reflorestamento de áreas degradadas, fornecendo, ainda, madeira para mourões e cortiça. Sua propagação sexuada se caracteriza, assim como para outras espécies nativas, por produzir indivíduos heterogêneos, devido principalmente à característica alogâmica da espécie. Estudos indicam que as sementes desta espécie são recalcitrantes e dormentes. Desse modo, a propagação via sementes apresenta-se inviável para a obtenção de mudas destinada à implantação de pomares comerciais e reflorestamento de áreas degradadas.

A propagação vegetativa por meio de estaquia para a cagaiteira ainda não se consolidou como uma técnica viável. Dessa forma, técnicas de cultivo *in vitro* podem se tornar um meio eficiente de propagação. Esta técnica apresenta inúmeras vantagens em relação a outros métodos de propagação, como produção de mudas em grande escala e rapidez e livres de doenças, facilidade na conservação e intercâmbio de germoplasma, aplicação direta no melhoramento genético em técnicas de hibridação, haploidização e transformação. Para que esta técnica possa ser utilizada de maneira eficiente, um protocolo deve ser desenvolvido para cada espécie. Durante o cultivo *in vitro*, devido às condições em que as plantas são submetidas, alterações morfofisiológicas são induzidas, devendo a planta passar por um período de adaptação denominado aclimatização, para que estejam aptas a serem transplantadas para condições *ex vitro*, evitando elevadas taxas de mortalidade. Desta forma o estudo das modificações morfofisiológicas durante o cultivo *in vitro* e durante a fase de aclimatização são importantes para a compreensão deste processo de adaptação.

O presente trabalho teve por objetivos desenvolver um protocolo para o cultivo *in vitro* e aclimatização de plântulas de cagaiteira e caracterizar aspectos morfofisiológicos de plantas cultivadas a campo, em sala de crescimento, *in vitro* e durante a aclimatização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae dentro da qual é o que apresenta maior o número de espécies. A família Myrtaceae compreende mais de 100 gêneros com aproximadamente 3.000 espécies. O nome da família vem do grego “Myrtos” = perfume. É representada por árvores, arbustos e subarbustos de folhas inteiras opostas ou raramente alternas, com pontuações translúcidas e nervação do tipo variável (Ferreira, 1980).

A cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), também conhecida como cagaita devido às suas propriedades laxativas, é uma árvore frutífera nativa natural do Cerrado. Segundo Naves (1999), a cagaiteira ocorre em maior densidade nos Latossolos Vermelho-Amarelos, sendo observada em áreas com temperaturas médias anuais variando entre 21,1°C e 25,5°C e altitudes de 380 a 1.100 m. Está distribuída em vários estados brasileiros, sendo mais comum em Goiás, Minas Gerais e Bahia, em cerrados e cerradões.

A cagaiteira possui altura mediana, atingindo de 4 a 10 m, tronco tortuoso e cilíndrico com 20 a 40 cm de diâmetro e uma casca suberosa e fendada bem característica (Figura 1A e 1B).

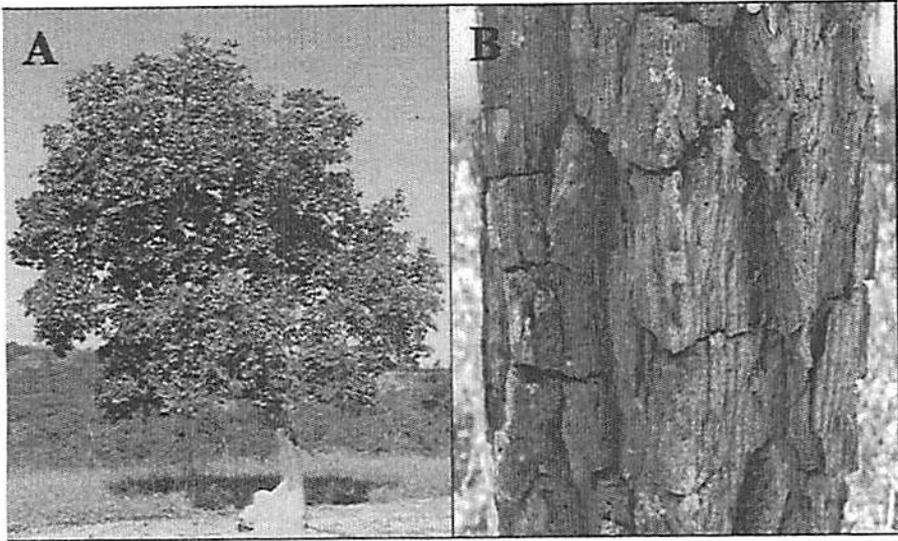


FIGURA 1 Cagaiteira adulta (A) e detalhe de seu tronco (B) (Fotos: Martinotto e Santos, 2004)

Sua copa é alongada densa com ramos quadrangulares e esfoliantes glabros, exceto os botões, pedicelos, folhas e ramos muito jovens, que são pubérulos. É uma planta decídua, heliófila e seletiva xerófila (Donadio et al., 2002). O mesmo autor descreve as folhas como opostas, ovado-oblongas, simples, curto pecioladas a subsésseis, glabras, aromáticas, caducas na floração, nervação reticulada e pecíolo de 2,5 a 6 mm de comprimento e limbo de 3 a 9 cm de comprimento por 1,5 a 5 cm de largura.

Apresenta panícula fasciculada, com flores hermafroditas com 1,5 a 2 cm de diâmetro, longo-pedunculadas, com uma bráctea, cíclicas, diclamídeas e com simetria radial. O cálice apresenta quatro sépalas livres e corola com quatro pétalas livres. As sépalas são elípticas e pétalas orbiculares, brancas. O androceu é constituído por inúmeros estames inseridos no receptáculo, livres e desiguais em tamanho. As anteras são globosas mesofixas, com duas tecas e deiscência

longitudinal. O gineceu é sincárpico, constituído por ovário ínfero com dois lóculos com 2 a 4 óvulos, um estilete filiforme e estigma afilados.

No Cerrado, o florescimento dá-se de agosto a setembro, geralmente sincronizado com o início das primeiras chuvas ou até mesmo antes delas, não durando mais que uma semana. Apresenta estratégia de florescimento do tipo “big-bang”, ou seja, massal concentrado em um curto espaço de tempo. Juntamente com o florescimento surge um fluxo de novas brotações, ricas em pigmentos vermelhos (Proença & Gibbs, 1994). No espaço de um mês ocorrem o florescimento, a produção de nova folhagem e a frutificação (Sano et al., 1995; Ribeiro et al., 1994).

Seu fruto é uma baga globosa achatada, amarelo-pálida, de 2 a 3 cm de diâmetro (Figura 2), contendo de 1 a 3 sementes brancas, envoltas em uma polpa acidulada. Apresenta um cálice seco atachado, casca brilhante membranácea, mesocarpo e endocarpo suculentos e polpa ácida (Corrêa, 1984; Rizzini, 1971; Donadio et al., 2002; Ferreira, 1980). Apresenta elevada produtividade, podendo chegar a até mais de 2.000 frutos por árvore (Almeida et al., 1987). Calbo (1990), estudando o comportamento pós-colheita de seus frutos, constatou serem climatéricos e altamente perecíveis à temperatura ambiente, não durando mais que três dias nestas condições.

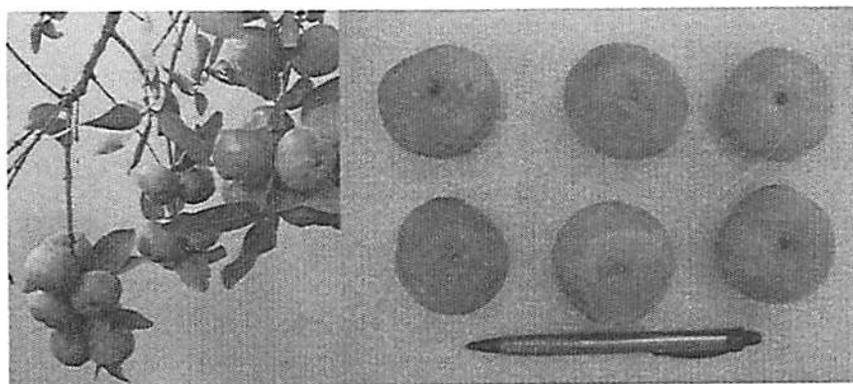


FIGURA 2 Aspectos dos frutos de cagaiteira (Fotos: Martinotto, 2004)

Suas sementes medem de 0,8 a 2,0 cm de diâmetro e possuem cor creme e forma oval, achatada ou elipsóide. Apresentam superfície lisa e tegumento coriáceo, constituindo-se quase que totalmente pelos dois cotilédones, sendo permeável a água. Um quilo de sementes contém cerca de 700 a 1.600 unidades. Apresenta germinação hipógea, com vigoroso desenvolvimento inicial do sistema radicular (Figura 3).

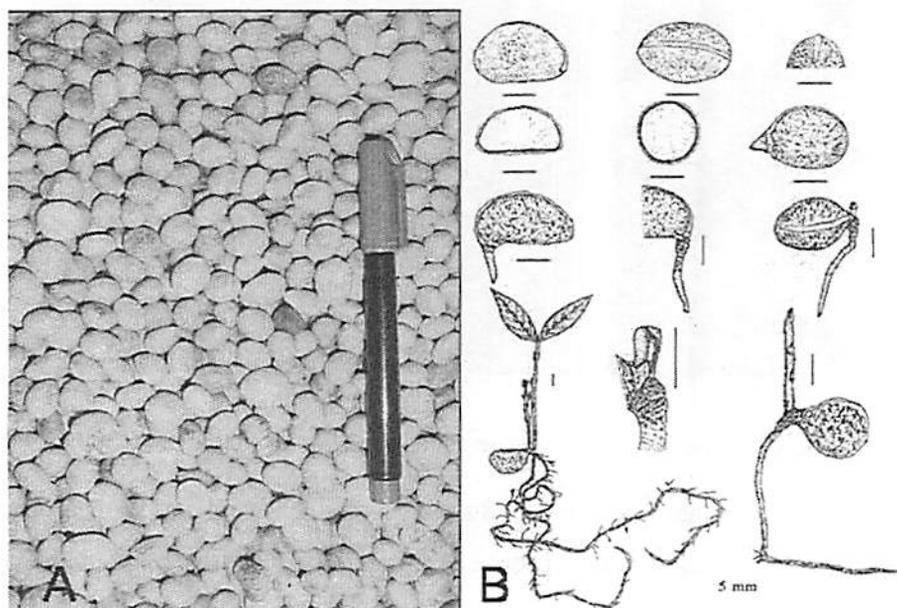


FIGURA 3 Aspectos das sementes (A) e germinação de cagaiteira (B)
(Fotos: Martinotto, 2004; Andrade et al., 2003)

Segundo Ferreira & Cunha (1980), a cagaiteira, assim como outras espécies da família *Myrtaceae*, possuem dois tipos principais de dispersão, o primotócrico e o antropocórico. Rizzini (1971) a classifica como espécie zoocórica, por ser dispersa por animais.

2.2 Usos da espécie

A cagaiteira apresenta um grande potencial como planta frutífera, destaca-se das demais por apresentar uma produtividade elevada, chegando a 2.000 frutos por árvore. Sua polpa de sabor doce levemente ácido é excelente para a produção de sorvetes, geléias, doces e licores (Almeida et al., 1987), porém, quando consumida em excesso ou quente, pode causar diarreia e embriaguez. Ainda imaturos, podem ser utilizados como forragem para o gado

(Donadio et al., 2002; Ribeiro et al., 1986). De sua polpa também são obtidos vinagre e álcool (Corrêa, 1984).

Estudos da composição nutricional de diversas frutas nativas do Cerrado constatou que a cagaita possui elevado teor de água (95,01%) sendo uma das frutas que apresentam a maior porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados (linoléico e linolênico), ficando atrás apenas da amêndoa de-baru e da polpa de mangaba. Apresenta maior teor de ácido graxo linoléico (10,5%) que o azeite de oliva e de dendê. Quanto ao teor de ácido graxo linolênico (11,86%), supera o do óleo de milho, de girassol, de amendoim, de soja, de oliva e o de dendê. Os ácidos graxos possuem importante papel no organismo humano, sendo o linoléico e o linolênico essenciais. São precursores de substâncias que têm papel importante na estrutura de membranas celulares como componentes de estruturas cerebrais, da retina e do sistema reprodutor, entre outros (Almeida, 1998).

A madeira de seu tronco é pesada, com densidade de $0,82 \text{ g cm}^{-3}$, dura e de textura fina, mas de baixa qualidade, servindo para mourões, lenha e carvão (Donadio et al., 2002; Corrêa, 1984).

A casca, além de servir à indústria de curtume, é utilizada na medicina popular como antidiarréica. Apresenta considerável quantidade de súber, chegando a medir de 1,0 a 2,0 cm, empregado na fabricação de cortiça (Macedo, 1991).

Suas folhas constituem um excelente pasto arbóreo, convenientemente aproveitado em algumas regiões. Apresentam ainda propriedades medicinais, sendo utilizadas na medicina popular, em garrafadas, como antidiarréico e para problemas do coração (Donadio et al., 2002; Brandão, 1991). Santos (2000) identificou a presença de flavonóides e rutina em extrato etanólico de folhas de cagaiteira.

Costa et al. (2000) verificaram alta atividade antifúngica no óleo hidrolisado de folhas de cagaiteira no controle de *Cryptococcus néoformans var gattii*.

Pelo fato de apresentar florescimento exuberante, concentrado e quase sem folhas, a cagaiteira tem elevado potencial paisagístico (Ribeiro et al., 1994; Gavilanes et al., 1991), sendo também citada como planta melífera (Brandão & Ferreira, 1991).

Devido a todas estas características, a cagaiteira se apresenta como uma espécie com grande potencial para ser utilizada em cultivos comerciais e reflorestamentos de áreas degradadas ou de baixa capacidade de uso, servindo de alimento para a fauna, podendo ainda tornar rentáveis tais áreas.

2.3 Propagação da cagaiteira

2.3.1 Propagação sexuada

A cagaiteira apresenta tanto autofecundação quanto fecundação cruzada, sendo a polinização realizada, principalmente, no período da manhã (Proença & Gibbs, 1994). Segundo Zucchi (2002), ela apresenta uma tendência a ser alógama, aumentando a variabilidade nas progênes obtidas por via sexuada.

Vários autores, estudando características morfológicas e genéticas de populações nativas desta espécie, revelaram grande variabilidade entre plantas, bem como dos frutos, tanto dentro de populações como entre populações (Silva, 2001; Telles, 2001; Zucchi, 2002). Souza et al. (2002), avaliando o desenvolvimento e crescimento inicial de cagaiteira, observaram grande desuniformidade, tanto em altura como em diâmetro de plantas propagadas sexuadamente. Estes dados indicam que a obtenção de mudas para plantios comerciais por via sexuada gera pomares desuniformes, podendo comprometer tais empreendimentos.

Quanto à germinação de sementes, alguns trabalhos relatam a existência de certo grau de dormência de origem tegumentar. Rizzini (1970) verificou que o extrato do embrião de cagaiteira em germinação e o extrato do tegumento de suas sementes inibiam fortemente a germinação de feijão-preto. Porém, em trabalhos posteriores, verificou que estes inibidores não se tornavam problema para sua própria germinação (Rizzini, 1971). Essa informação foi contestada pelo trabalho de Machado et al. (1986), que observaram que a germinação de sementes de cagaiteira ocorria de forma irregular e tardia, estendendo-se de 31 a 142 dias, apresentando um índice de germinação de 69%.

Além da presença de inibidores, Rizzini (1971) cita um atraso na germinação de sementes com tegumento intacto, sendo eliminado com a escarificação. O autor ainda comenta que, embora o tegumento seja coriáceo, ele não é obstáculo para a passagem de água, porém, ao embeber-se, torna-se impermeável a trocas gasosas, podendo diminuir o aporte de oxigênio ao embrião, retardando seu desenvolvimento.

Andrade et al. (2003) verificaram que as sementes apresentam elevado teor de água, entre 47% e, 53%, e ao serem dessecadas, perdiam completamente sua viabilidade ao atingirem entre 18% e 22%. Estes resultados, demonstram que as sementes de cagaiteira são sensíveis à perda de água, não sendo capazes de manter alta viabilidade por mais de 150 dias quando armazenadas hidratadas (45%), independente da temperatura de armazenamento. Observa-se, por estes resultados, o caráter recalcitrante das sementes desta espécie.

Farias Neto et al. (1991), em seus estudos com formas de armazenamento, constataram que o melhor tratamento para a conservação da viabilidade das sementes de cagaiteira foi o acondicionamento em sacos plásticos armazenados em câmara fria a 10°C/60% UR. Mesmo assim houve rápida perda de viabilidade até os 100 dias, atingindo 30% de germinação e 2,2 plântulas por semana.

O curto período de armazenamento de sementes de cagaiteira se torna um fator limitante para a propagação sexuada da espécie, exigindo rápida semeadura a fim de evitar grandes perdas na capacidade de germinação. Isto acarreta em prolongado tempo de viveiro, tendo a muda que esperar até a próxima estação chuvosa para ir para o campo, aumentando os custos de produção (Farias Neto et al., 1991).

2.3.2 Propagação assexuada

Souza et al. (2002) relatam que, aos 540 dias após a semeadura, mudas produzidas por sementes apresentavam diâmetro do caule apto para a enxertia, indicando que elas necessitam de elevado tempo de viveiro para serem propagadas por este método, inviabilizando-o pelo custo e espaço necessário. Além disso, não foram encontrados relatos na literatura de sucessos de propagação desta espécie por este método.

Ribeiro et al. (1996) e Melo et al. (1998) não conseguiram resultados satisfatórios utilizando AIB e AIA no enraizamento de estacas caulinares de plantas adultas de cagaiteira.

Cunha (1986) também não obteve enraizamento tratando estacas de cagaita de material rejuvenescido a partir de brotações de raízes e de tronco de árvores adultas e também com estacas de material juvenil e de mudas de um ano e meio (Melo et al., 1998). Técnicas de cultura de tecidos são indicadas para determinadas espécies do Cerrado, principalmente quando suas características botânicas impedem ou dificultam a propagação pelas vias clássicas. Pode-se citar como por exemplo, espécies selecionadas por sua elevada produtividade ou qualidade dos frutos superiores e que apresentam dormência, recalcitrância ou grande variabilidade genética por meio de sua propagação sexuada.

Várias são as modalidades de cultura de tecidos, podendo ser por via direta, pelo desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante ou indireta, como a cultura de calos, que resulta em uma massa de células não organizadas, a partir de qualquer parte da planta. Estes calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem direcioná-lo para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, como gemas, raízes ou embriões por organogênese ou embriogênese (Caldas, 1996). Podem ainda ser tratados com enzimas, obtendo-se protoplastos para a realização de trabalhos de engenharia genética.

Atualmente, a modalidade de maior interesse e aplicação na propagação de plantas nativas do Cerrado é a micropropagação, que reúne características, tais como multiplicação rápida de plantas selecionadas, obtenção de mudas livres de patógenos que acompanham outros métodos de propagação vegetativa, conservação e transporte de germoplasma, entre outros.

2.4 Micropropagação de plantas

A propagação assexuada geralmente é vista como uma alternativa para a propagação de espécies que apresentam dificuldade por via sexuada. Assim, nos últimos anos, a cultura de tecidos tem sido uma técnica bastante eficaz na propagação de várias espécies (Landa, 2000).

A cultura de tecidos vegetais refere-se às técnicas de cultura em meio nutritivo, em condições assépticas, de células, tecidos ou órgãos de plantas, sob condições controladas de luminosidade e temperatura (Torres et al., 2000).

O método da cultura de tecidos vem sendo amplamente aplicado na recuperação de plantas livres de vírus e outros agentes causadores de doenças, na conservação e intercâmbio de germoplasma *in vitro*, micropropagação rápida de genótipos elites, produção de haplóides, transformação genética de plantas e propagação comercial de plantas com potencial econômico, dentre outras

(Torres et al., 2000). Santana (2003) comenta que técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas, principalmente, quando a propagação sexuada é insatisfatória, devido à reprodução por sementes não ocorrer naturalmente.

Torres et al. (1998) relatam que a aplicação prática da cultura de tecidos começou quando Morel e Martim, em 1952, recuperaram plantas de dália livres de vírus do mosaico por meio da cultura de ápices caulinares. Atualmente, existem dezenas de laboratórios de cultura de tecidos estudando a propagação *in vitro* de plantas.

Com base no fato de que os tecidos somáticos de uma planta são, essencialmente, os produtos de divisões mitóticas, cada célula dentro do organismo pode regenerar novas réplicas do mesmo organismo, desde que condições apropriadas sejam fornecidas (Mantell et al., 1994). Assim, na cultura de tecidos pode ser utilizada toda uma gama de explantes, como plântulas e órgãos ou células isoladas e protoplastos (Mantell et al., 1994).

Para Pierik (1990), a propagação por meio da cultura de tecidos pode ser realizada por via direta ou indireta (via calogênese), sendo a via indireta considerada como um método potencial de propagação.

A cultura de tecidos tem sido considerada uma grande alternativa para a agricultura. A propagação *in vitro*, também denominada de micropropagação em função dos propágulos utilizados, é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta da cultura de tecidos de órgãos vegetais (Santiago et al., 2003; Grattapaglia & Machado, 1998). Ela pode utilizar a cultura de ápices caulinares e segmentos nodais, embriogênese somática e formação de gemas adventícias em diversos tipos de explantes (Torres et al., 2000).

Grattapaglia & Machado (1998) relatam que a utilização comercial da micropropagação já é realizada em diversos países do mundo. A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel, em 1960, ao

multiplicar orquídeas mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocórmios.

A micropropagação comercial concentra-se na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas. No entanto, trabalhos com espécies lenhosas frutíferas e essências florestais já vêm sendo realizados (Grattapaglia & Machado, 1998).

Segundo Erig & Schuch (2002), na multiplicação *in vitro* não basta conseguir altas taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter uma taxa média satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante. Para Grattapaglia & Machado (1998), outros fatores importantes a serem observados são a qualidade e a homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois determinarão o sucesso no enraizamento.

A principal vantagem da micropropagação é a fixação de ganhos genéticos nas populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas sadias e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto espaço de tempo, independente de fatores climáticos limitantes (Guerra et al., 1999; George, 1993), além de proporcionar maior precocidade na produção (Melo et al., 1999).

Reguladores de crescimento são usados em micropropagação para suportar um nível de crescimento básico e são igualmente importantes para direcionar a resposta do propágulo ao desenvolvido (Santana, 2003).

O sinergismo entre auxinas e citocininas é determinante no controle da morfogênese *in vitro*. Elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas induzem, em geral, à formação de gemas em detrimento da formação de raízes e, invertendo-se esta relação, as gemas são inibidas havendo indução de raízes (Santana, 2003).

Outro fator importante para o sucesso do sistema de micropropagação é a conjugação de fatores nutricionais, ambientais e endógenos (Melo et al., 1999).

2.5 Indução e estabelecimento do cultivo *in vitro*

A micropropagação tem sido uma ferramenta essencial para o estabelecimento *in vitro* de espécies nativas com importância econômica e ecológica. Estas espécies apresentam problemas de oxidação e contaminação, devido a características peculiares no processo de estabelecimento (Santos et al., 2001).

Para Grattapaglia & Machado (1998), a condição da planta matriz, a descontaminação e o manejo dos explantes iniciais são os principais aspectos a serem considerados na micropropagação. A dificuldade maior na micropropagação reside em se obter tecidos descontaminados sem conduzi-los à morte quando isolados. Murashige (1977) relata que, em micropropagação de espécies arbóreas são comuns problemas de contaminação no início das culturas.

A contaminação depende do material vegetal (explante) a ser utilizado. Quando proveniente do campo, traz consigo elevado número de microorganismos em relação aos explantes retirados de plantas mantidas em sala de crescimento (Sato et al., 2001).

Os pré-tratamentos aplicados na planta matriz são fatores cruciais para o sucesso do estabelecimento do explante *in vitro*, principalmente no que se refere aos microorganismos endógenos (Grattapaglia & Machado, 1998). Teixeira (2004) afirma que a contaminação bacteriana ou fúngica é um dos maiores problemas para a fase inicial da micropropagação, impedindo o estabelecimento *in vitro* do explante.

Grattapaglia & Machado (1998), comentam que a contaminação de explantes na micropropagação geralmente ocorre devido à presença de microorganismos na superfície ou no interior do explante, além, é claro, de possíveis erros cometidos pelos operadores no momento da assepsia.

Várias substâncias podem ser utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os compostos mais comumente utilizados são o etanol (que remove parcialmente as ceras hidrofílicas e a resina, melhorando o contato das demais substâncias com o explante), o hipoclorito de sódio e o hipoclorito de cálcio. Ainda podem adicionar algumas gotas de detergente às soluções à base de cloro para melhorar o contato destas com o tecido (Bonga & Aderkas, 1992).

O etanol é geralmente utilizado a 70% a 80% (v/v) por alguns segundos e as concentrações mais comuns de cloro vão de 0,5% a 2,0% de cloro ativo, podendo o tratamento durar até 40 minutos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Quando não se tem uma desinfestação eficiente pelo método usual com etanol e hipoclorito de sódio, podem ser utilizadas substâncias como fungicidas e bactericidas no meio de cultivo para melhorar a eficiência da desinfestação (Alves Júnior et al., 2003).

A utilização de fungicidas, como o benomil, no meio de cultura auxilia o controle da contaminação proveniente de fungos endofíticos, os quais geralmente não são removidos na desinfestação superficial do explante (Shields et al., 1994).

Os explantes a serem desinfestados podem ser mantidos em água corrente por algumas horas para uma lavagem superficial de partículas de poeira e outras fontes de contaminações superficiais. O processo de desinfestação deve ser realizado em câmara de fluxo laminar em condições assépticas, utilizando vidrarias previamente esterilizadas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), outro problema freqüentemente encontrado durante o estabelecimento de um explante é a oxidação de compostos fenólicos que são liberados pelas células danificadas com o corte. Este é um problema sério que afeta, principalmente, espécies lenhosas. Melo et al. (2003) comentam que o escurecimento do meio de cultura

é devido à oxidação dos compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante.

Existem várias técnicas para se reduzir o problema de oxidação. Dentre elas, pode-se utilizar a lavagem em água corrente, o uso de antioxidantes (PVP - polivinilpirrolidona, ácido ascórbico, ácido cítrico ou carvão ativado), a incubação dos explantes no escuro, a utilização de meios de cultivo mais diluídos, a transferência freqüente de meio, a lavagem do material vegetal em água corrente, entre outros (Grattapaglia & Machado, 1998; Melo et al., 2003).

A redução da luminosidade, a diminuição na concentração de sais e a adição de antioxidantes no meio de cultura têm sido mais comumente utilizados, para o controle da oxidação fenólica em espécies lenhosas (Marks & Simpson, 1990; Caldas et al., 1998).

Teixeira (2004) relata que as plantas lenhosas são consideradas ricas em compostos fenólicos, por serem importantes no metabolismo destas espécies, além de seu uso na defesa contra predadores e microrganismos.

Fatores que podem influenciar na oxidação fenólica de um explante incluem a época, o genótipo da planta matriz e o tipo de explante (Teixeira, 2004).

2.6 Enraizamento *in vitro*

O enraizamento constitui uma etapa essencial para muitas espécies propagadas *in vitro*, sendo esta necessária para que a plântula sobreviva à aclimatização (Hartmann, 1990). A obtenção de uma plântula com um sistema radicular bem desenvolvido é essencial para a sua sobrevivência e crescimento nas condições ambientais (Pio et al., 2002).

O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, que permite a constituição de plantas

completas, para posterior aclimatização em condições *ex vitro* (Centellas et al., 1999; Grattapaglia & Machado, 1998).

Dentre as substâncias reguladoras de crescimento, as auxinas exógenas têm participação fundamental no processo da rizogênese, principalmente nas espécies lenhosas, que possuem dificuldades para enraizar (Gaspar & Hofinger, 1988). Em geral, a rizogênese é induzida pela presença isolada de auxina ou em combinação com uma citocinina em baixa concentração (Santana, 2003).

Geralmente, a rizogênese ocorre dentro de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongação. As duas primeiras fases respondem positivamente ou dependem de auxinas, embora a alongação possa ser inibida pela sua presença (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para se evitar a inibição de enraizamento pela presença constante da auxina no meio, tem sido adotada a estratégia de manter os explantes por um período curto na presença desta substância. Em seguida, faz-se a inoculação em um novo meio sem regulador de crescimento (George & Sherrington, 1984).

As auxinas sintéticas ANA, AIA, AIB e 2,4-D, em baixas concentrações, são, geralmente, as mais utilizadas para a indução de raízes adventícias (Pierik, 1990).

Radmann et al. (2003) afirmam que a luminosidade é um fator que também pode influenciar a rizogênese *in vitro*. Estes autores ainda relatam que a luminosidade nem sempre é benéfica para a indução e o desenvolvimento de raízes, podendo a exposição das brotações a um período de escuro melhorar a formação de raízes.

2.7 Aclimatização

O processo de aclimatização é imprescindível para um eficiente protocolo de micropropagação. Ele compreende a fase ou estágio no qual a planta produzida *in vitro* é transferida para um ambiente de transição ou

ambiente natural (Debergh & Maene, 1981). A elevada perda de plântulas nesta fase constitui um problema para algumas espécies. Fatores como genótipo, estresse hídrico, alteração do metabolismo heterotrófico (*in vitro*) para autotrófico, infecção por patógenos e estresse pela luz, além das variações de temperatura, interferem no sucesso da aclimatização.

Segundo Brainerd & Fuchigami (1981), a transpiração excessiva por todas as partes da plântula, principalmente pelas folhas e a inadequada absorção de água pelas raízes são as principais causas de estresse nesta fase. Outros fatores a serem considerados são a incapacidade das plântulas em controlar o fechamento e a abertura dos estômatos (Sutter, 1988) e o aumento do seu número por área foliar (Brainerd & Fuchigami, 1981), fatores induzidos pela condição de alta umidade e baixa irradiância, presentes no ambiente *in vitro*.

O período de aclimatização, que varia de uma a quatro semanas, tem por objetivo corrigir as alterações ou anormalidades, induzidas no período de desenvolvimento *in vitro*. Nesta fase, ocorre a transição entre o metabolismo heterotrófico para o autotrófico e o desenvolvimento do controle de perda e absorção de água, devendo a plântula passar, neste período, por um gradual aumento da irradiação e diminuição da umidade relativa (Smith et al., 1986).

2.8 Aspectos da anatomia foliar

A anatomia foliar em plantas micropropagadas é de grande importância, pois, por meio de estudos comparativos do desenvolvimento de seus tecidos e estruturas adaptativas, como espessura de cutícula, disposição de células, dimensão e número de estômatos, entre outros, pode-se estabelecer um padrão que lhe confira a adaptação a determinadas condições, como a fase de aclimatização. Estes estudos podem servir de base para pesquisas relacionadas ao desenvolvimento durante a aclimatização, a qual se caracteriza por uma

elevada taxa de mortalidade, muitas vezes inviabilizando a micropropagação de algumas espécies.

Segundo Pierik (1990), plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam cutícula pouco desenvolvidas, bem como mecanismo de abertura e fechamento de estômatos pouco funcionais e uma fraca conexão vascular entre o sistema radicular e as brotações, tornando-as muito suscetíveis ao estresse hídrico durante a aclimatização.

Larcher (2000) relata que as respostas de controle da abertura estomática diferem de acordo com as condições ambientais preponderantes durante o desenvolvimento da folha, como o comportamento anormal do aparato estomático sob condições de alta umidade durante o desenvolvimento foliar.

De acordo com Sutter & Langhans (1979), as folhas novas produzidas durante a aclimatização possuem anatomia de transição, que pode conferir maior habilidade fotossintética e maior capacidade de regulação hídrica às plantas.

De acordo com Preece & Sutter (1991), a elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando estas são submetidas a condições adversas, como o ambiente natural.

O estudo anatômico de órgãos vegetativos das plântulas cultivadas *in vitro* pode fornecer informações para o controle da morfogênese e auxiliar na eficiência de protocolos de micropropagação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal e no Laboratório de Anatomia Vegetal do Setor de Botânica Estrutural, pertencentes ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, em 2003 e 2004.

3.1 Germinação *in vitro*

As sementes foram obtidas de frutos de cagaiteira coletados na região de Bom Despacho, MG, em setembro de 2003. Em câmara de fluxo laminar, após serem despolidas, lavadas em água corrente e secas parcialmente à sombra, elas foram imersas em álcool 70% por 60 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 0,5% de cloro ativo por 15 minutos. Então foram enxaguadas três vezes, em água destilada e autoclavada, tendo parte delas retiradas de seus tegumentos e novamente imersas em álcool 70% por 15 segundos e solução de hipoclorito de sódio 0,3% de cloro ativo por 5 minutos e, em seguida, lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada.

Sementes intactas e sementes sem tegumento foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e 30 g L⁻¹ sacarose. Os meios foram solidificados com ágar 0,7% e o pH foi aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, as sementes foram mantidos em sala de crescimento, no escuro ou na luz (irradiância de fótons de 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h) e em temperatura de 27 \pm 2°C. A porcentagem de germinação acumulada foi avaliada aos 34, 71 e 150 dias após a inoculação, sendo também contabilizado o número de sementes germinadas com má formação.

O experimento foi realizado em esquema fatorial 2 x 2 (com e sem tegumento e na luz e no escuro), constituído de cinco repetições, sendo cada

uma composta por 40 tubos de ensaio e cada tubo contendo uma semente. O teste de médias utilizado foi o de Scott Knot, a 5% de probabilidade.

3.2 Desinfestação de explantes foliares obtidos de plantas cultivadas em sala de crescimento

Folhas obtidas de plantas germinadas em sala de crescimento, com aproximadamente 120 dias, foram imersas em álcool 70% durante 0, 15, 30 e 60 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 10, 15 e 20 minutos.

Após a desinfestação, explantes foliares com aproximadamente 0,5 cm² foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Lloyd & Mc Cown, 1981) e 30 g L⁻¹ sacarose. Os meios foram solidificados com ágar 0,7% e o pH foi aferido para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 30 μmol m⁻²s⁻¹, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 27 ± 2 °C. A avaliação foi realizada após 7 dias de incubação, sendo observado o percentual de contaminação.

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial 4 x 3, constituído de 6 repetições, sendo cada uma composta por 6 tubos de ensaio e cada tubo contendo um explante.

3.3 Efeito do BAP e ANA na organogênese em segmentos nodais

Segmentos nodais com 10 mm de comprimento, obtidos de plântulas estioladas germinadas *in vitro* com aproximadamente 120 dias, foram inoculados em meios de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose e 50 mg de ácido ascórbico. Os meios foram solidificados com 0,7% de ágar e tiveram seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a



120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os tubos foram fechados com tampa plástica e lacrada com filme de PVC, sendo estes, mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C de temperatura, irradiância de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Foram avaliados os números de brotações maiores que 5mm, o número total de brotações, o número de folhas e a presença de calos aos 45 dias após a inoculação.

O experimento foi instalado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante. Os dados foram analisados pelo intervalo de confiança proporcional a 5% de probabilidade.

Como interesse era de detectar diferença entre os tratamentos, nos quais é possível contar o número de sucessos, ou seja, o número de brotações, folhas, etc., em cada tratamento, pode-se admitir que os dados seguem uma distribuição Poisson.

Assim, é possível construir intervalos de confiança para a média de brotações em cada tratamento, com nível de significância de 5%, sendo dado por:

$$IC = \left[\frac{1}{2n} \chi^2_{\text{onde } 1 - \frac{\alpha}{2}} \text{ e } \nu = 2k \quad ; \quad \frac{1}{2n} \chi^2_{\text{onde } \frac{\alpha}{2}} \text{ e } \nu = 2k + 2 \right]$$

Em que IC é o intervalo de confiança, n é o número de repetições de cada tratamento e k é o número de sucessos, ou seja, de brotações em cada tratamento.

3.4 Enraizamento *in vitro* de brotações

Brotações com 15 mm de comprimento, obtidas a partir de segmentos nodais *in vitro*, foram inoculadas em meios de cultura WPM e WPM com 50% de sua concentração original de sais, contendo diferentes concentrações de AIB (0; 1,5; 3 e 4,5 mg L⁻¹), 20 g L⁻¹ de sacarose e 3 g L⁻¹ de carvão ativado. Os meios foram solidificados com 0,7% de ágar e tiveram seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 27 ±2 °C de temperatura e na ausência de luz. Aos 35 dias após a inoculação, foram avaliados o número e o comprimento de raízes.

O experimento foi realizado utilizando o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por três tubos de ensaio, cada um contendo uma brotação.

3.5 Indução de calos em explantes foliares

Explantes foliares (0,5 cm²) extraídos de plântulas obtidas da germinação *in vitro* foram inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio nutritivo em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS suplementado com diferentes combinações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 e 8 mg L⁻¹) e TDZ (Thidiazuron) (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4 mg L⁻¹) e acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e seu pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. A incubação ocorreu no escuro e em temperatura de 27 ±2°C. A avaliação foi realizada aos 45 dias após a inoculação.

O experimento foi realizado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por três tubos de ensaio contendo um explante por tubo.

3.6 Indução de calos em segmentos nodais

Segmentos nodais estiolados com aproximadamente 10 mm de comprimento, extraídos de plântulas obtidas por meio da germinação *in vitro*, foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0; 1; 2; 3; 4; 5 e 6 mg L⁻¹) e 30 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi solidificado com 0,7% de ágar e o pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. A incubação foi realizada no escuro e em temperatura de 27 ± 2°C. A avaliação foi feita 30 dias após a inoculação, observando-se a porcentagem da área do explante ocupada por calos e o peso médio.

O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio contendo um explante. Os dados foram submetidos ao teste de médias de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

3.7 Plasticidade anatômica das folhas de cagaiteira

Foram utilizadas, para este estudo, folhas do segundo nó de ramos de plantas cultivadas a campo (folhas coletadas na região do terço médio de sua copa), cultivadas em sala de crescimento e cultivadas *in vitro* por 120 dias e por um ano. As plantas cultivadas em sala de crescimento tinham, aproximadamente, 120 dias de idade. As folhas, ao serem coletadas, foram fixadas em álcool 70 % e submetidas a cortes histológicos para estudo.

O estudo anatômico baseou-se no exame microscópico de seções obtidas à mão livre, com o auxílio de lâmina de aço. Estas foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio a 20% do produto comercial, por um período que variou de um a dois minutos. E em seguida, foram lavadas em água destilada e montadas em glicerina a 50% após coloração.

Para a avaliação dos tecidos foliares (espessura da epiderme adaxial e abaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso), foram realizados cortes transversais, os quais foram corados com azul de astra-safranina, segundo os métodos descritos por Kraus & Arduin (1997). A partir das seções transversais, foram efetuadas três medições de 5 plantas, com o auxílio de ocular micrométrica.

Para os estudos relativos à caracterização dos estômatos (número médio por mm^2 e diâmetro equatorial e polar) foram realizados cortes paradérmicos na região mediana das folhas, na epiderme abaxial, os quais foram montados em lâminas contendo safranina e água glicerinada. As observações foram realizadas com o auxílio de câmara clara, em microscópio Olympus CBB, segundo técnica de Labouriau et al. (1961). Na região mediana da lâmina foliar foram observados 4 campos, totalizando 20 campos por tratamento.

Fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus BX 60, utilizando filme ASA 100 colorido, no Laboratório de Citologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

As medições de espessuras, densidade estomática (estômatos por mm^2) e diâmetro polar e equatorial dos estômatos foram analisadas utilizando-se delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por três medidas para espessura e quatro para densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos. As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.8 Acclimatização e aspectos morfofisiológicos

Foram utilizadas para este estudo plantas estabelecidas *in vitro* por 120 dias, em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose solidificado com 0,7% de ágar e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. A acclimatização foi conduzida em salas de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e irradiância de fótons de $60 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por um conjunto de lâmpadas fluorescentes. As plantas foram acclimatizadas em tubetes com volume de 250 mL. Para o controle da umidade foram feitas câmaras úmidas individuais com sacolas de polietileno transparente, as quais foram gradativamente sendo abertas durante a acclimatização (Figura 4).

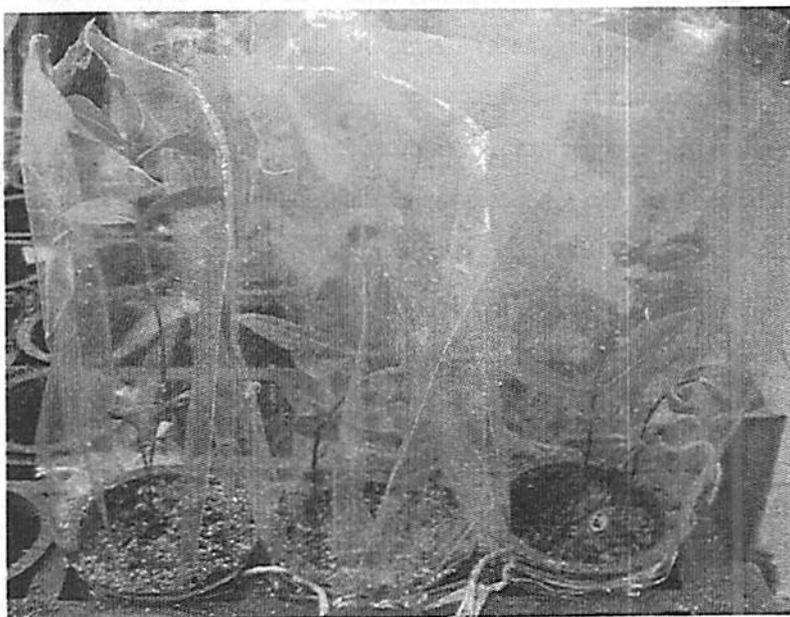


FIGURA 4 Plântulas de cagaiteira em acclimatização (Fotos: Martinotto, 2004)

Os tratamentos foram constituídos de três tipos de substratos: Plantmax, Plantmax + vermiculita (1:1) e Plantmax + húmus de minhoca (1:1) e de 3

tempos de aclimatização: plântulas *in vitro* (T1), 7 dias de aclimatização (T2) e 28 dias de aclimatização (T3). Antes de serem utilizados, foram submetidos a autoclavagem a 120°C por 25 minutos. A análise química dos substratos se encontra na Tabela 1.

Foram utilizadas, para este estudo, folhas do segundo nó a partir da gema apical. As medições de espessuras, densidade estomática (estômatos por mm²) e diâmetro polar e equatorial dos estômatos foram analisadas utilizando-se delineamento de parcelas subdivididas no tempo com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por três medidas para espessura e quatro para densidade estomática e diâmetro polar e equatorial dos estômatos. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A análise de crescimento foi realizada por meio da contagem direta do número de folhas vivas e medida da altura do maior broto ao final do experimento. Os dados foram transformados para $(X+1)^{-0.5}$ e submetidos ao teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 1 Análise química dos substratos utilizados no experimento (Laboratório de Análise de Solos, UFLA, Lavras, MG)

Fatores	Plantmax	Plantmax + vermiculita	Plantmax + húmus	Unidade
pH em água	5,0	6,0	6,0	-
P	523,3	320,0	676,3	mg dm ⁻³
K	152,0	152,0	152,0	
Ca	17,0	13,7	14,3	cmol _c dm ⁻³
Mg	5,4	6,3	10,3	
Al	0,3	0,0	0,0	
H + Al	5,0	2,3	2,6	
MO	6,7	5,3	6,0	dag kg ⁻¹
Zn	5,3	3,5	16,4	mg dm ⁻³
Fe	258,0	140,5	124,0	
Mn	34,0	22,2	128,0	
Cu	1,0	0,8	8,5	
B	1,5	1,0	0,9	
S	20,1	34,4	26,2	

A eficiência fotoquímica do FSII (Fv/Fm) foi avaliada por meio de um fluorômetro portátil (Plant Efficiency Analyser – PEA) (Hansatech Instruments Ltda). A razão Fv/Fm, em que Fv = Fm-Fo, sendo Fm = fluorescência máxima; Fv = fluorescência variável e Fo = fluorescência mínima, foi avaliada em folhas pré-acondicionadas no escuro por uma hora, pela medição da fluorescência rápida *in vivo*, as quais foram posteriormente coletadas para estudos de anatomia. Foram tomadas cinco leituras de cada tratamento, simultaneamente com as coletas de folhas para estudos anatômicos da aclimatização de plântulas. As médias foram comparadas pelo teste de médias de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação *in vitro*

De acordo como a análise de variância (Tabela 2), foi observado um efeito significativo da luz, da retirada do tegumento e de sua interação no total de sementes de cagaiteira germinadas *in vitro*, aos 34 dias após a inoculação e no número de plântulas com má formação. Aos 71 dias após a inoculação, foi verificado efeito significativo apenas para a retirada do tegumento e para a interação entre a retirada do tegumento e a luz. Aos 150 dias de cultivo, não foi observada influência destes tratamentos no número de sementes germinadas.

TABELA 2 Análise de variância para o valor acumulado da germinação *in vitro* de sementes germinadas em três tempos e total de plântulas com má formação

FV	GL	Quadrados médios			
		34 dias	71 dias	150 dias	Anormais
Escar	1	24851,3**	7125,31**	0,3125	12500,00**
Luz	1	151,25**	165,31	2,81	180,00**
Escar * Luz	1	320,00**	340,31**	25,31	320,00**
Erro	16	26,25	44,06	31,40	33,90
Total	19	25742,5	8335,93	530,93	13542,50
CV%		10,05	9,57	6,32	16,17

** Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F
Escar = Escarificação

O efeito da luz se pronunciou apenas em sementes com tegumento e aos 34 e 71 dias após a inoculação. Tal influência, provavelmente, está relacionada com a fotodegradação de compostos inibidores presentes no tegumento, acelerando a germinação. Alguns autores citam a degradação de compostos fenólicos através da luz (Tiburtius, 2004; Zioli & Jardim, 1998).

Alguns inibidores de crescimento são substâncias de natureza fenólica, como o ácido salicílico, o ácido cumárico, o ácido clorogênico e a cumarina, as quais podem retardar processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como o alongamento de raízes e caules, a germinação de sementes e o brotamento de gemas (Von-Pinho et al., 2004). Edwards (1973) também observou, em café, que a presença de compostos fenólicos no tegumento controla a entrada de oxigênio na semente, diminuindo ou mesmo impedindo a chegada deste ao embrião, retardando seu desenvolvimento.

Aos 150 dias da inoculação, o efeito da luz sobre a germinação foi mascarado, provavelmente, pela superação de alguma inibição presente na semente. Rizzini (1970) verificou que o extrato do embrião de cagaiteira em germinação e o extrato do tegumento de suas sementes são capazes de inibir fortemente a germinação de feijão-preto.

Quanto ao efeito do tegumento, sementes desprovidas dele apresentaram germinação superior aos 34 e 71 dias após a inoculação (86,25% e 88,25% de germinação, respectivamente). Dombroski (1997) cita o efeito inibitório do endocarpo na germinação de sementes de pequizeiro.

Rizzini (1971), estudando a germinação de sementes de cagaiteira, verificou um efeito retardador do tegumento na velocidade de germinação, sendo proporcional ao grau de integridade deste tegumento. O mesmo relaciona esta dormência com a impermeabilidade ao ar quando embebidas, causando deficiência em oxigênio ao embrião.

Na Figura 5, observa-se a interação entre os tratamentos, observando-se a superioridade na germinação de sementes cujo tegumento foi retirado.

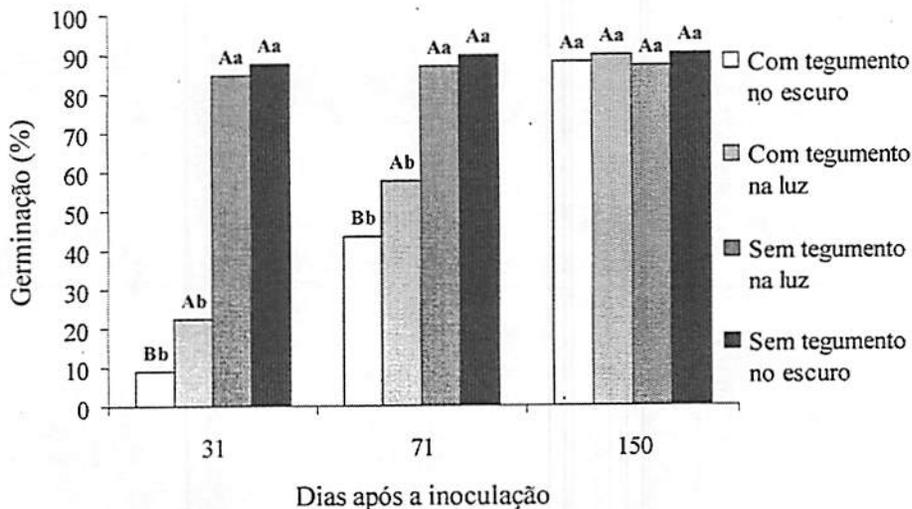


FIGURA 5 Interação entre a condição de luz e a retirada do tegumento durante a germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira. Médias, para mesma data, seguidas de mesma letra maiúscula (efeito da luz) e minúscula (efeito da retirada do tegumento), não apresentam diferença estatística significativa pelo Teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Embora aos 150 dias da inoculação não tenha sido observada diferença estatística significativa para porcentagem de germinação, esta prática proporcionou uma germinação mais uniforme e mais rápida. Além disso, sementes germinadas *in vitro* com a presença de tegumento apresentaram elevada ocorrência de plântulas com má formação, levando-as, posteriormente, à morte (Figura 6).

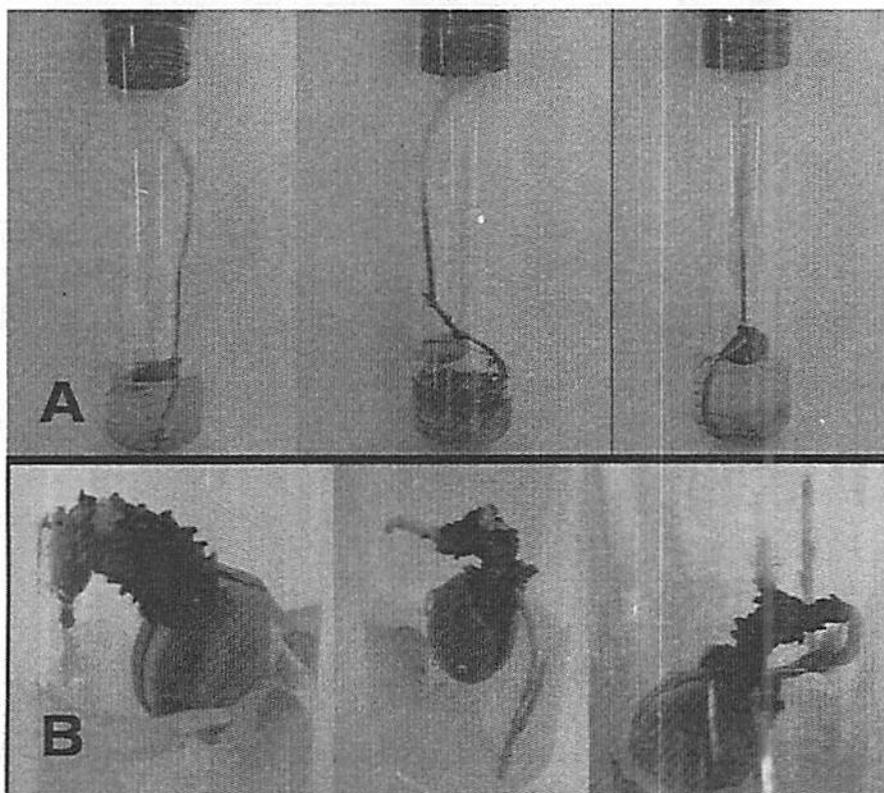


FIGURA 6 Sementes germinadas *in vitro*. Normais (A) e com má formação (B) (Fotos: Martinotto, 2004)

A Tabela 3 apresenta a interação do efeito da luz e da retirada do tegumento na porcentagem de plântulas com má formação do total de sementes germinadas.

TABELA 3 Quadro de médias da porcentagem de plântulas germinadas com má formação quanto à interação entre os tratamentos

Tegumento	Luz	Escuro
Presente	68 Aa	54 Ab
Ausente	10 Ba	12 Ba

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não apresentam diferença estatística significativa, pelo Teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Por meio da análise da interação da luz com a retirada do tegumento, quanto à germinação e ao número de plântulas com má formação, pode-se afirmar que o melhor tratamento para a germinação *in vitro* foram sementes desprovidas de tegumento germinadas tanto na presença quanto na ausência de luz, apresentando apenas 10% e 12% de plântulas com anomalias aos 150 dias da inoculação e 85% e 87,5% de sementes germinadas aos 31 dias da inoculação, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Coelho (1999), em estudos de germinação de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.). A autora observou germinação mais rápida e uniforme e com maior desenvolvimento posterior da plântula em sementes desprovidas de tegumento em relação a sementes com tegumento seccionado. Nogueira (2003), testando o efeito do BAP na germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), observou elevada produção de plântulas anormais, mesmo no tratamento sem o regulador.

4.2 Desinfestação de explantes foliares obtidos de plantas cultivadas em sala de crescimento

A análise de variância (Tabela 4) demonstrou que o uso do hipoclorito de sódio e do álcool 70%, bem como a interação destes, foram significativos para a desinfestação dos explantes foliares de cagaiteira retirados de plantas cultivadas em sala de crescimento. Estes resultados estão de acordo com Bonga & Aderkas (1992), que indicam o etanol e o hipoclorito de sódio como substâncias eficientes e mais comumente utilizadas na desinfestação de explantes.

TABELA 4 Análise de variância da porcentagem de contaminação dos explantes, em função dos tratamentos de desinfestação aplicados

FV	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Hipoclorito de Sódio	2	14411,62	7205,81	34,19	0,0000**
Álcool	3	8996,65	2998,88	14,23	0,0000**
Hipocl. * Álcool	6	5627,25	937,87	4,45	0,0009**
Erro	60	12643,94	210,73		
Total	71	41679,47			
CV (%):	50,16				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

Em relação ao efeito isolado de diferentes tempos de exposição do explante foliar ao hipoclorito de sódio (1% v/v), a imersão por 20 minutos apresentou a menor porcentagem de contaminação (15,98%).

Para o efeito isolado da imersão em etanol 70%, obteve-se melhor resultado utilizando-se 60 segundos de exposição, com apenas 11,11% de contaminação, diferindo este dos demais tempos de exposição de 0, 15 e 30

segundos, os quais apresentaram taxas de contaminação de 37,98%, 27,8% e 38,9%, respectivamente.

Pela avaliação do efeito da interação entre o hipoclorito de sódio e álcool 70% (Tabela 5), observou-se que o melhor tratamento de desinfestação é a imersão dos explantes em álcool 70% por 60 segundos, seguido da imersão em hipoclorito de sódio a 1% por 20 minutos, o que proporcionou a obtenção de 94,34% de explantes desinfestados.

TABELA 5 Quadro de médias do resultado da porcentagem de explantes contaminados obtidos em relação à interação entre o hipoclorito de sódio e álcool 70%

	Hipoclorito de sódio 10 minutos	Hipoclorito de sódio 15 minutos	Hipoclorito de sódio 20 minutos
Álcool 0 segundos	52,79 Bb	30,56 Ab	30,56 Ab
Álcool 15 segundos	55,57 Bb	13,89 Aa	13,89 Aa
Álcool 30 segundos	72,24 Bc	30,56 Ab	13,89 Aa
Álcool 60 segundos	13,89 Aa	13,89 Aa	5,56 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não apresentam diferença estatística significativa, pelo Teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A utilização do álcool em tratamento precedente ao de hipoclorito de sódio apresentou efeito positivo no controle da contaminação (Figura 7). Os resultados demonstram que a eficiência do processo de desinfestação aumenta com a elevação do tempo de imersão dos explantes, tanto em álcool quanto em hipoclorito de sódio.

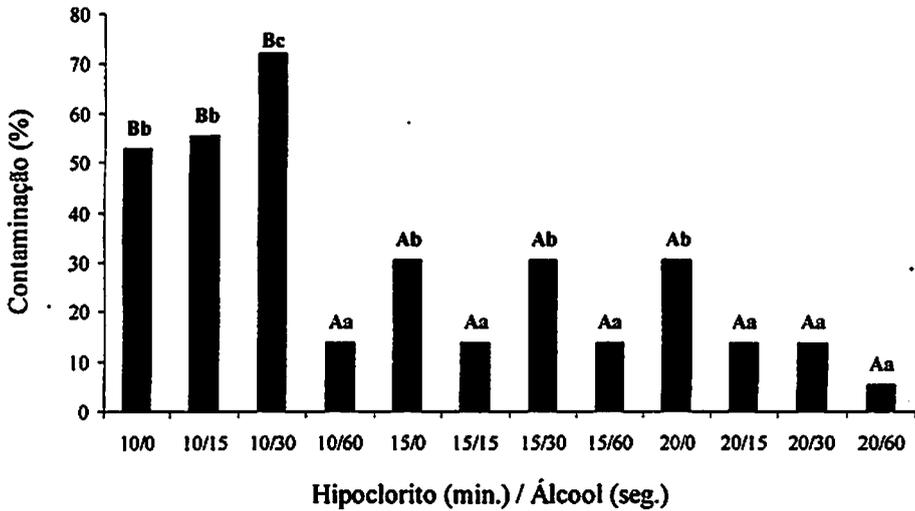


FIGURA 7 Contaminação nos explantes foliares de cagaiteira em relação aos tratamentos com álcool 70 % e hipoclorito de sódio

Grattapaglia & Machado (1998) comentam que o etanol 70% é geralmente utilizado na desinfestação de explantes em interação com o hipoclorito de sódio. Isto corrobora com os dados obtidos neste trabalho, os quais demonstram que a utilização do álcool 70%, juntamente com o hipoclorito de sódio, tem efeito sinérgico na desinfestação de explantes foliares de cagaiteira.

Outros autores também têm utilizado a combinação de álcool e hipoclorito de sódio no processo de desinfestação de explantes foliares de diversas espécies. Por exemplo, Cerqueira et al. (2002) utilizaram álcool 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio a 0,6%, durante 30 minutos, na desinfestação de explantes foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.). Paiva Neto (1996) obteve sucesso no controle da contaminação de explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud) através da imersão em álcool 50% por 30 segundos e seguida em hipoclorito de sódio por 5 minutos.

4.3 Efeito do BAP e ANA na organogênese em segmentos nodais

Não foi observada a formação de calos em segmentos nodais de cagaiteira nas concentrações de BAP e ANA utilizadas.

4.3.1 Brotações superiores a 5 mm

O maior número de brotações com tamanho superior a 5 mm (2,5 brotações por explante), aos 45 dias de inoculação, foi obtido utilizando-se 2,0 mg L⁻¹ de BAP acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ANA (Figura 8).

Brum (2001) também verificou o efeito positivo da combinação entre BAP e ANA no número de brotações na variedade de figueira Roxo de Valinhos, em que concentrações superiores a 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de ANA foram prejudiciais.

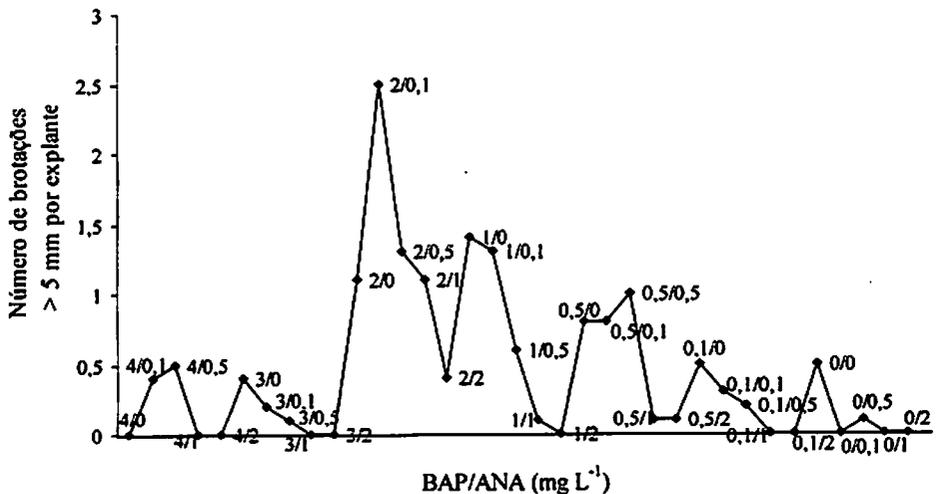


FIGURA 8 Número de brotações superiores a 5 mm, em função de diferentes combinações entre BAP e ANA

A interação entre BAP e ANA possibilitou um significativo aumento no número de brotações maiores que 5 mm (2,5 brotações por explante), em relação aos tratamentos com BAP (Figura 9) e ANA (Figura 10) isoladamente (0; 0,1; 0,5; 1; 2 mg L⁻¹ de ANA ou 0; 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4 mg L⁻¹ de BAP) apresentando, respectivamente, para as melhores concentrações 1,28 (2,0 mg L⁻¹ de BAP) e 0,79 (0,1 mg L⁻¹ de ANA) brotações por explante.

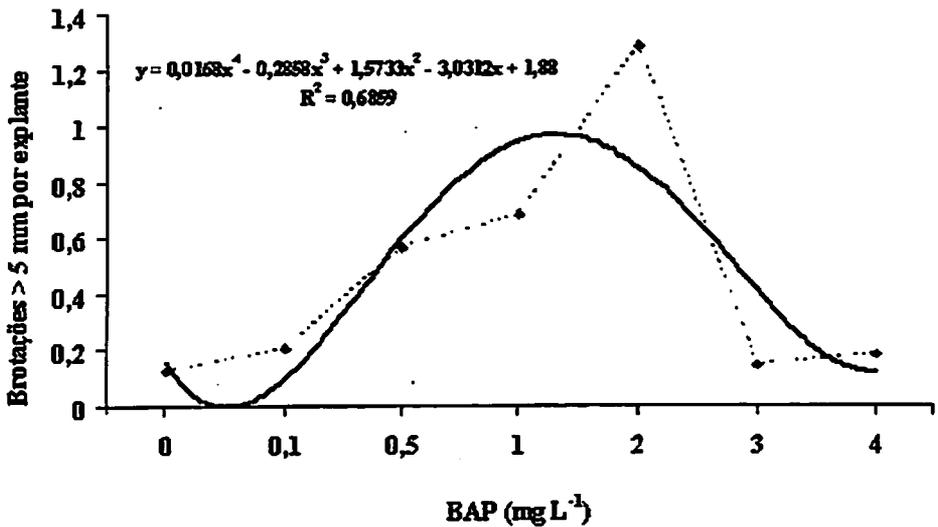


FIGURA 9 Efeito isolado do BAP no número de brotações maiores que 5 mm em segmentos nodais de cagaiteira

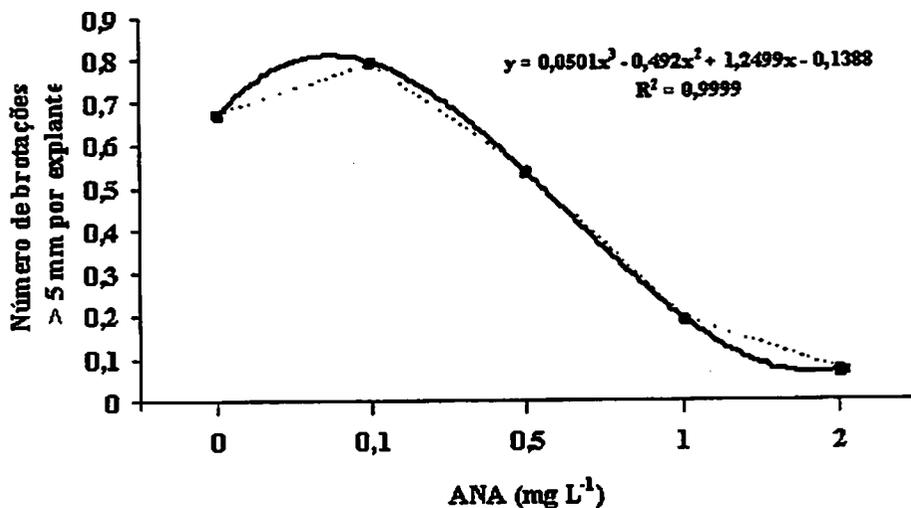


FIGURA 10 Efeito isolado do ANA no número de brotações maiores que 5 mm em segmentos nodais de cagaiteira

O aspecto visual das brotações obtidas em segmentos nodais de cagaiteira, em função do cultivo na presença de BAP e ANA, é demonstrado na Figura 11.

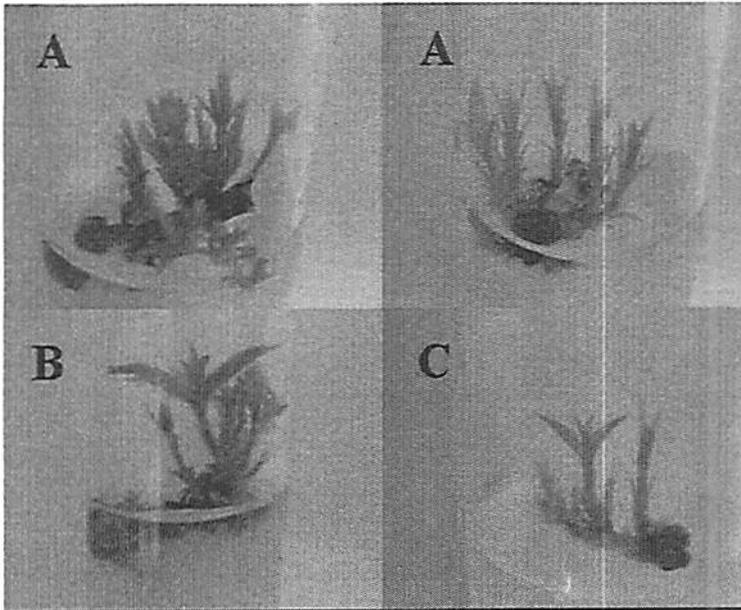


FIGURA 11 Aspecto visual de brotações obtidas em segmentos nodais de cagaiteira cultivadas na presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (A), $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (B) e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (C)

4.3.2 Brotações totais

O maior número de brotações totais por explante (4,4) também foi obtido inoculando-se segmentos nodais na presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (Figura 12).

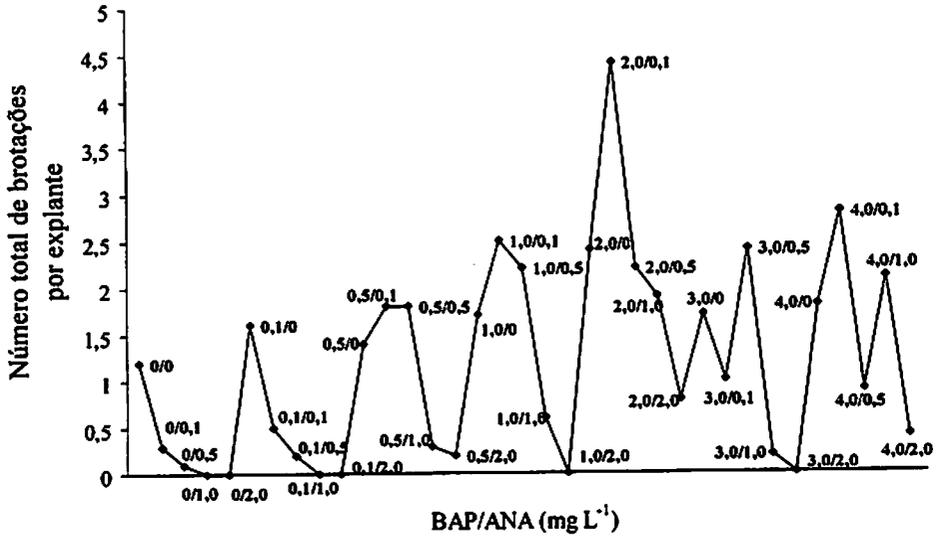


FIGURA 12 Número total de brotações, em função de diferentes combinações entre BAP e ANA

Esses resultados demonstram que o número de explantes superior a 5 mm pode duplicar quando submetidos a tratamentos para alongamento. Grattapaglia & Machado (1998) citam que o uso de giberelina no meio de cultura pode ser útil no alongamento de partes aéreas. Segundo Fráguas (2003), quando as brotações formadas são muito pequenas, é necessário maior tempo de permanência no meio de cultura sem citocinina para que ocorra o desenvolvimento adequado da parte aérea e do sistema radicular.

O efeito isolado da utilização de BAP e ANA sobre o número total de brotações são demonstrados nas Figura 13 e Figura 14.

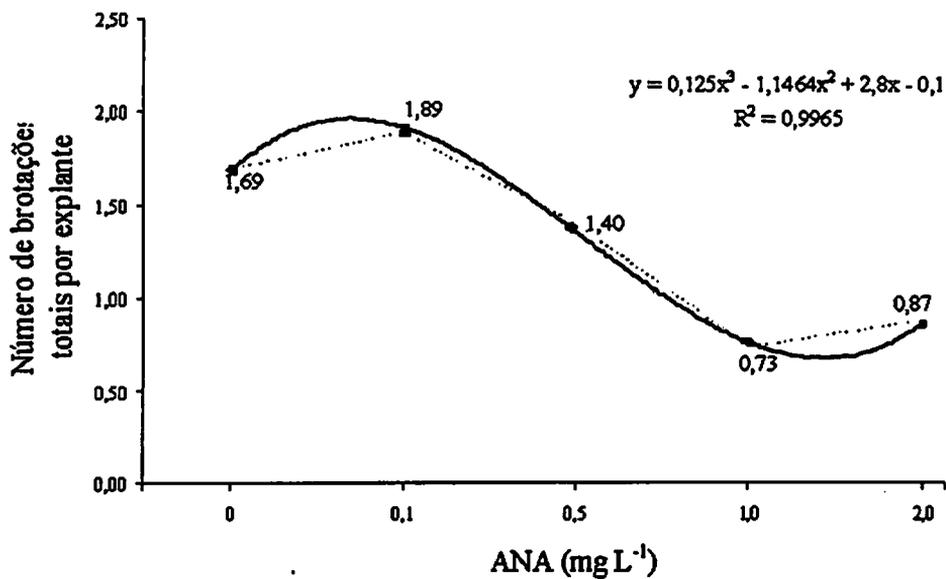


FIGURA 13 Efeito isolado do ANA no número de brotações totais em explantes nodais de cagaiteira

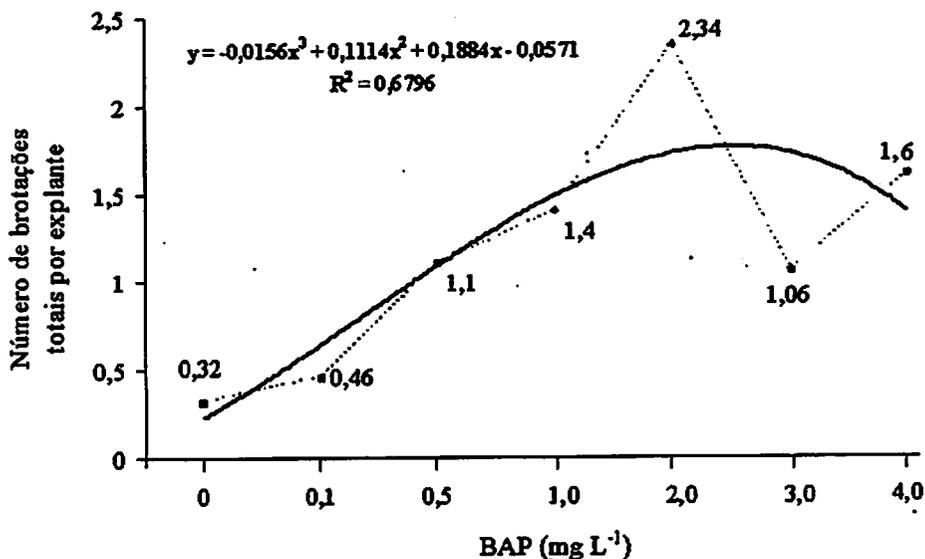


FIGURA 14 Efeito isolado do BAP no número de brotações totais em explantes nodais de cagaiteira

Foi observada uma pequena influência da posição do explante nas plântulas matrizes, com os explantes retirados da posição basal apresentando uma menor taxa de indução de brotações (41% do total de brotações). Provavelmente, este resultado representa o grau de diferenciação dos tecidos mais acentuado na região basal quando comparado aos da região apical, possibilidade essa já relatada por diversos autores (Pierik, 1990; Cachita-Cosma, 1991; Grattapaglia & Machado, 1998).

Foi observada a formação de raízes nos segmentos nodais inoculados em concentrações elevadas de ANA (2,0 mg L⁻¹), e na ausência de BAP (Figura 15). Não foi observada a formação de folhas quando concentrações superiores a 0,5 mg L⁻¹ de ANA foram utilizadas.

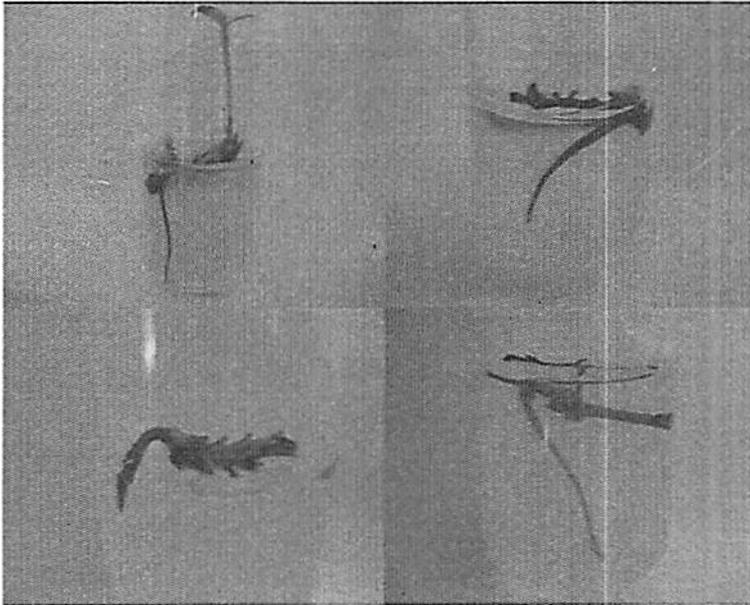


FIGURA 15 Formação de raízes em segmentos nodais de cagaiteira

4.4 Enraizamento *in vitro* de brotações

Não foi observada indução de raízes em brotações de cagaiteira provenientes do cultivo *in vitro* submetidas a tratamentos com AIB, aos 35 dias após inoculação.

Resultados semelhantes foram relatados por Nogueira (2003), em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) em que o AIB não foi eficiente para a indução de raízes.

A ausência de luz também não favoreceu a formação de raízes. Deccetti (2000) observou a formação de raízes em brotações de *Annona glabra* na ausência de regulador e presença de luz. Já Gomes (1999) obteve enraizamento de brotações de moreira (*Maclura tinctoria*), obtendo enraizamento em meio WPM 50% em pH 7,0 acrescido de 4,8 mg L⁻¹ de AIB e 4,7 g L⁻¹ de carvão ativado na presença de luz.

Embora Pasqual et al. (1998) comentem que diferentes concentrações de sais minerais utilizados nos meios de cultivo podem induzir efeitos significativos na rizogênese *in vitro*, a utilização do meio WPM e WPM com concentrações de sais reduzidas a 50% não proporcionou o enraizamento de brotações de cagaiteira.

Já Hu & Wang (1983) verificaram que altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento de brotações cultivadas *in vitro*, particularmente o crescimento de raízes e, conseqüentemente, a redução das concentrações de sais do meio de cultivo pode induzir um melhor enraizamento.

Nogueira (2003) sugere que, para murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), a ineficiência do AIB na indução de raízes pode estar ligada a concentrações endógenas de citocininas residuais da fase de multiplicação, desfavorecendo o balanço hormonal auxina/citocinina responsável pela indução do enraizamento. O mesmo pode ter ocorrido com as brotações de cagaiteira, sendo conveniente a utilização de concentrações maiores de AIB ou o uso de outro tipo de auxina, como o ANA, para estimular a rizogênese nesta espécie.

Pio et al. (2002) comentam que a formação de raízes bem desenvolvidas *in vitro* é de grande importância para a sobrevivência e adaptação das plântulas cultivadas *in vitro*. Assim, sendo o enraizamento uma etapa essencial para a continuidade do cultivo de várias espécies, o fato das brotações de cagaiteira não terem sido enraizadas *in vitro*, limita a formação de mudas por micropropagação, sendo necessários mais estudos nesta fase.

4.5 Indução de calos em explantes foliares

Apesar de ser conhecida a utilização do 2,4-D e do TDZ na indução e desenvolvimento de calos em explantes foliares em diversas espécies (Donato et al., 2000; Costa et al., 2002), eles não foram eficientes nas concentrações

utilizadas para a indução de calos em explantes foliares de cagaiteira. Assim, aos 45 dias de inoculação, não foi observada a formação de calos em explantes foliares inoculados na presença de 2,4-D e TDZ. Na Figura 16 observa-se o aspecto visual dos explantes foliares inoculados na presença de 2,4-D e TDZ.

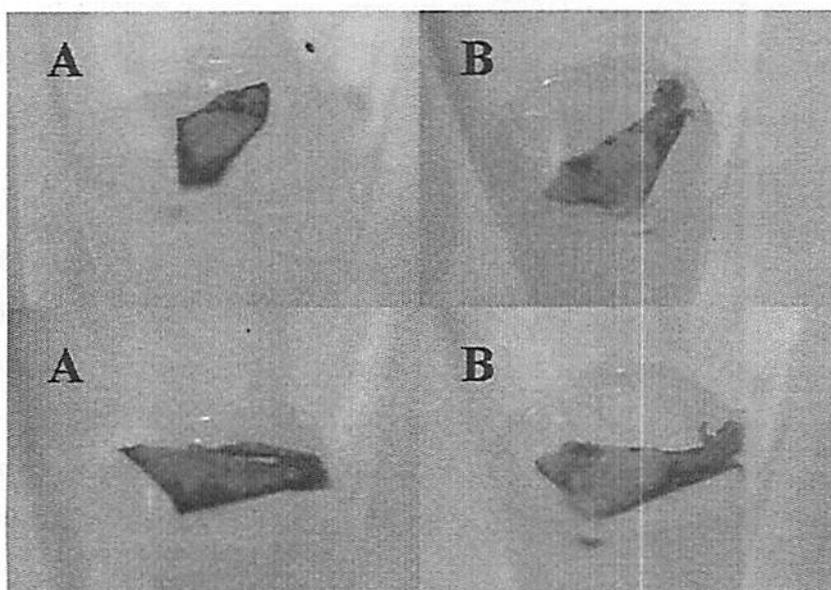


FIGURA 16 Aspecto visual de explantes foliares inoculados na presença de 2,4-D (A) e TDZ (B)

Em seus trabalhos com amoreira (*Morus alba* L.), Sahoo et al. (1997) também não conseguiram induzir calos em explantes foliares utilizando a auxina 2,4-D nas concentrações de 0,5 a 4,0 mg L⁻¹.

Já Nogueira (2003) relata que explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) não desenvolvem calos na ausência de 2,4-D e que também não é necessária a utilização de TDZ para o desenvolvimento destes.

As auxinas são amplamente utilizadas em meios de cultivo para a

indução de calos e o ponto determinante tem sido atribuído ao balanço entre auxinas e citocininas (George, 1993; Grattapaglia & Machado, 1998; Mantell, 1994).

A observação de que os explantes foliares de cagaiteira não respondem aos estímulos induzidos pela adição de 2,4-D e TDZ ao meio de cultura pode advir de um possível balanço endógeno auxina/citocinina desfavorável para o desenvolvimento de calos.

4.6 Indução de calos em segmentos nodais

Foram observadas diferenças estatísticas na porcentagem de explantes cobertos por calos e peso fresco dos calos (Tabela 6) em segmentos nodais inoculados na presença de 2,4-D.

TABELA 6 Análise de variância da utilização de 2,4-D na indução de calogênese

FV	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
2,4-D	6	0,022	0,003678	6,337	0,0000**
Erro	63	0,036	0,000580		
Total	69	0,058			

CV (%): 2,29

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F

A inoculação de segmentos nodais de cagaiteira na presença de 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D proporcionou valores máximos para porcentagem de área do explante coberta por calos e peso médio de calos, 70% e 0,179g, respectivamente (Tabela 7).

TABELA 7 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D no peso e porcentagem de área do segmento nodal coberta por calo

Concentração de 2,4-D (mg L ⁻¹)	% de área do segmento nodal coberta por calos	Peso dos calos (g)	
0,0	18,33	0,072	C
1,0	36,67	0,063	C
2,0	46,67	0,129	B
3,0	70,00	0,179	A
4,0	56,67	0,118	B
5,0	50,00	0,113	B
6,0	36,67	0,074	C

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a $p < 5\%$

O aumento da concentração de 2,4-D induziu um acréscimo na porcentagem de área do explante coberta por calos até a concentração de 3,0 mg L⁻¹. Concentrações superiores reduziram a formação de calos (Figura 17).

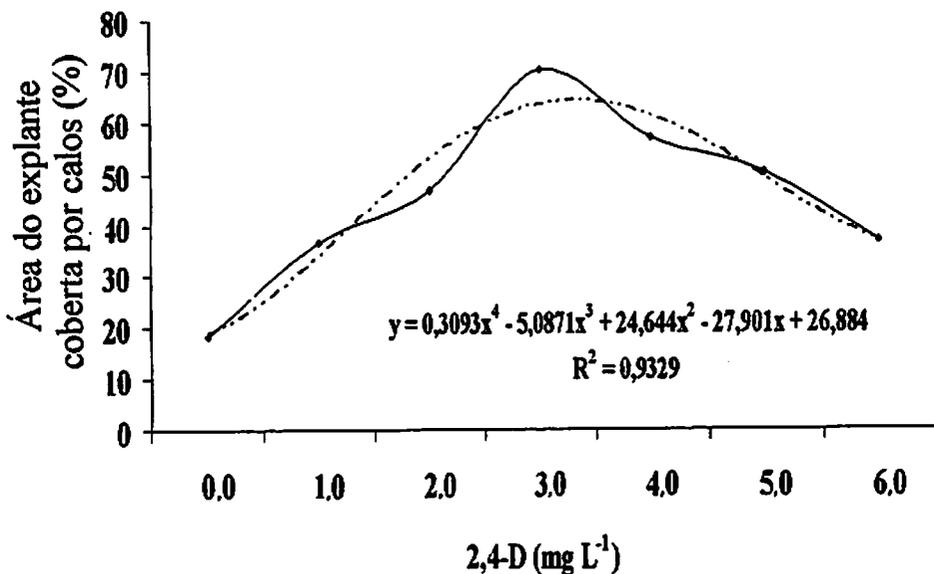


FIGURA 17 Efeito da concentração de 2,4-D na porcentagem de cobertura de calos sobre segmentos nodais

A utilização de concentrações superiores a 3,0 mg L⁻¹ ocasiona um decréscimo no peso fresco dos calos. Utilizando-se 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, apenas 0,079 g de calos, em média, é formado, representando um decréscimo de 59% em relação à concentração de 3,0 mg L⁻¹ com formação de 0,179 g (Figura 18 e Tabela 7).

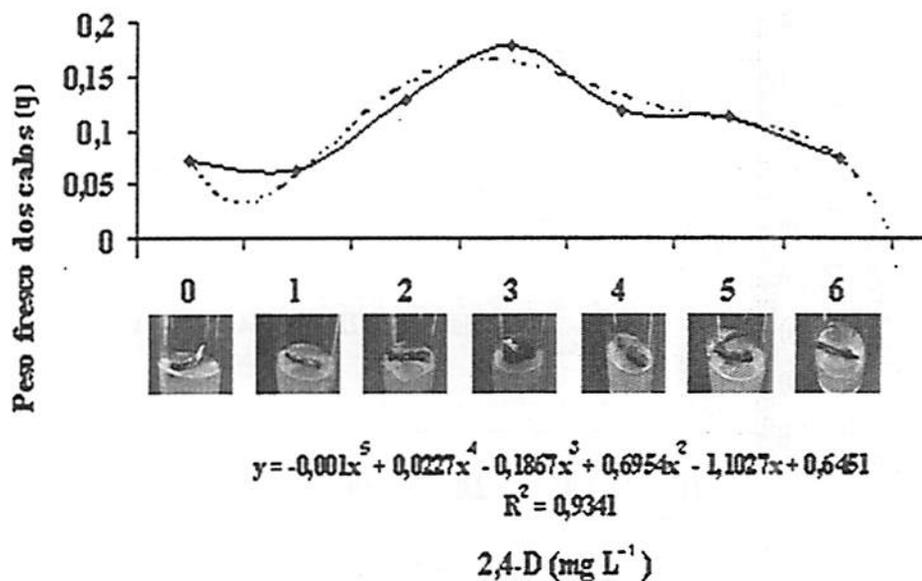


FIGURA 18 Efeito da concentração de 2,4-D no peso de calos em segmentos nodais de cagaiteira

Santos (2001) observou que concentrações superiores a 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D ocasionam a diminuição da porcentagem de formação e a redução do peso de calos induzidos a partir de explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana* Willd). Este autor também comenta que a redução da porcentagem de formação de calos e a diminuição do peso fresco dos calos com a utilização de altas concentrações pode estar relacionada à fitotoxidez causada pelo 2,4-D.

4.7 Plasticidade anatômica das folhas de cagaiteira

As folhas de cagaiteira, em todos os ambientes de cultivo, apresentaram organização dorsiventral e são hipostomáticas (Figura 19).

A nervura mediana da folha em seção transversal, em todos os ambientes de cultivo, apresentou feixe vascular bicolateral, circundado por fibras lignificadas (Figura 19). Ainda na nervura mediana no córtex, apresentou cavidades secretoras, sendo em número superior nas plantas a campo (Figura 19).

Foram observadas diferenças anatômicas entre os tecidos de folhas provindos do cultivo *in vitro* em sala de crescimento e de plantas de campo.

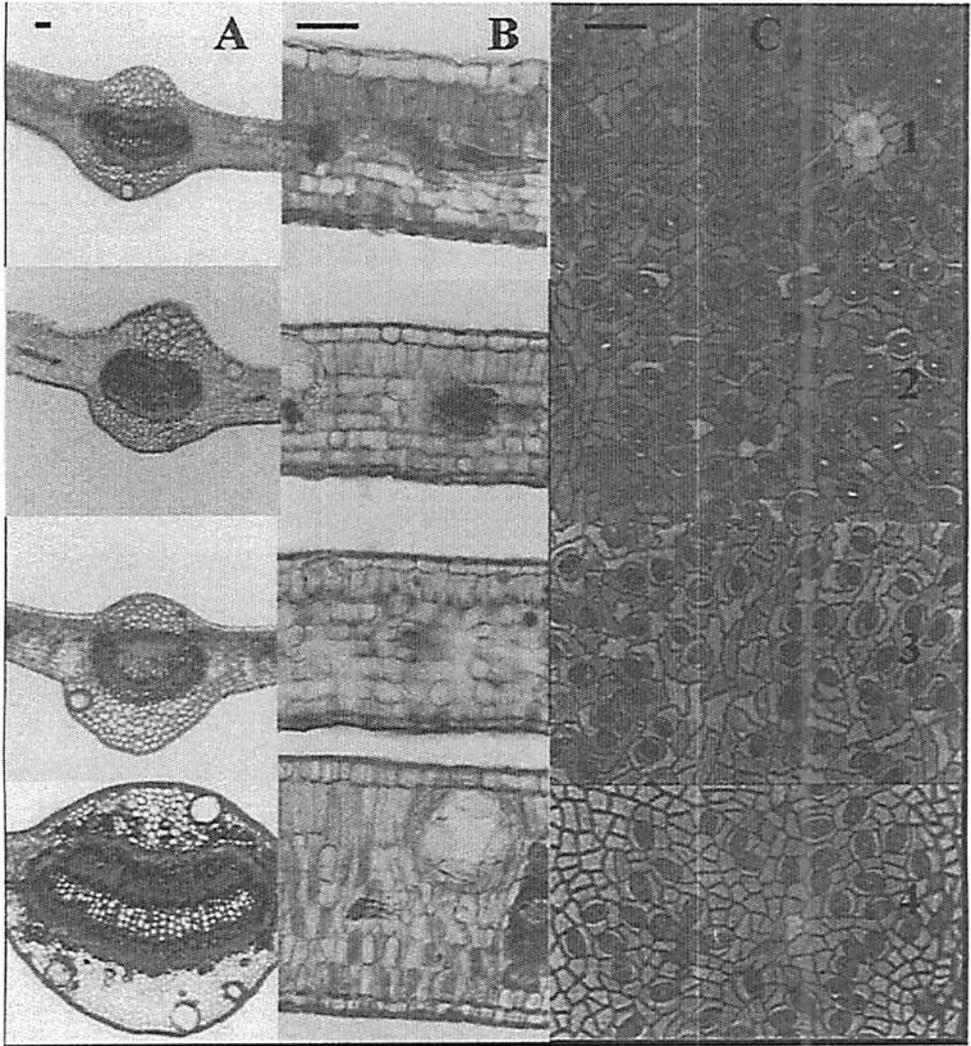


FIGURA 19 Fotomicrografias de seções transversais (coluna A- nervura central 10x; coluna B- limbo foliar 40x) e paradérmicos (coluna C- epiderme abaxial 40x) de folhas de cagaiteira cultivada em quatro ambientes (linha 1- *in vitro* por 120 dias; linha 2- *in vitro* por um ano; linha 3- sala de crescimento e linha 4- planta adulta a campo). (barras = 50 μ m)

Seções transversais das lâminas foliares de todos os ambientes de cultivo demonstraram que tanto a epiderme adaxial quanto a epiderme abaxial

apresentam-se uniestratificadas com células retas, com estômatos do tipo paracítico e agrupamentos de células epidérmicas circundando pares de células reniformes, associadas a cavidades oleíferas subepidérmicas (confirmado pelo teste histoquímico SUDAM IV) em ambas as faces (Figura 20). Tais cavidades oleíferas também foram encontradas por Cardoso & Sajo (2004) em diversas espécies do gênero *Eugenia*. Elas apresentam cutícula mais espessada na superfície adaxial, sendo que em plântulas desenvolvidas *in vitro* ela é menos espessa que as de plantas de sala de crescimento e plantas de campo.

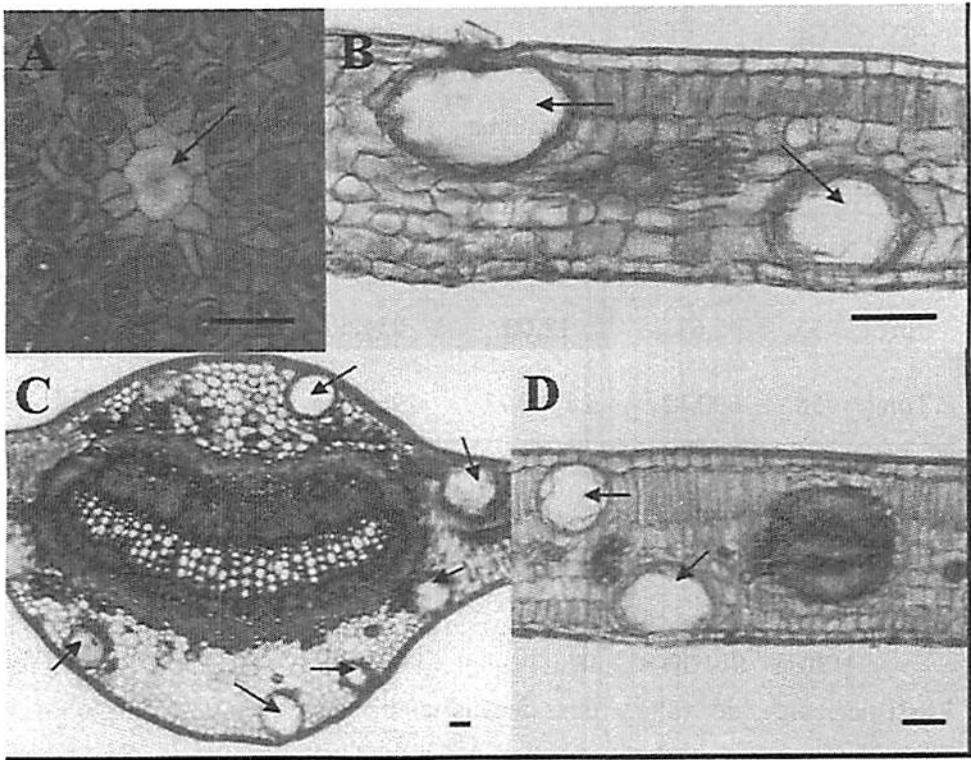


FIGURA 20 Detalhe das estruturas de secreção (setas) em folhas de cagaiteira (A - células epidérmicas reniformes (40x) e B, C e D - cavidades oleíferas subepidérmicas (40, 10 e 20x, respectivamente) (barra = 50 μ m)

4.7.1 Espessura do limbo foliar

De acordo com a análise de variância (Tabela 8), houve diferença estatística significativa para todos os tecidos foliares em função do ambiente de cultivo.

TABELA 8 Análise de variância para as medidas de espessura em tecidos foliares de cagaiteira cultivadas a campo, sala de crescimento, *in vitro* por 120 dias e *in vitro* por um ano

FV	GL	Quadrados médios				Total
		Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima lacunoso	Epiderme abaxial	
Trat	3	96,89*	9251,84 *	2264,49*	81,82*	23707,4*
Erro	55	5,63	18,00	234,60	2,44	319,99
Total	58	600,12	28745,73	19696,55	379,60	88721,42
CV%		13,95	9,99	16,92	13,93	11,09

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

Folhas providas de plantas de cultivo a campo diferiram estatisticamente de folhas dos demais ambientes, quanto à espessura da epiderme adaxial, epiderme abaxial e parênquima paliçádico. Para o parênquima lacunoso, porém, folhas providas de cultivo a campo e sala de crescimento foram superiores às de cultivo *in vitro* por 120 dias e um ano, os quais foram iguais estatisticamente (Figura 21).

Folhas de campo apresentaram espessura total superior aos demais tratamentos, seguidas por folhas de sala de cultivo e ambiente *in vitro*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Fidelis (2000), trabalhando com *Brosimum gaudichaudii*, que relata maiores espessuras para folhas desenvolvidas *in vivo* do que para folhas *in vitro*.

Segundo Castro et al. (1998), a resposta e a adaptação a uma elevada intensidade luminosa são o espessamento foliar e a alongação das células do parênquima paliçádico.

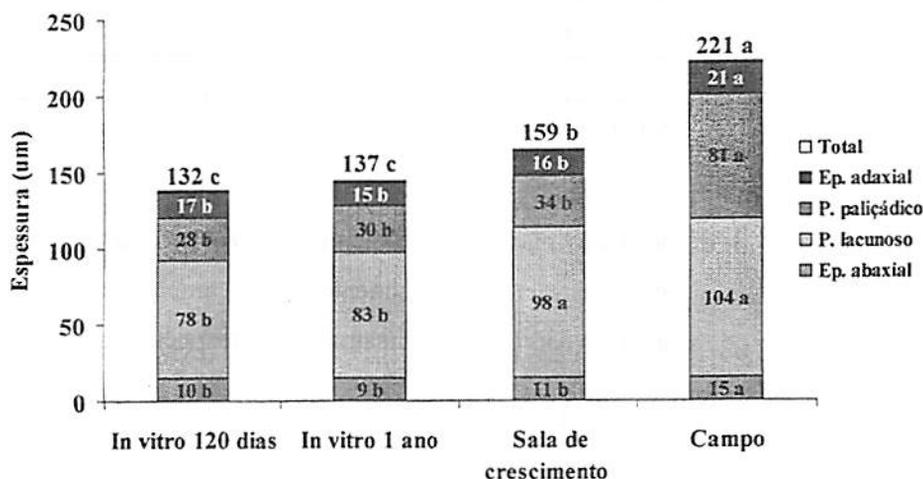


FIGURA 21 Teste de Scott-Knott para espessura de tecidos foliares de cagaiteira cultivadas a campo, sala de crescimento, *in vitro*, por 120 dias e *in vitro* por um ano

Zanela (2001), estudando plantas jovens de diversos grupos ecológicos, verificou que elas apresentavam alterações anatômicas típicas com relação aos níveis de radiação, apresentando um espessamento do mesofilo e maior nervura central em plantas submetidas a pleno sol.

4.7.2 Densidade estomática

Houve diferença estatística para a densidade estomática nos ambientes estudados (Tabela 9).

TABELA 9 Análise de variância para densidade estomática na epiderme abaxial de folhas de cagaiteira cultivadas a campo, sala de crescimento, *in vitro* por 120 dias e *in vitro* por um ano

FV	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Trat	3	3505308,07	1168436,02	32,039	0,0000
Erro	76	2771666,44	36469,29		
Total	79	6276974,52			
CV (%)	23,3				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

Destacaram-se as plantas de ambiente *in vitro* por um ano (1100 estômatos mm^{-2}) seguidas das plantas de ambiente *in vitro* por 120 dias (941 estômatos mm^{-2}). Plantas de sala de crescimento e de campo apresentaram menor número de estômatos (635 e 602 estômatos mm^{-2} , respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si (Figura 22).

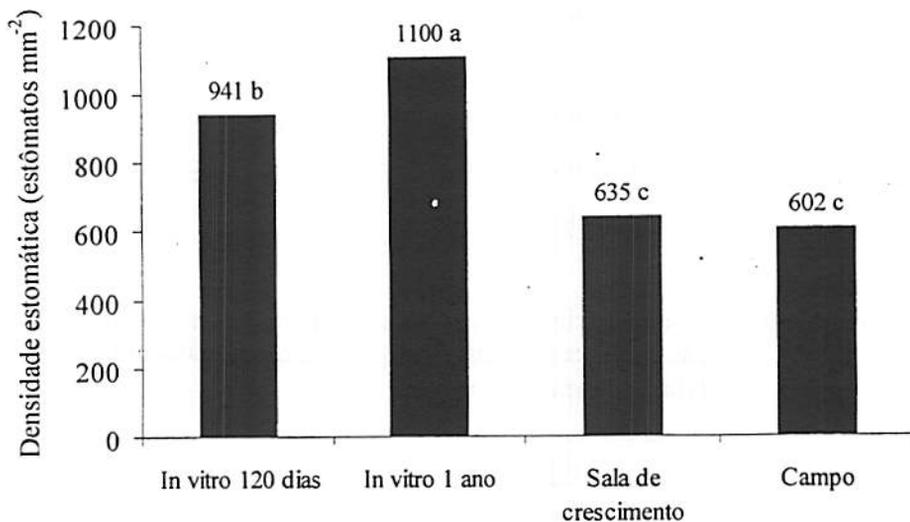


FIGURA 22 Teste de Scott-Knott para densidade estomática em folhas de cagaiteira cultivadas a campo, sala de crescimento, *in vitro* por 120 dias e *in vitro* por um ano

O grande número de estômatos observados em plântulas *in vitro* provavelmente foi provocado pelo ambiente existente no recipiente. As condições ambientais que influenciam as trocas gasosas provocam alterações no desenvolvimento estomático. Com baixa luminosidade e trocas gasosas, o aumento no número de estômatos facilitaria as trocas, aumentando a eficiência fotossintética, segundo Fráguas (2003). A mesma autora observou em seu estudo que a densidade estomática é maior em folhas de plantas de campo do que em folhas de plântulas *in vitro*. Este resultado discorda dos dados obtidos para cagaiteira, os quais demonstram um menor número de estômatos em folhas de plantas de campo, quando comparados com folhas de plântulas *in vitro*.

4.7.3 Diâmetro polar e equatorial de estômatos

A análise de variância (Tabela 10) demonstrou que houve diferença estatística para diâmetro polar, porém, para diâmetro equatorial não houve diferença significativa (Tabela 11).

TABELA 10 Análise de variância para diâmetro polar de estômatos em folhas de cagaiteira cultivadas a campo, sala de crescimento, *in vitro* por 120 dias e *in vitro* por um ano

FV	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Trat	3	406,12	3,16	42,83	0,0000 **
Erro	76	240,21	135,37		
Total	79	646,34			
CV (%)	8,13				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

TABELA 11 Análise de variância para diâmetro equatorial de estômatos em folhas de cagaiteira cultivadas a campo, sala de crescimento, *in vitro* por 120 dias e *in vitro* por um ano

FV	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Trat	3	14,75	3,53	1,390	0,2523
Erro	76	268,92	4,91		
Total	79	283,67			
CV (%)	11,69				

** Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

Conforme Figura 23, estômatos de folhas cultivadas a campo são, em média, maiores em diâmetro polar do que estômatos de sala de crescimento e

estes maiores do que estômatos cultivados *in vitro*, os quais não diferiram entre si. Para o diâmetro equatorial não foi observada diferença significativa entre os ambientes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Castro et al. (1998), trabalhando com *Guarea guidonea*, os quais encontraram diferenças apenas para diâmetro polar quando submetidas a diferentes níveis de sombreamento.

Santiago (1999), observaram uma diminuição no diâmetro polar e equatorial em estômatos e aumento na densidade estomática de *Piper hispidinervium* em plantas cultivadas em condição de sub-bosque ($192 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) quando comparadas com plantas de casa de vegetação ($885 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a pleno sol ($1439 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

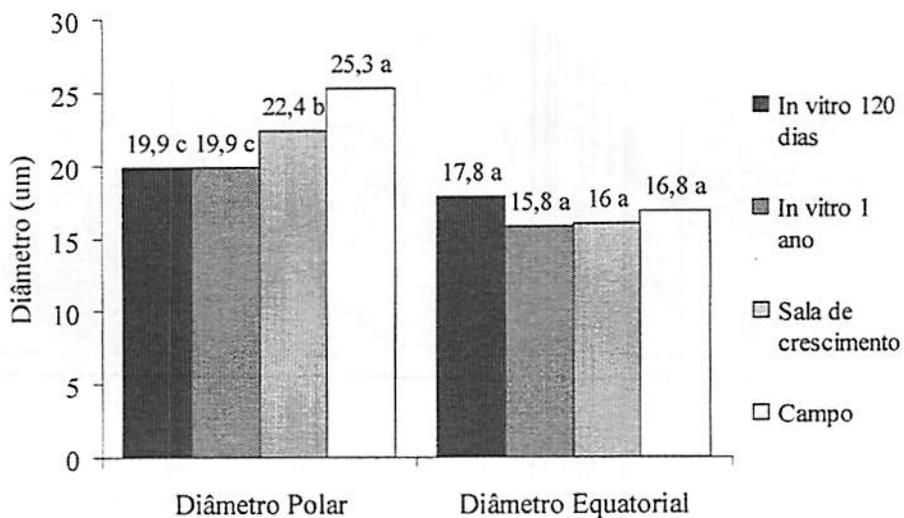


FIGURA 23 Teste de Scott-Knott para diâmetro polar e equatorial de estômatos em folhas de cagaiteira cultivadas *in vitro* por 120 dias, *in vitro* por um ano, sala de crescimento e a campo

4.8 Aclimatização e aspectos morfofisiológicos

Ocorreram diferenças entre as plântulas cultivadas nos diferentes ambientes. As dimensões dos tecidos foliares, densidade estomática, diâmetro polar e equatorial dos estômatos e o desenvolvimento das plântulas foram influenciados pelos diferentes tratamentos.

O desenvolvimento do tecido mecânico na nervura central do tratamento Plantmax + vermiculita apresentou-se com o cordão de fibras pericíclicas pouco desenvolvido em relação aos outros tratamentos (Figura 24). Possivelmente, o espessamento das paredes celulares pode ter sido influenciado pelos substratos.

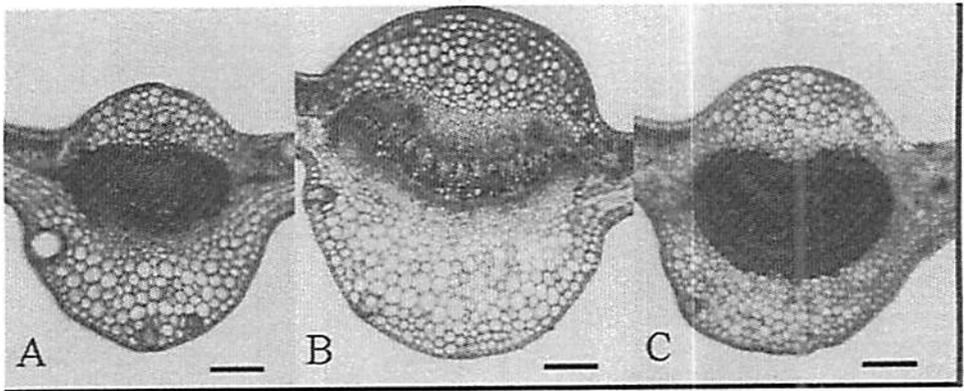


Figura 24 Nervura central em folhas de plântulas de cagaiteira durante a aclimatização, cultivadas em diferentes substratos. (A- Plantmax + Húmus, B – Plantmax + vermiculita e C – Plantmax) (barra = 100 um)

4.8.1 Crescimento

De acordo com a análise de variância para os dados de número de folhas e altura, foram verificadas diferenças estatísticas para os dois fatores aos 43 dias de aclimatização (Tabela 12 e Tabela 13).

TABELA 12 Análise de variância para número total de folhas em plântulas em fase de aclimatização em três tipos de substrato (Plantmax; Plantmax + vermiculita e Plantmax + húmus)

FV	GL	Soma dos quadrados	quadrados Médios	F	Pr > F
Trat	2	11,44	5,72	10,110	0,0002**
Erro	57	32,25	0,57		
Total	59	43,70			

CV (%) 27,74

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

TABELA 13 Análise de variância para altura em plântulas de cagaiteira em fase de aclimatização em três tipos de substrato (Plantmax; Plantmax + vermiculita e Plantmax + húmus)

FV	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Trat	2	8,74	4,37	10,05	0,0002**
Erro	57	24,78	0,43		
Total	59	33,51			

CV (%) 22,52

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

Os substratos que se destacaram foram o Plantmax + vermiculita (1:1) e Plantmax. Embora não tenham diferido estatisticamente um do outro, o primeiro foi ligeiramente superior para as duas características avaliadas (Figura 25).

Silva (2003), estudando substratos para aclimatização de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.), obteve o melhor resultado para número de botões florais utilizando Plantmax + vermiculita (1:1).

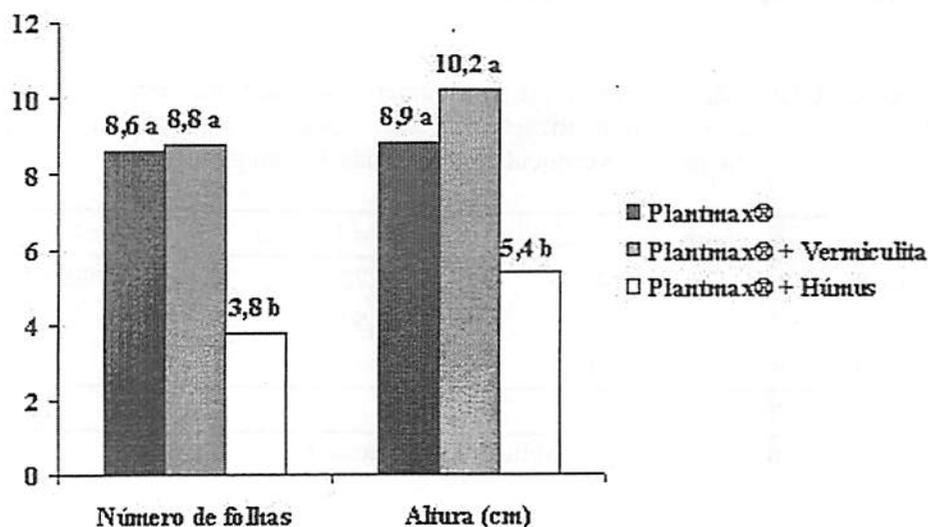


FIGURA 25 Teste de Scott-Knott para o número de folhas e altura de plântulas de cagaiteira em fase de aclimatização em três tipos de substrato (Plantmax; Plantmax + vermiculita e Plantmax + húmus)

O substrato Plantmax + húmus (1:1) provocou total desfolha inicial em plântulas de cagaiteira, porém, rebrotando posteriormente. Tal efeito se deve, provavelmente, a compostos voláteis liberados que se acumularam dentro da câmara úmida individual, não sendo indicado para este tipo de aclimatização.

4.8.2 Densidade estomática

Durante a fase de aclimatização houve diferença significativa para densidade estomática, tanto para o tempo quanto para o substrato (Tabela 14).

TABELA 14 Análise de variância para densidade estomática em folhas de plântulas em fase de aclimatização em três tipos de substrato (Plantmax; Plantmax + vermiculita e Plantmax + húmus)

FV	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Trat	2	1118245,74	559122,87	18,34	0,0001**
Erro A*	57	1737704,55	30486,04	1,22	0,2628
Tempo	1	837305,04	837305,04	33,42	0,0001**
Trat*Tempo	1	2981,68	2981,68	0,12	0,7320
Erro B	38	952008,07	25052,84		
Total	99	4801223,18			
CV (%)	17,06				

** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

* Erro A= REP (TRAT)

Na Figura 26 observa-se a evolução na densidade estomática em relação ao tempo. Com estes dados verificou-se que houve plasticidade dos tecidos durante a aclimatização para densidade estomática.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Fráguas (2003), que observou uma redução na densidade estomática durante a climatização de *Ficus carica*.

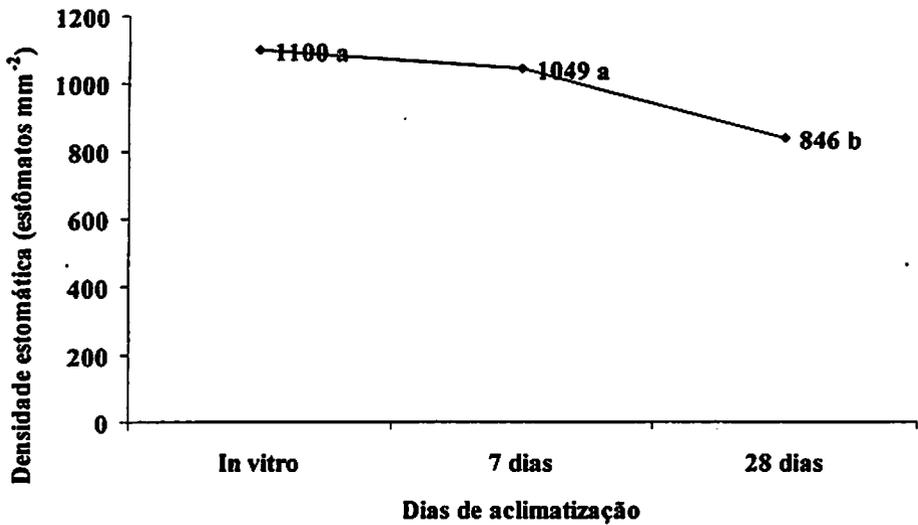


FIGURA 26 Teste de Tukey para densidade estomática em folhas de plântulas de cagaiteira em função do tempo de aclimatização, a 5% de probabilidade

Quanto ao tipo de substrato, o que mais se destacou para número de estômatos foi o Plantmax (1.065 estômatos por mm²). Os demais substratos não diferiram entre si estatisticamente (829 e 849 estômatos por mm²) (Figura 27).

Esta diminuição na densidade estomática está relacionada à adaptação da planta às novas condições ambientais, mostrando que a cagaiteira apresenta plasticidade foliar.

Alguns autores citam algumas alterações durante este processo, no qual a planta deverá simultaneamente desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática (Díaz-Perez et al., 1995), ativar os mecanismos de controle de perda de água pelas células (Sutter, 1988) e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO² (Vantelgen et al., 1992).

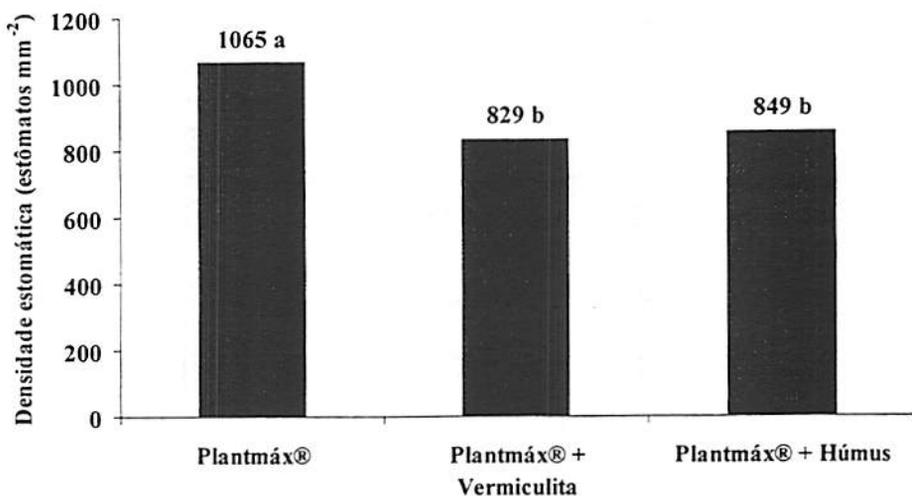


FIGURA 27 Teste de Tukey para média da densidade estomática em folhas de plântulas de cagaiteira, em função do substrato de aclimatização, a 5% de probabilidade

4.8.3 Diâmetro polar e equatorial de estômatos

Para o dados obtidos do diâmetro polar e equatorial dos estômatos, verificou-se diferença significativa para o tratamento e o tempo (Tabela 15).

TABELA 15 Análise de variância para diâmetro polar e equatorial de estômatos em folhas de plântulas em fase de aclimatização em três tipos de substrato (Plantmax; Plantmax + vermiculita e Plantmax + húmus)

FV	GL	Quadrados médios	
		Polar	Equatorial
Trat	2	20,19**	36,86**
Erro A*	57	2,66	3,91
Tempo	2	9,70**	13,07**
Trat*Tempo	3	0,96	5,87
Erro B	95	2,37	2,20
Total	159	444,86	553,11
CV (%)		10,86	7,14

** Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

* Erro A= REP(TRAT)

Durante a aclimatização, observou-se um aumento no diâmetro, tanto polar quanto equatorial dos estômatos (Figura 28).

Segundo Abrams & Mostoller (1995), em várias espécies estudadas, o diâmetro polar foi maior em folhas expostas a pleno sol. Isto demonstra que plantas em ambiente *in vivo* tendem a apresentar maior diâmetro de estômatos.

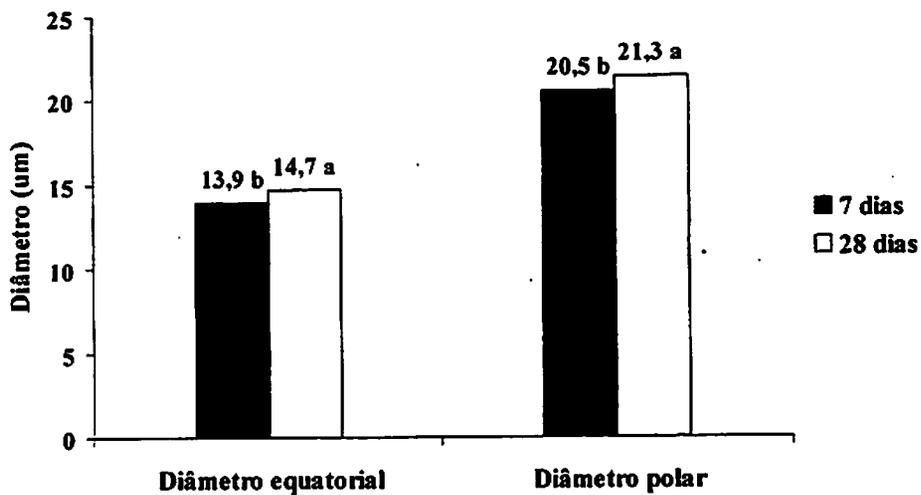


FIGURA 28 Teste de Tukey para diâmetro equatorial e polar durante a aclimatização de plântulas de cagaiteira a 5% de probabilidade

Quanto ao substrato, o que proporcionou o menor crescimento foi o Plantmax, não tendo os demais diferido entre si estatisticamente (Figura 29).

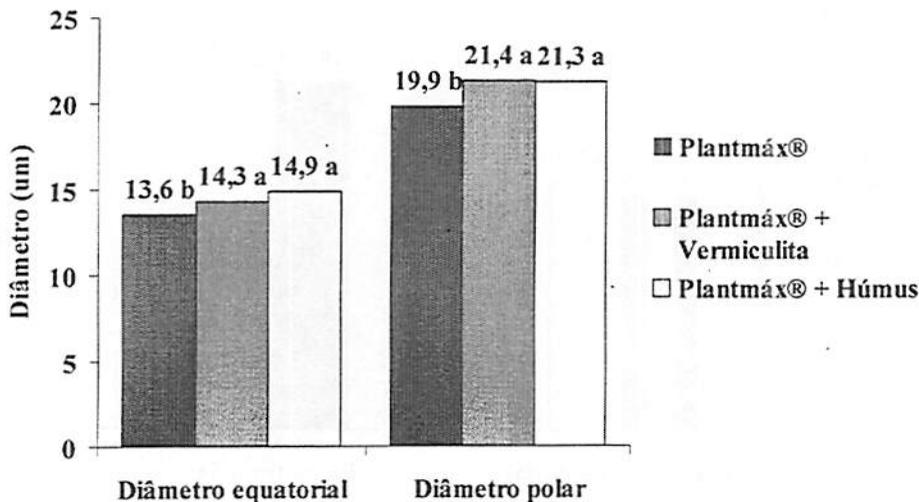


FIGURA 29 Teste de Tukey para diâmetro equatorial e polar, durante a aclimatização de plântulas de cagaiteira, a 5% de probabilidade

4.8.4 Espessura do limbo foliar

Quanto à espessura do limbo foliar, verificou-se significância somente para o tratamento no parênquima paliçádico e parênquima lacunoso (Tabela 16). Pequenas variações na espessura da espessura da folha podem resultar em significativas variações na fotossíntese em algumas espécies, enquanto outras apresentam grande plasticidade na espessura foliar, mas pouca variação na capacidade fotossintética (Yamashita et al., 2002).

TABELA 16 Análise de variância para as medidas de espessura em tecidos foliares de plântulas de cagaiteira em fase de aclimatização em três tipos de substrato (Plantmax; Plantmax + vermiculita e Plantmax + húmus)

FV	GL	Quadrados médios				Total
		Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico	Parênquima lacunoso	Epiderme abaxial	
Trat	2	6,07	89,40**	521,21**	2,40	162,08
Erro A*	42	6,62	10,50	115,65	3,22	177,91
Tempo	2	18,45	115,65	469,01	17,11	372,00
Trat*Tempo	4	10,05	45,00	153,15	6,79	206,85
Erro B	70	4,58	16,51	58,96	3,52	66,29
Total	119	697,10	2115,74	11144,92	454,95	13600,40
CV (%)		14,75	13,60	8,73	18,40	5,72

** Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

* Erro A= REP(TRAT)

Na Figura 30 verifica-se que para o parênquima paliçádico o tratamento que induziu uma maior espessura foi o Plantmax + vermiculita (1:1) seguido do Plantmax.

Quanto à espessura do parênquima lacunoso, maiores resultados foram obtidos com Plantmax + húmus.

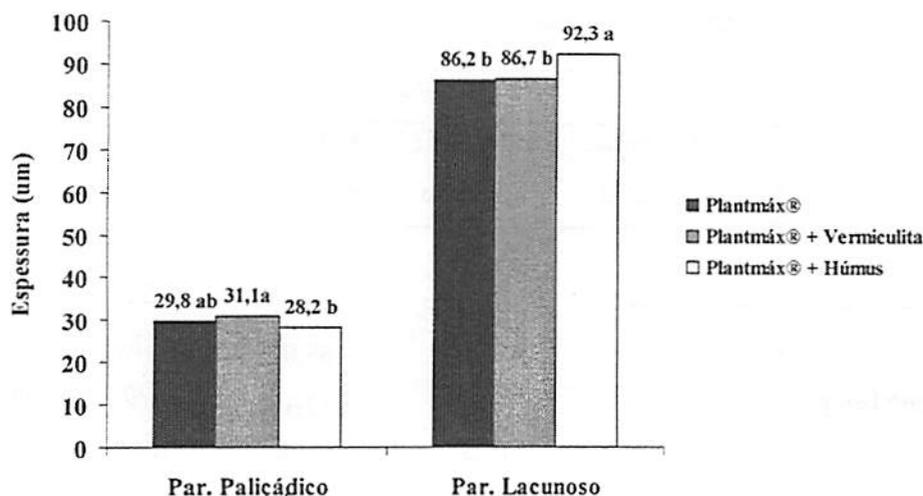


FIGURA 30 Teste de médias para espessura do parênquima paliçádico e lacunoso de plântulas de cagaiteira em aclimatização em função do uso de diferentes tipos de substrato (Plantmax; Plantmax + vermiculita e Plantmax + húmus) por Tukey, a 5 % de probabilidade

4.8.5 Fluorescência

Para a eficiência fotossintética, houve diferença significativa somente para o tempo (Tabela 17). Embora não tenham diferido estatisticamente entre si, o substrato que conferiu maior aumento na eficiência fotossintética às plântulas de cagaiteira em aclimatização foi o Plantmax seguido do Plantmax + vermiculita.

TABELA 17 Análise de variância para fluorescência em folhas de plântulas em fase de aclimatização em três tipos de substrato (Plantmax; Plantmax + vermiculita e Plantmax + húmus)

FV	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F	Pr > F
Trat	2	0,0031	0,00159050	2,00	0,1786
Erro A*	12	0,0095	0,00079719	4,24	0,0035
Tempo	2	0,0016	0,00081952	4,36	0,0296**
Trat,*Tempo	3	0,000049	0,00001653	0,09	0,9657
Erro B	17	0,0031	0,00018799		
Total	36	0,017			
CV (%)	1,72				

** Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

* Erro A= REP(TRAT)

Após a transferência para a condição *ex vitro*, a eficiência fotossintética teve aumentos crescentes para tempo avaliado (Figura 31).

Resultados semelhantes foram obtidos por Rival et al. (1997), trabalhando com dendê, que observaram aumentos crescentes na eficiência fotossintética durante a aclimatização de plântulas. Tais resultados demonstram que as alterações anatômicas observadas durante a aclimatização ocorrem simultaneamente a um crescente aumento na taxa fotossintética.

Segundo Debergh & Maene (1984), a morfologia foliar pode influenciar processos metabólicos e fisiológicos, associados, principalmente, à fotossíntese e às trocas gasosas.

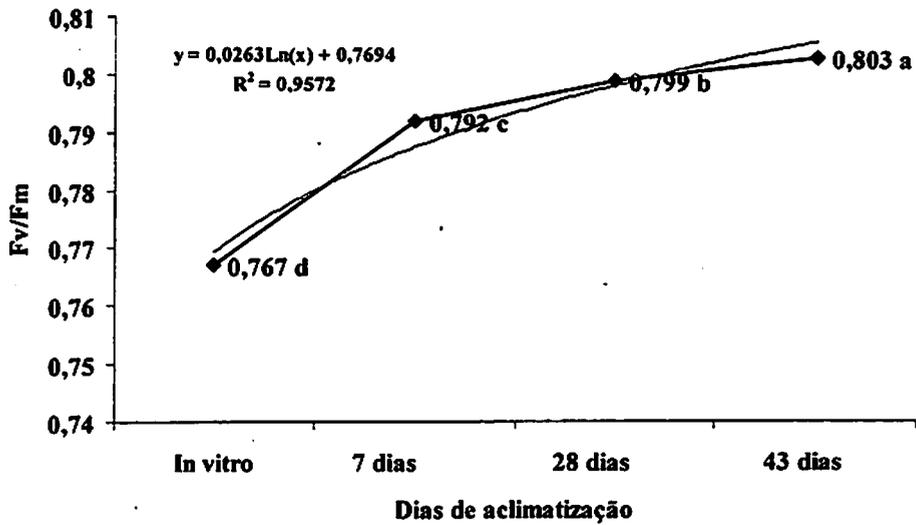


FIGURA 31 Teste de Tukey para fluorescência, em função do tempo de aclimatização, a 5% de probabilidade

5 CONCLUSÕES

A germinação e a porcentagem de sementes germinadas anormais *in vitro* foram influenciadas tanto pela luz quanto pela escarificação.

A utilização de etanol 70% por 60 segundos, seguido de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos, foi eficiente na desinfestação de segmentos foliares de cagaiteira.

A concentração 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D foi eficiente na indução de calos em segmentos nodais de cagaiteira.

O TDZ e o 2,4-D não foram eficientes na indução de calos em explantes foliares de cagaiteira.

A concentração de 2,0 mg L⁻¹ mg de BAP, acrescidos de 0,1 mg L⁻¹ de ANA, foi eficiente na indução de brotações de segmentos nodais de cagaiteira.

O AIB não foi eficiente na indução de raízes em brotações obtidas *in vitro* de cagaiteira, nas concentrações utilizadas.

O substrato Plantmax + vermiculita (1:1) ou Plantmax são satisfatórios para a aclimatização de cagaiteira.

O ambiente de cultivo influenciou o desenvolvimento morfofisiológico de cagaiteira.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, M. D.; MOSTOLLER, S. A. Gas exchange, leaf structure and nitrogen in contrasting successional tree species growing in open and understory sites during a drought. *Tree Physiology*, Victoria, v. 15, n. 6 p. 361-370, June 1995.
- ANDRADE, A. C. S.; CUNHA, R.; SOUZA, A. F.; REIS, R. B.; ALMEIDA, K. J. Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, *Eugenia dysenterica* DC. , *Seed Science & Technology*, Zurich, v. 31, n. 1, 125-137, 2003.
- ALMEIDA, S. P de. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico – química e fonte potencial de nutrientes. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. , ed. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 248-285.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1987. 83p. (Documentos, 26).
- BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. *In vitro* culture of trees. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.
- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. M. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, July 1981.
- BRANDÃO, M.; FERREIRA, P. B. D. Flora apícola do cerrado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 7-14, 1991.
- BRANDÃO, M. Plantas medicamentosas do cerrado mineiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 15-20, 1991.
- BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) ‘Roxo de Valinhos’**. 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade federal de Lavras, Lavras, 2001.
- CACHITA-COSMA, D. The effect of the nature and origin of explants on micropropagation. In BAJAJM Y. P. S. **High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p. 142-169. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 17).

CALBO, M. E. R.; LIMA, J. N. C.; CALBO, A. G. Fisiologia póscolheita de frutos de cagaita. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 2, n. 1, p. 15-18, 1990.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPACNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo, RJ. **Anais. . . Nova Friburgo**, 1996. p. 22.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Vasculature and identification of *Eugenia* (Myrtaceae) from the bank of Tibagi river, State of Paraná. 2004, **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, vol. 27, nº. 1, p. 47-54, jan/mar. 2004.

CASTRO, E. M. de; GAVILANES, M. L.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, D. M. de; GAVILANES, T. O. T. Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumer, sob diferentes níveis de sombreamento. **Daphne**, Belo Horizonte, v. 8, n. 4, p. 31-35, dez. 1998.

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. D.; MULLER, N. T. G. Effects of synthetic auxins on the *in vitro* rooting of apple tree. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 181-186, fev. 1999.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. D. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*tridax procumbens* L.) Utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes I. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, mar./abr. 2002

COELHO, M. C. F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-IBDF, 1984. v. I-VI.

COSTA T. R.; FERNANDES O. F. L.; SANTOS S. C.; OLIVEIRA C. M. A.; LIÃO L. M.; FERRI P. H.; PAULA J. R.; FERREIRA H. D.; SALES B. H. N.;

SILVA M. R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 72, n. 1/2 p. 111-117, Sept. 2000.

COSTA, S. A.; ALLOUFA, M. A. I.; MARTINS, C. P.; MACÊDO, C. E. C. Efeitos de concentrações de sacarose e 2,4-d na indução de calos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) In: XIII Congresso de Iniciação Científica da UFRN, 2002, Natal.

CUNHA, M. do C. L. Estudo de preservação do poder germinativo de sementes, enraizamento de estacas e anatomia da rizogênese em *Eugenia dysenterica* DC. 1986. 95f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SUTTER; E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, n. 2 p. 225-232, oct. 1995.

DECETTI, S. F. C. Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L. 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for the comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 335-345, 1981.

DONADIO, L. C. **Frutas brasileiras Jaboticabal: Novos Talentos 2002.**

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; CABRAL, J. B.; ALVES, G. D. Embriogênese somática *in vitro* em couve-comum, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 711-718, abr. 2000.

DOMBROSKI, J. L. D. Estudos sobre a propagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). 1997. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

EDWARDS, M. M. Seed Dormancy and seed environment-internal oxygen relationship. In: HEYDECKER, W. (Ed.). **Seed ecology**. Miyage-ken: The Pennsylvania State University Press, University Park, 1973. p. 169-188.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, vol. 24, n. 2, p. 293-295, ago, 2002.

FARIAS NETO, A. L.; FONSECA, C. E. L.; GOMIDE, C. C. C.; SILVA, J. A. , Armazenamento de sementes de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) [Storage of *Eugenia dysenterica* DC seeds]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 13, 55-62. 1991.

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis do cerrado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 6, n. 61, p. 9-18, jan. 1980.

FERREIRA, M. B.; CUNHA, L. H. S. Dispersão de plantas lenhosas de cerrado: germinação e desenvolvimento. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 6, n. 61, p. 12-17, jan. 1980.

FIDELIS, I.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *brosimum gaudichaudii* tréc. desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 327-336, abr/jun. 2000.

FRÁGUAS, C. B. . Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos', 2003 110 p. **dissertação de mestrado**(Agronomia (Fitotecnia))Universidade Federal de Lavras, Lavras , 2003.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during, adventitious rooting In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portlant: Discorides, p. 117-131. 1988.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 - The technology. Edington: Exegetics, 1993. 574p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984.

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de Moreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. G. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.).

Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. v. 2, p. 533-568.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. v. 1, p. 183-260.

HARTMANN, Hudson T. **Plant propagation: Principles and practices.** 5. ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall, 1990. 647 p. HU, C. Y. ,

WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. , ed. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding.** New York: Macmillan, 1983. p. 117-227.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198 p.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 237-252, jun. 1961.

LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000. Edição Especial.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal** São Carlos, RiMa, 2000.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

MACEDO, J. F. Plantas corticosas do Cerrado e sua utilização. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 33-37, 1991.

MACHADO, J. W. B.; PARENTE, T. V.; LIMA, R. M. Informações sobre germinação e características físicas das sementes de fruteiras nativas do Distrito Federal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 8, n. 2, p. 59-62, 1986.

MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de Biotecnologia em Plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344 p.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 65, n. 2, p. 103-111, mar. 1990.

MELO, J. T. de; SILVA, J. A. da; ALMEIDA TORRES, R. A. de; SILVEIRA, C. E. dos S. da; CALDAS, L. S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed). **Cerrado: ambiente e flora.** Planaltina: Embrapa-CPAC, p. 195-243, 1998.

MELO, N. F. de; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; MIKLÓS FÁRI. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107, jan/mar. 1999.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. , Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira (*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, nov-dez. 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURASHIGE, T. Plant cell and organ cultures as horticultural practices. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 17-30, 1977.

NAVES, R. V. **Espécies frutíferas nativas do cerrado de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos.** 1999. 206 f. Tese (Doutorado), Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vivo* e *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)** 2003 (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de Lavras – Lavras, 2003.

PAIVA NETO, V. B. de. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e seguimento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud).**

Lavras/MG: UFLA, 1996, 39p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal).

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; Hoffmann, A.; CARVALHO, G. R. **Cultura de Tecidos Vegetais: Tecnologias e aplicações: meios de cultura.** Lavras: FAEPE/UFLA, 1998. 116 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PIO, R.; RAMOS, J. D.; PIO, L. A. S.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citrus *Tangerina sunki x Trifoliata english* 63-256 com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 66-70, jan./fev. 2002.

PREECE, F. F.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In BAJAJM Y. P. S. **High-tech and micropropagation I.** Berlin: Spring Verlag, 1991. p. 168-189. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 17).

PROENÇA, C. E. B.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. **New Phytologist**, Oxford, v. 126, n. 2 p. 343-354, feb. 1994.

RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro, no enraizamento "*in vitro*" de amoreira-preta (*Rubus* Sp.), CV. Ébano1 **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 1, p. 124-126, abr. 2003.

RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L.; ALMEIDA, S. P. et al. Espécies arbóreas de usos múltiplos da região do cerrado: caracterização botânica, uso potencial e reprodução. In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 1. 1994, Porto Velho. **Anais**, Porto Velho: Colombo, 1994. p. 335-355. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 27).

RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L.; MELO, J. T. et al. Propagação de fruteiras nativas do cerrado. In: PINTO, A. C. Q. (coord.). **Produção de mudas frutíferas sob condições do ecossistema de cerrados.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1996. p. 55-80. (Documentos, 62).

RIBEIRO, J. F.; PROENÇA, C. E. B.; ALMEIDA, S. P. Potencial frutífero de algumas espécies frutíferas nativas dos cerrados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8, 1986, Brasília, Anais v. 2, p. 491-500.

RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L. da; MELO, J. T. de; ALMEIDA, S. P. de; SILVA, J. A. da. Propagação de fruteiras nativas do cerrado. In: PINTO, A. C. de Q., (Coord.). **Produção de mudas frutíferas sob condições do ecossistema de cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1996. p. 55-80. (Embrapa-CPAC. Documentos, 62).

RIVAL, A.; BEULÉ, T.; LAVERGNE, D.; NATO, A.; HAVAUX, M.; PUARD, M. Development of photosynthetic characteristics in oil palm during *in vitro* micropropagation. **Journal Plant Physiology**, v. 150, n. 5, p. 520-527, Apr. 1997.

RIZZINI, C. T. Efeito tegumentar na germinação de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 381-402, set. 1970.

RIZZINI, C. T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do Cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 3., 1971, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Edgard Blucher, 1971. p. 61-64.

SAHOO, Y.; PATTAIK, S. K.; CHAND, P. K. In vitro clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Orissa, v. 33, n. 4, p. 293-296, Oct./Dec. 1997.

SANO, S. M.; FONSECA, C. E. L. da F.; RIBEIRO, J. F.; et al. Folhagem, floração, frutificação e crescimento inicial da cagaiteira. DF. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 5-14, jan. 1995.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae**. 2003. 237 f. (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SANTIAGO, E. J. A. de **Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) em condições "in vitro" e "in vivo"**. Lavras, 1999. 118p. Dissertação (Mestre) – Universidade Federal de Lavras.

SANTIAGO, E. J. A.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; PINTO, J. E. B. P.; CARVALHO, Janice Guedes de, GAVILANES, M. L.; SOUZA, C. T.;

LAMEIRA, O. A. Efeito da interação nitrogênio e fósforo no crescimento *in vitro* da pimenta longa. In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1, 2003, Lavras.

SANTOS, B. R. Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humboldtiana* Willd). 2001. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, M. C. Triterpenos e flavonóides de *eugenia dysenterica* dc. Ouro Preto In: VIII Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Ouro Preto, 2000.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação Cerne, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001 .

SHIELDS, R.; ROBINSON, S. R.; ANSLOW, P. A. Use the fungicides in plant tissue culture. *Plant cell Reports*, v. 3, p. 33-36, 1994.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; DUTRA, L. F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* lood. hiern.) provenientes de cultura de tecidos. *Ciência e Agrotecnologia.* , Lavras. v. 27, n. 2, p. 255-260, mar-abr. 2003.

SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 330-334, ago. 2001.

SMITH, M. K.; BIGGS, B. J.; SCOTT, K. J. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 6, n. 3, p. 221-228, 1986.

SOUZA, E. B.; NAVES, R. V.; CARNEIRO, I. F.; LEANDRO, W. M.; BORGES, J. D. Crescimento e sobrevivência de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) nas condições de Cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 2, p. 491- 495, ago. 2002.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Mar. 1988.

SUTTER, E. G.; LANGHANS, R. W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 104, n. 4, p. 493-496, July 1979.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, **IV Encontro Latino Americano de biotecnologia vegetal, REDBIO** Disponível em: <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf>. Acesso em: 15/07/2004.

TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J. Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC, Myrtaceae) no Sudeste de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 145 - 154, abr./jun. 2001.

TIBURTIUS, E. R. L. **Remediação de água contaminadas por BTX's utilizando processos oxidativos avançados**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPB, 1998. v. 1, p. 11-20.

TORRES, A. C.; FAJARDO, T. V.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. O.; BUSO, J. A. Cultura de ápices caulinares e termoterapia na recuperação de plantas livres de vírus de alho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 192 - 195, nov. 2000.

VANTELGEN, H. J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 453-459, Dec. 1992.

VON-PINHO, E. V. R.; KIKUTI, A. L. et al. **Portal do Agronegócio do café: Inibidores da germinação no espermoderma**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=228>> Acesso em: 25/7/2004

ZANELA, S. M. **Respostas ecofisiológicas e anatômicas ao sombreamento em plantas jovens de diferentes grupos ecológicos**. 2001. p. 79. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ZIOLLI, R. L.; JARDIM, W. F. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO_2 , *Química Nova*, São Paulo v. 21, p. 319-325, 1998.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B. , CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. , Estrutura Genética e fluxo gênico em *Eugenia Dysenterica* DC. utilizando marcadores microssatélites In: 48o. Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Anais do 48o. Congresso Nacional de Genética**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2002.

YAMASHITA, N.; KOIKE, N.; ISHIDA, A. Leaf ontogenic dependence of light acclimation in invasive and native subtropical trees of different successional status. *Plant Cell and Environment*, Oxford, v. 25, n. 10, p. 1341-1356, Oct. 2002.