

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

THAMIRIS GATTI DÉO

**GERMINAÇÃO E ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE *Campomanesia
adamantium* (Cambess.) O. Berg.**

DOURADOS - MS

2015

THAMIRIS GATTI DÉO

GERMINAÇÃO E ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do curso de Bacharelado em Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, sob a orientação da Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani.

DOURADOS - MS

2015

THAMIRIS GATTI DÉO

GERMINAÇÃO E ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Profª. Dra. Cláudia Roberta Damiani (Presidente)

Profª. Dra. Liliam Silvia Candido

Profª. Msc. Fernanda Pinto

DOURADOS - MS

2015

“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que eu deveria ser, mas sou o que irei ser e graças a Deus não sou o que eu era.”

(Martin Luther King)

Dedico aos meus pais, Cláudia e Moacyr, e ao meu irmão, Thiago, por todo amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a quem lhe ajudou é retribuir com palavras, aqui agradeço àqueles que fizeram mais que isso, que foram sinônimos de amizade e companheirismo ao longo dessa etapa de minha vida.

A Deus por me ter dado a vida e a família maravilhosa que possuo, por me dar desafios para que eu aprenda a ser forte e ter calma.

Aos meus pais: Moacyr e Cláudia, por tudo o que sou. Por todo amor, dedicação, apoio, que sempre me deram. E que nunca mediram esforços para a realização dos meus sonhos.

E ao meu irmão, meus tios e avós, que não medem forças para serem presentes em todos os momentos da minha vida.

As meninas: Allana, Juliana e Karina, que me apoiaram nos momentos mais difíceis dessa jornada, aguentaram todas as lamúrias e cantorias desafinadas. Também a todas as minhas amigas, todas as loucuras e momentos mais gostosos não poderiam ter deixado de ser com as pessoas mais especiais. Aos velhos amigos de Iacri. E aos novos amigos, principalmente ao Bruno, por toda compreensão, apoio e ensinamentos.

Aos amigos de laboratório, que juntos vivenciamos todas as dificuldades de estrutura e as alegrias de quando davam certo os experimentos. Principalmente ao Ademir, por toda amizade desses anos, parceria, apoio e simplicidade de sempre. Também aos mestrandos, Leandro e Nathy, por toda ajuda na execução deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios da FCBA, que sempre foram disponíveis a ajudar.

A Profª. Dra. Cláudia Roberta Damiani, pela orientação, ensinamentos e dedicação esmera com seus orientandos e alunos da Biotecnologia.

A Universidade Federal da Grande Dourados, a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais e aos professores do curso de Biotecnologia que ministraram aula para a IV Turma, por todo aprendizado passado a nós, sempre atenciosos e prestativos.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma na realização desse trabalho e que estiveram comigo ao longo dessa etapa.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Bioma Cerrado: Impactos ambientais na flora nativa	3
2.2 A família Myrtaceae e o gênero <i>Campomanesia</i>	4
2.2.1 Características e distribuição de <i>Campomanesia adamantium</i>	5
2.2.2 Potencial econômico da espécie	6
2.3 Cultura de tecidos vegetais	7
2.3.1 Organogênese e Germinação <i>in vitro</i>	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Efeito de concentrações de ácido giberélico (GA ₃) na germinação <i>in vitro</i> de <i>Campomanesia adamantium</i>	12
3.2 Efeito de concentrações de TDZ (thiadizuram (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia)) na organogênese <i>in vitro</i> de folhas de guavira	13
3.3 Efeito de TDZ (thiadizuram) e ANA (ácido naftaleno acético) na organogênese <i>in vitro</i> de raiz e entre-nó de guavira	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Efeito de concentrações de ácido giberélico (GA ₃) na germinação <i>in vitro</i> de <i>Campomanesia adamantium</i>	15
4.2 Efeito de concentrações de TDZ (thiadizuram (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia)) na organogênese <i>in vitro</i> de folhas de guavira	19
4.3 Efeito de TDZ (thiadizuram) e ANA (ácido naftaleno acético) na organogênese <i>in vitro</i> de raiz e entre-nó de guavira	22
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

GERMINAÇÃO E ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de germinação *in vitro* de *Campomanesia adamantium*, tratadas com diferentes concentrações de ácido giberélico, bem como, avaliar a capacidade organogênica de diferentes explantes, tratados com diferentes concentrações e reguladores de crescimento. O primeiro experimento avaliou o poder germinativo de sementes da espécie, as mesmas foram submetidas a concentrações de ácido giberélico (GA₃): 0 (controle); 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹. O segundo experimento avaliou a capacidade organogênica de folhas obtidas de brotações produzidas a partir de explantes nodais estabelecidos *in vitro*, tratadas com 5; 10; 15 e 20 µM TDZ (thiadizurone (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia)), combinadas com 1,0 µM de ANA (ácido naftaleno acético) e tratamento controle (sem adição de regulador). O terceiro experimento avaliou o efeito de TDZ (5,0 µM), ANA (1,0 µM) e a combinação destes (TDZ+ANA) sobre a organogênese de explantes provenientes de raiz e entre-nó, obtidos de plântulas germinadas *in vitro*. Os resultados obtidos nos experimentos demonstraram que durante a germinação *in vitro* de guavira, a adição de giberelina ao meio de cultura, aumenta o percentual de germinação em aproximadamente 10% em comparação ao tratamento controle, respectivamente 100 e 87%, promove um aumento linear no comprimento da parte aérea, conforme acréscimo da concentração De GA₃, porém, nestas concentrações testadas não exerceu influência no comprimento da raiz e no número de folhas. Na organogênese *in vitro* de folhas foi constatado que, o uso de 20 µM da citocinina TDZ promoveu maior formação de calos e menores percentuais de oxidação. Já no outro experimento de organogênese *in vitro*, explantes provenientes de entre-nós caulinares foram mais responsivos que explantes radiculares, apresentando maior percentual de formação de calos em meio de cultura suplementado com 5,0 µM de TDZ e em meio suplementado com a combinação de TDZ + ANA. Nas concentrações testadas, os reguladores de crescimento utilizados não influenciaram na oxidação dos explantes, porém, observou-se maior oxidação nos explantes radiculares, principalmente na presença de ANA.

PALAVRAS-CHAVE: ácido giberélico; calos; cultura de tecidos; guavira; thiadizuron.

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado possui grande diversidade de espécies frutíferas nativas com potencial para introdução ao cultivo, cuja variabilidade está cada vez mais ameaçada pelo extenso desmatamento e pastagens nessa região. Entre estas, estão as gabirobeiras, plantas pertencentes à família Myrtaceae, gênero *Campomanesia*, que possuem frutos carnosos, apreciados pela população local para consumo *in natura* (AMARAL, 2012).

Espécies deste gênero como a *Campomanesia adamantium*, conhecida popularmente como guavira, encontrada na região de Mato Grosso do Sul, destaca-se pelas características organolépticas do fruto: suculento, ácido e levemente adocicado; e pelos componentes presentes nele, como a elevada quantidade de vitamina C (ácido ascórbico), que se sobrepõe a maioria dos frutos comercialmente conhecidos, indicando grande potencial para sua utilização em indústrias de alimentos e de bebidas (VALLILO et al., 2006).

Outro interesse na espécie, está no potencial para fins medicinais, pela presença de substâncias antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas, encontradas em folhas e nas cascas dos frutos (KATAOKA et al., 2008; PASCOAL, 2012).

Entretanto todo o potencial econômico desta planta está limitado, devido a uma série de fatores, como o uso antrópico das regiões de Cerrado e as restrições pertinentes a própria espécie, que envolve a lentidão do crescimento das plântulas, a dormência das sementes e ainda a planta se apresentar em estado selvagem, tornando desfavorável a propagação da espécie em larga escala, conforme a maneira tradicional de semeadura em campo.

Desse modo, alternativas viáveis podem ser tomadas, como a produção de mudas por meio da técnica de micropropagação, auxiliada com o uso de reguladores de crescimento. A micropropagação é uma técnica de grande impacto comercial, pois permite a produção massal de um genótipo de interesse, utilizando pouco espaço físico e em curto período de tempo a obtenção de plantas completas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de germinação *in vitro* de *Campomanesia adamantium*, tratadas com diferentes concentrações de ácido giberélico, bem como, avaliar a capacidade organogênica de diferentes explantes, tratados com diferentes concentrações e reguladores de crescimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Bioma Cerrado: Impactos ambientais na flora nativa

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, com uma área de aproximadamente dois milhões de km², correspondente a 25% do território nacional. A enorme diversidade chega a cerca de treze mil táxons e doze mil espécies de plantas listadas (RESENDE e GUIMARÃES, 2007).

A expansão de atividades em áreas do Cerrado foi iniciada a partir da década de 1970 (ROCHA et al., 2011), desde então, ocorre um intenso desmatamento, pela ocupação desordenada para fins de expansão urbana, atividade agropastoril e extração de matérias-primas e minérios, que alcançou mais de 50% do bioma (RESENDE e GUIMARÃES, 2007; RUFINI, 2014).

Segundo Rocha et al. (2011), com o mapeamento realizado pelo PROBIO (Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica), os estados do Piauí, Maranhão, Bahia e Tocantins, possuem uma proporção de Cerrado remanescente superior a 80%, enquanto que no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Paraná, a quantidade de flora nativa não chega a 50%. E no estado de São Paulo apresenta apenas 0,013% de vegetação remanescente. Internacionalmente, o Cerrado foi reconhecido como uma área urgente de necessária conservação (RESENDE e GUIMARÃES, 2007; RUFINI, 2014).

As espécies vegetativas nativas contêm distribuição restrita e grande quantidade de endemismos (RESENDE e GUIMARÃES, 2007). Estudos têm demonstrado interesse pela potencialidade de uso, fisiologia, manejo e produção. Uma vez que possam contribuir para a conservação e projetos de recomposição da vegetação original (SANTOS et al., 2014).

A flora do Cerrado, principalmente as frutíferas, têm sido exploradas comercialmente, pois apresentam um alto valor econômico, muitas incluídas no cardápio da população brasileira. Porém há dificuldade de cultivo dessas plantas, a maioria apresenta dificuldade de propagação natural por meio das sementes, dada a presença de dormência e heterogeneidade durante a maturação dos frutos. Também casos de sementes recalcitrantes, que podem inviabilizar o desenvolvimento do embrião e assim comprometer o material genético da espécie (PINHAL et al., 2011).

Por isso a necessidade de alternativas que tornem viáveis a produção de mudas e conciliem a conservação e o uso da vegetação deste bioma, que podem ser proporcionadas pelo uso de técnicas de cultura de tecidos e multiplicação sistematizada de plantas;

intercâmbio de material genético; resgate de germoplasma e preservação de material ameaçado; redução no período de germinação; isenção de pragas e doenças e; uniformização nas plântulas obtidas, dentre outras (MELO, 2000; PINHAL et al., 2011; RUFINI, 2014).

2. 2 A família Myrtaceae e o gênero *Campomanesia*

A família Myrtaceae é pertencente à ordem Myrtales ou Myrtiflorae (DE CERQUEIRA, 2002), em que são estimados cerca de 132 gêneros e mais de 5600 espécies. Ainda se divide em duas subfamílias, Myrtoideae e Psiloxylodeae (LIMA et al., 2011).

Esta última, localizada na África, apresenta frutos carnosos, em que por meio de dados moleculares, foi identificada como um grupo não monofilético, distintamente a outra subfamília. A Myrtoideae, é distribuída em quinze tribos, com destaque para a Myrteae, que abrange maior diversidade de espécies na América do Sul, principalmente na costa leste brasileira (LIMA et al., 2011; AMARAL, 2012).

No Brasil, a Myrtaceae é tida como uma das famílias mais importante em número de espécies, para diversos tipos de vegetação (AMARAL, 2012), compreendendo cerca de 24 gêneros e 927 espécies (FORZZA, 2010). Na área de Cerrado é uma das famílias mais representativas, com aproximadamente 14 gêneros e 211 espécies (IMATOMI, 2010).

Dentre tais espécies, distinguem-se aquelas com considerável valor econômico e nutritivo, como as frutíferas, em que algumas são conhecidas e comercializadas, porém ainda há espécies não comerciais; também plantas que podem ser utilizadas para fins medicinais, o qual estudos indicam que podem chegar em 70% das espécies da família; e gêneros que podem ser empregados para recomposição ambiental. Neste sentido, o aproveitamento ainda baixo do potencial benéfico da família aliado à degradação ambiental, chegando a casos de extinção de espécies, tem impedido estudos de identificação e da biologia reprodutiva sobre as mesmas (ARAÚJO et al., 2015; BOSCARDIN, 2010; GRESSLER et al., 2006).

Na literatura consta que os primeiros estudos sobre a família e classificação de alguns gêneros foram fornecidos por Linnaeus (1753). Enquanto que o gênero *Campomanesia* foi somente reconhecido e descrito mais tarde, por Ruiz e Pavon (1794), maiores informações foram dadas por Candolle (1828) relatando a morfologia dos embriões em seu livro “Promoteus” e aceito por Berg (1857-1859), monografista da obra de Martius, *Flora Brasiliensis*, retratada a morfologia floral. A última revisão completa do gênero foi efetivada por Landrum (1986), e a partir dele somente trabalhos com destaque a espécies de regiões distintas.

Pertencente à subfamília Myrtoideae, o gênero *Campomanesia*, presente na flora brasileira em abundância, corresponde a 33 espécies, destas 23 são endêmicas (SOBRAL et al., 2013), das quais são comumente caracterizadas pelas flores de coloração creme-esbranquiçada, frutos bagas, arredondados, com polpa amarelada suculenta envolvendo as sementes (AMARAL, 2012). Podem se distinguir a árvores com altura de 15 metros, presentes em florestas tropicais e subtropicais, ou a arbustos com aproximadamente 1 metro, encontrados em áreas de Cerrado (AMARAL, 2012).

Considerado um dos gêneros mais bem definidos da família, pela forma de desenvolvimento dos frutos e sementes, possui hipocótilo desenvolvido e cotilédones pequenos ou vestigiais, ovário com presença de 4 a 18 lóculos, se tornando as paredes mais espessas e glandulares durante o amadurecimento dos frutos, contribuindo como um falso envoltório nas sementes que apresentam testa membranácea. Também cada lóculo possui vários óvulos, que após a fecundação, somente um sobrevive e os demais abortam ou todos abortarem (AMARAL, 2012; LANDRUM, 1986; DE OLIVEIRA et al., 2013).

As distinções peculiares do gênero perante a família Myrtaceae, remontam a necessidade de maior estudo sobre as espécies de *Campomanesia*, com enfoque em pesquisas de conhecimento básico sobre morfologia, germinação e estabelecimento de indivíduos jovens, bem como o potencial nutricional e farmacológico que podem reservar essas plantas.

2. 2. 1 Características e distribuição de *Campomanesia adamantium*

A espécie *Campomanesia adamantium*, é uma frutífera pertencente a família Myrtaceae, conhecida popularmente como guavira ou gabirola. Distribuída em campos e Cerrados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina (LORENZI et al., 2006).

Apresenta-se como arbusto decíduo que pode variar de 0,5 a 1,5 m de altura. As folhas são subcoriáceas, sendo glabras quando adultas, com 3 a 10 cm de comprimento. As flores são solitárias, andróginas, formadas de setembro a outubro e os frutos amadurecem em novembro/dezembro (LORENZI et al., 2006), sendo polinizada a espécie por abelhas do gênero *Bombus* e em época de floração grande quantidade de outros insetos são encontrados. Dados ecológicos revelam que a planta suporta inundação, e está entre as espécies importantes para a reposição de mata ciliar (VIEIRA et al., 2006).

A propagação sexuada de *C. adamantium* está limitada, ainda não é uma espécie cultivada e o desenvolvimento das plântulas é muito lento (SCALON et al., 2009). O restrito conhecimento sobre a longevidade das sementes prejudica o uso dos frutos, bem como a

otimização do cultivo da espécie, e a manutenção de bancos de germoplasma (DRESCH et al., 2014).

Estudos sobre a capacidade germinativa da semente da guavira vêm sendo realizados, comprovadamente é considerada recalcitrante, não suporta o armazenamento a baixa temperatura e intolerante a dessecação. Segundo Melchior et al. (2006), o armazenamento por um período de trinta dias, em frasco de vidro fechado a 25°C, mantém as sementes com 60% de germinação. E a semeadura, logo após a extração dos frutos, permite valores de germinação de, no mínimo, 74%. Ainda, Dresch et al. (2014), verificaram que as sementes suportam uma redução do teor de água de 15,3%, o armazenamento da mesma em diferentes recipientes e temperaturas não prejudicam a porcentagem final de germinação, todavia não toleram o período de armazenamento superior a trinta dias.

2. 2. 2 Potencial econômico da espécie

A espécie *C. adamantium* possui grande diversidade para fins econômicos, isto pode ser atribuído, principalmente, a sua composição química, sendo variável a abrangência de substâncias, dependendo das características do solo a qual a planta está fixada (LARCHE, 2000). A composição nutricional dos frutos da guavira foram avaliados por Vallilo et al. (2006), no óleo volátil foram identificados ácido ascórbico (vitamina C), minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos (α -pineno, limoneno e β -(z) ocimeno), garantindo a elevada acidez e aroma cítrico observado no fruto. Em destaque as demais substâncias, foi relatado que o ácido ascórbico chega a 234 mg para cada 100 g, quantidade relativamente alta se comparado a valores de espécies da mesma família botânica, como a pitanga (14,0 mg para cada 100 g) e a goiaba vermelha (40,0 a 80,1 mg para cada 100 g).

A população tem utilizado os frutos para consumo *in natura* e na produção de suco, geleia, sorvete, bebidas e doces (COSTA et al., 2012). Bem como as folhas e as cascas dos frutos, são usadas pela medicina popular com ações anti-inflamatórias, antidiarreicas e antissépticas das vias urinárias (PASCOAL, 2012).

O potencial medicinal da espécie tem aumentado estudos na área, principalmente no estado de Mato Grosso do Sul. Kataoka et al. (2008) verificaram atividade antimicrobiana em extrato etanólico das cascas do fruto da guavira, com inibição para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*. Subsequente, Pavan et al. (2009) analisaram os extratos dos frutos frente ao micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis*, em que obteve promissora atividade antibacteriana.

Por meio de avaliação *in vitro*, Pascoal (2012) constatou a presença de metabólitos secundários, principalmente de flavonoides, indicando capacidade antioxidante e antiproliferativa para linhagens de células tumorais, acumulados no extrato etanólico das folhas deste vegetal. Souza et al. (2014), utilizando extrato hidroalcoólico das cascas de frutos desta espécie, verificaram em testes *in vivo*, propriedades anti-inflamatórias, anti-hiperalgésica e antidepressiva em roedores sem lhes acarretar toxicidade.

As comprovações científicas do potencial farmacológico desta herbácea e o emprego na indústria alimentícia, são aspectos que tornam justificáveis o cultivo da guavira e sua comercialização. Entretanto, o uso antrópico das regiões de Cerrado e as características inerentes à *C. adamantium*, que envolve a lentidão do crescimento das plântulas, a dormência das sementes e a espécie se apresentar em estado selvagem, são fatores que tornam inviável a propagação da espécie em larga escala, conforme a maneira tradicional de semeadura em campo. Desse modo, a produção de mudas por meio da técnica de micropropagação, auxiliada com o uso de reguladores de crescimento, é uma alternativa promissora para o seu cultivo, propiciando o usufruto dessa planta com alto potencial econômico.

2. 3 Cultura de tecidos vegetais

A partir do princípio da totipotência é consolidada a cultura de tecidos vegetais, pois cada célula de uma planta apresenta potencialidade à regeneração de uma nova planta completa, idêntica a planta mãe, desde que esteja sob estímulos apropriados. A capacidade que uma célula ou um grupo delas apresentam em responder a estes estímulos indutivos, é compreendido como competência celular, sendo essencial ao processo de desenvolvimento de uma planta e dessa forma expressar o potencial inerente a sua carga genética (TORRES et al., 2000; ANDRADE, 2002; FALEIRO et al., 2011).

A cultura de tecidos vegetais integra vários tipos de cultivo *in vitro* de plantas, objetivando a obtenção de clones, novos indivíduos com genótipo idêntico a planta matriz, por meio da propagação assexuada, obtidos a partir de uma cultura asséptica *in vitro*, sob condições físicas (luz e temperatura) e químicas (meio de cultura) definidas. O material utilizado, chamados de explantes, são utilizados como fonte inicial do processo de regeneração de uma planta, sendo estes, pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo, provenientes de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido que responda aos estímulos indutivos do meio de cultura (ANDRADE, 2002; GAHAN e GEORGE, 2008).

O desenvolvimento de métodos adequados para as peculiaridades das espécies vegetais representa uma ampla aplicação da biotecnologia vegetal. Assim a cultura de tecidos,

dentre tais métodos, pode ser considerada uma importante ferramenta para estudos fisiológicos e bioquímicos das plantas, envolvendo desde fatores responsáveis pelo crescimento, metabolismo, a diferenciação e morfogênese das células vegetais. Como também para estudos aplicados, como micropropagação, produção de compostos secundários, transformação genética, manutenção de germoplasma *in vitro*, limpeza clonal, entre outros. (SMITH, 2000; FALEIRO et al., 2011).

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro* destaca-se a micropropagação, sendo a mais utilizada e de maior êxito na cultura de tecidos para a propagação vegetativa de plantas. Pode ser empregada na horticultura e na indústria de mudas para a propagação clonal de muitas espécies vegetais de dicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas. Seu uso tem se tornado crescente em espécies ornamentais, florestais e fruteiras (FALEIRO et al., 2011; PINHAL et al., 2011).

Esta técnica envolve diferentes etapas para a obtenção de uma planta completa, das quais são: estabelecimento da cultura *in vitro* com necessidade de desinfestação dos explantes; multiplicação *in vitro* com adequadas proporções de reguladores de crescimento; as plântulas obtidas são enraizadas e aclimatizadas; ao final do processo, as mudas podem permanecer em casas de vegetação ou postas diretamente em solo, apresentando qualidade superior por serem livres de patógenos, geneticamente uniformes e fisiologicamente mais ativas (FALEIRO et al., 2011; PINHAL et al., 2011).

Comparada aos métodos tradicionais de propagação (estaquia, enxertia, entre outros), este possui diversas vantagens: a partir de um explante ser originado várias plantas; obtenção de mudas independente de estações do ano; diminuição do tempo para formação de uma planta completa; redução da área necessária à propagação da espécie; normalmente, não ocorre mutações durante as etapas; alternativa para espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (FALEIRO et al., 2011).

Este método possui algumas limitações, como: alto custo de produção para algumas espécies; necessidade de uso intensivo de mão-de-obra para as repicagens das plântulas; e perdas de plântulas por contaminação nas primeiras etapas, que podem ser elevadas, dependendo da espécie vegetal e da infraestrutura laboratorial disponível (ERIG e SCHUCH, 2005; FALEIRO et al., 2011).

Algumas formas de minimizar estes entraves vêm sendo aplicadas, como a germinação *in vitro*, em casos de dormência de sementes e para diminuir contaminação microbiana, e a micropropagação fotoautotrófica, que faz uso da luz natural para auxiliar na redução dos custos de produção. As técnicas estão em constante aprimoramento e novas são criadas, sendo

necessárias para cada espécie e trazendo maiores benefícios a quem faz uso delas (ERIG e SCHUCH, 2005; PINHAL et al., 2011).

2. 3. 1 Organogênese e germinação *in vitro*

A organogênese *in vitro* é o processo pelo qual há formação de novas plântulas, a partir de um explante. Estas podem ser originadas de forma direta com a formação de brotos axilares, provenientes de meristemas pré-existentes nos tecidos do explante; ou de forma indireta, em que inicialmente ocorre a formação de calos, seguida da criação de células meristemóides e posteriormente brotações adventícias (FALEIRO et al., 2011).

Segundo George et al. (2008), a forma direta de cultivo é caracterizada pelo crescimento organizado de tecidos, isto pode ser possível a partir de cultura de meristemas: como o meristema apical caulinar, em que são cultivados ápices caulinares de 0,1mm a 0,3 mm, de acordo com a espécie, com ou sem primórdios foliares; meristema apical radicular, por meio de raízes desconectadas da parte aérea, pode resultar em um sistema de raízes ramificadas; meristema lateral, em que se faz a cultura de segmentos nodais, iniciada a partir de gemas laterais existentes nos nós da planta.

E a forma indireta de cultivo, em que a partir de pequenos órgãos, pedaços de tecidos ou de células previamente cultivadas, ocorre o crescimento desorganizado de tecidos, com formação de uma massa de células (GEORGE et al., 2008). Através destas, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas (GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os calos podem ser caracterizados quanto ao tipo, grau de diferenciação e potencial morfogenético apresentado. As distinções presentes entre um calo de determinado genótipo e outro, são influenciadas pelo o tipo de explante e a constituição do meio de cultura, assim como a idade fisiológica e ontogenética do órgão e o tamanho do explante (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Entre as vantagens do uso da organogênese indireta, está a sua utilização como ferramenta para a produção de massa clonal e regeneração de plantas, o potencial de desenvolver enormes taxas de multiplicação, reproduzindo grandes quantidades de plantas uniformes (THORPE et al., 1984).

Outra possibilidade que tem despertado o interesse dos melhoristas, é a indução de variação somaclonal por meio deste processo, como uma nova possibilidade de se obter variabilidade genética, com perspectivas de seleção *in vitro* ou *ex vitro* de plantas superiores (TABARES et al., 1991). Como também, a inserção de genes em calos, em que os tecidos

desdiferenciados podem ser regenerados para a obtenção das plantas modificadas (ARENHART e ZAFFARI, 2008).

Os reguladores de crescimento são empregados na cultura de tecidos para auxiliar a induzir a diferenciação e a multiplicação de órgãos a partir de meristemas, bem como induzir a desdiferenciação de tecidos determinados e induzi-los a formação de pré-meristemas (ANDRADE, 2002; GEORGE et al., 2008).

Além dos reguladores, outros fatores influenciam no sucesso da regeneração *in vitro*, são eles: genótipo da espécie, da cultivar ou da variedade utilizada; a fonte de explantes, que depende da maturidade, do estado fisiológico e do tecido; as condições físicas e químicas empregadas na cultura, como o meio de cultura, a luz, a temperatura, o frasco, entre outros. Sendo responsáveis pela intensificação das respostas morfogênicas e pelo maior número de explantes responsivos (ANDRADE, 2002; GEORGE et al., 2008).

As plantas são independentes no meio ambiente, produzem suas próprias substâncias para mecanismos de defesa e sintetizam os hormônios necessários para o seu desenvolvimento. Porém, quando empregadas na cultura de tecidos, estando na forma de explantes sob um meio artificial, se tornam frágeis e apresentam deficiência na produção de compostos, sendo, por isso, submetidas aos reguladores de crescimento (hormônios sintéticos), para garantir o bom desenvolvimento destes explantes (PINHAL et al., 2011).

A resposta morfogênica da planta a estes estímulos hormonais pode ser diferente, de acordo com as classes, tipos e doses empregadas (PINHAL et al., 2011). A partir disso destacam-se os seguintes tipos:

- Auxinas, induzem o alongamento celular, envolve crescimento do caule, iniciação da atividade cambial em plantas lenhosas, tropismos, dominância apical, diferenciação polar de raízes nas extremidades de estacas de caule, desenvolvimento da flor, crescimento do fruto, dentre outros efeitos fisiológicos (TORRES et al., 2000).

- Citocininas, induzem a divisão celular, no cultivo *in vitro* liberam as gemas axilares da dominância apical tanto no ramo original como nos subsequentes, permitindo a formação de numerosas brotações (TORRES et al., 2000; FALEIRO et al., 2011).

- Giberelinas, estimulam a divisão e/ou alongamento celular, envolvidas na indução e expressão de floração, germinação e superação de dormência de sementes (TORRES et al., 2000), fazendo com que a raiz primária rompa os tecidos que restringem o seu crescimento, como o endosperma, o tegumento da semente ou do fruto (TAIZ e Zeiger, 2004).

Trabalhos com cultivo *in vitro* de *Campomanesia adamantium* na literatura, ainda são poucos, Zago (2013) realizou o estabelecimento *in vitro* da espécie, onde explantes caulinares

foram obtidos de plantas mantidas no campo, e observou que, no tratamento em que o meio de cultura continha ácido ascórbico, este foi ineficiente para diminuir a oxidação, e no tratamento de meio de cultura com a presença do antibiótico rifampicina acima de $30\mu\text{g mL}^{-1}$, este se mostrou eficaz para a contaminação fungica e bacteriana, porém inibiu o desenvolvimento do explante. A desinfestação dos explantes com hipoclorito de cálcio ou tetraciclina em conjunto com carbedazim, também não contribuíram para o estabelecimento *in vitro* da espécie.

Outro trabalho, realizado por Azambuja (2013), estudou a desinfestação de explantes caulinares, com a utilização de cloreto de mercúrio, mas não foi obtido resultados satisfatórios, devido à alta taxa de contaminação microbiana recorrente de patógenos endógenos. O mesmo autor, sugeriu para o cultivo *in vitro* da espécie, o uso de explantes provenientes de plântulas germinadas e cultivadas *in vitro*.

A germinação *in vitro* tem sido empregada como alternativa ao cultivo *in vitro* de várias espécies, tais como *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) (RIBEIRO *et. al*, 2009), *Inga vera* (Fabaceae) (STEIN *et al.*, 2007), entre outros, para a garantia de qualidade fitossanitária das plântulas e posteriormente possa ser feita a padronização dos genótipos, gerados sem mais perda de material devido às contaminações e oxidação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Botânica da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS, durante o período de agosto de 2013 a novembro de 2014. O material vegetal, *C. adamantium*, utilizado para a realização dos experimentos foi obtido de frutos maduros e de plantas, cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA). Para avaliar o poder germinativo e a capacidade organogênica da espécie, realizaram-se três experimentos, o primeiro a partir de sementes, o segundo de brotações de explantes e o último a partir de plântulas germinadas *in vitro*, conforme delineamentos descritos a seguir.

3.1 Efeito de concentrações de ácido giberélico (GA₃) na germinação *in vitro* de *Campomanesia adamantium*

Para avaliar o potencial germinativo de sementes de *C. adamantium* sob o efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃): 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg L⁻¹, totalizando cinco tratamentos. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, cada tratamento com quatro repetições, sendo que cada repetição foi composta de três frascos de cultivo contendo sete sementes cada.

Realizada a coleta dos frutos, as sementes foram retiradas e lavadas em água corrente. A esterilização superficial foi realizada em câmara de fluxo laminar. As sementes foram imersas em álcool 70% por um minuto, seguida da imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% por cinco minutos e então, lavadas por três vezes em água estéril. Posteriormente, foram inoculadas em meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar e em pH 5,8. O meio de cultura foi suplementado com GA₃ conforme tratamentos descritos anteriormente. Cada frasco continha 30mL e haviam sido esterilizados a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação das sementes em câmara de fluxo laminar, os frascos de cultivo foram transferidos para câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, submetidos a um período de escuro de 15 dias e após este período, mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Aos 45 dias de germinação foram avaliadas as variáveis: porcentagem de germinação, comprimento médio da parte aérea (cm), comprimento médio da raiz principal (cm) e número médio de folhas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por regressão polinomial, com o uso do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999). Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de x e os dados obtidos em números foram transformados em raiz quadrada de (x+0,5).

3.2 Efeito de concentrações de TDZ (thiadizuram (N-fenil-N-1,2,3-tiazol-5-tiuréia)) na organogênese *in vitro* de folhas de guavira

O material vegetal utilizado consistiu em folhas de guavira obtidas de brotações provenientes de explantes caulinares previamente estabelecidas *in vitro*. Foram utilizadas cinco concentrações de TDZ: 0 (sem adição de regulador); 5,0; 10; 15 e 20 μM , suplementados com 1,0 μM de ANA (ácido naftaleno acético), totalizando cinco tratamentos. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, cada tratamento com quatro repetições, sendo que cada repetição foi composta por cinco tubos de ensaio contendo uma folha com aproximadamente 1,0 x 0,7cm.

As folhas utilizadas como explantes foram excisadas na altura da nervura central e inoculadas com a face abaxial em contato com o meio. Após a inoculação em meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar e pH 5,8. O meio de cultura foi suplementado com TDZ conforme cada tratamento e esterilizado em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os tubos com os explantes foram vedados papel alumínio e mantidos no escuro por um período de sete dias em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C e após este período foram mantidos sob luminosidade de 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 56 dias e as variáveis analisadas foram: porcentagem de explantes oxidados, porcentagem de explantes que formaram calo e número de brotações emitidas por explante.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas por regressão polinomial, com o uso do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999). Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de x e os dados obtidos em número foram transformados em raiz quadrada de (x+0,5).

3.3 Efeito de TDZ (thiadizurum) e ANA (ácido naftaleno acético) na organogênese *in vitro* de raiz e entre-nó de guavira

O material vegetal utilizado foi obtido de plântulas previamente germinadas *in vitro*. Para a realização dos experimentos foram utilizados dois tipos de explantes (raiz e entre-nó com aproximadamente 1,0 cm) e dois reguladores de crescimento, TDZ (5,0 µM), ANA (1,0 µM) e a combinação destes, TDZ + ANA (5,0 µM + 1,0 µM), obtendo-se um fatorial 2x3, totalizando seis tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, cada tratamento com cinco repetições, sendo que cada repetição foi composta por um frasco de cultivo contendo cinco explantes.

Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido dos reguladores de crescimento (conforme tratamento), 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de inositol e 6 g L⁻¹ de ágar e em pH 5,8 (ajustado após a adição do ágar). Após a distribuição nos frascos de cultivo, a esterilização foi realizada em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os frascos com os explantes foram vedados com papel alumínio e mantidos no escuro por um período de 7 dias em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C e após este período foram mantidos sob luminosidade de 45 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Aos 56 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis: porcentagem de explantes oxidados, porcentagem de explantes que formaram calo e número de brotações emitidas por explante.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro, com o uso do programa estatístico Winstat (MACHADO et al., 1999). Para a análise, os dados obtidos foram transformados em raiz quadrada de (x + 0,5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg

Durante a germinação *in vitro* das sementes de guavira (Figura 1) foi observado que adição de GA₃ no meio de cultura, independentemente da concentração testada, aumenta em aproximadamente 10% o percentual de germinação quando comparado ao controle. Dentre as concentrações testadas de GA₃, o tratamento acrescido de 1,0 mg L⁻¹, proporcionou 100% de germinação.

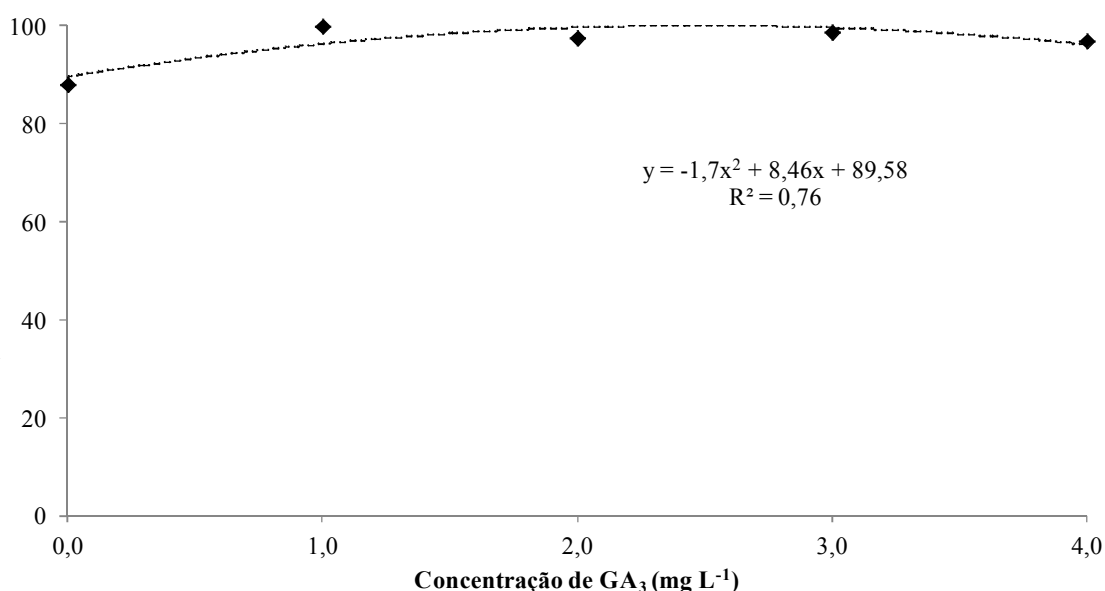


Figura 1. Porcentagem de germinação *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) utilizando diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) aos 45 dias após inoculação.

Resultados semelhantes de germinação, foram observados por Scalón et al. (2009) em sementes de guavira semeadas em até três dias após a retirada das mesmas dos frutos e germinadas em incubadora do tipo BOD, com temperatura controlada de 30°C e luz constante, em que obtiveram valor máximo de germinação (100%). De acordo com Melchior et al. (2006), as sementes de *C. adamantium* não suportam armazenamento a baixas temperaturas e são intolerantes à dessecação, sendo consideradas recalcitrantes. Neste sentido, a perda do poder germinativo das sementes, limita a propagação sexuada da espécie (CARMONA et al., 1994; MELCHIOR et al., 2006; SCALÓN et al., 2009). Desta forma, os resultados obtidos neste experimento sugerem que o ácido giberélico pode ser utilizado como uma alternativa viável na germinação em sementes da espécie. O efeito indutor de germinação do ácido giberélico é de amplo conhecimento, uma vez que, o mesmo estimula a biossíntese de enzimas como a α amilase que é fundamental na degradação do amido, promovendo

germinação mais rápida e uniforme (LIMA *et al.*, 2009). A ação das giberelinas sobre o metabolismo dos glicídios contribui também para que o potencial osmótico celular se torne mais negativo, o que por sua vez permite a entrada de maior fluxo de água na célula, expandindo-a (BRAUN *et al.*, 2010). Ao facilitar o alongamento celular, a raiz primária rompe mais facilmente os tecidos que restringem o seu crescimento e acelera a velocidade de emergência, contribuindo para o desempenho das plântulas (SANTOS *et al.*, 2013).

Observou-se um aumento linear no comprimento da parte aérea concomitante com o aumento da concentração de GA₃ adicionado ao meio de cultivo (Figura 2), verificando-se maior comprimento da parte aérea com o uso de 4,0 mg L⁻¹ de GA₃.

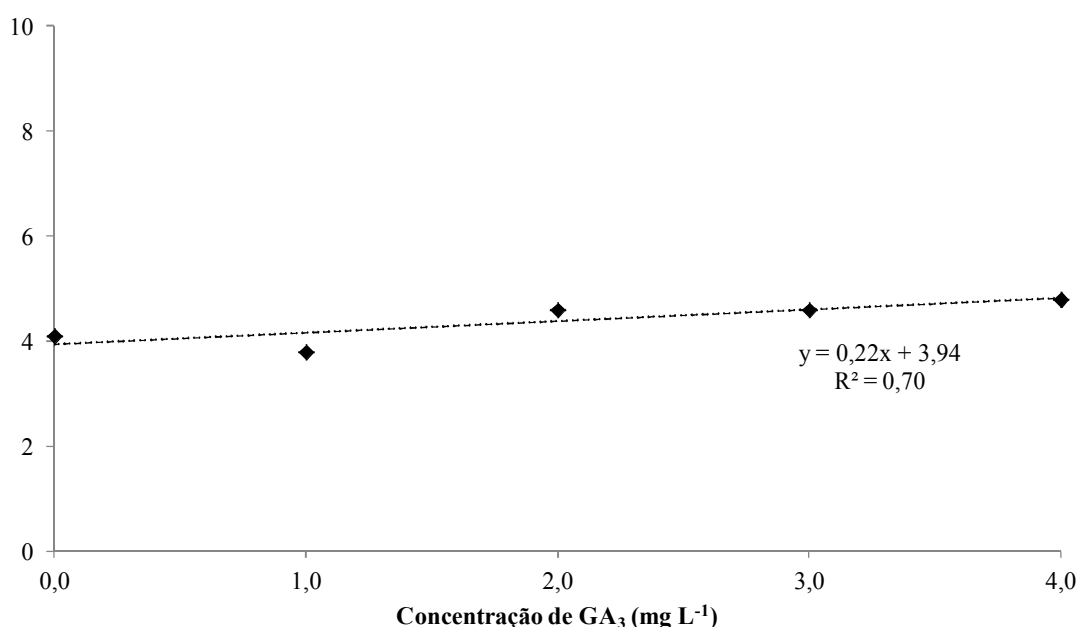


Figura 2. Comprimento médio da parte aérea de plântulas de guavira (*Campomanesia adamantium*) germinadas *in vitro* utilizando diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) aos 45 dias após inoculação.

A atuação benéfica de GA₃ sobre o comprimento da parte aérea vegetal também foi verificada por Soares *et al.* (2012), em *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Os mesmos autores também observaram uma correlação da altura das plantas que aumentaram linearmente com o aumento da concentração do regulador. De acordo com Santos *et al.* (2013), o uso de giberelinas pode inibir ou minimizar o impacto de fatores adversos na qualidade e desempenho das sementes, além de acelerar a velocidade de emergência e auxiliar no desenvolvimento das plântulas. Outro fator que merece destaque encontra-se no fato de que as espécies que são sensibilizadas pelo ácido giberélico podem ser aclimatizadas mais rapidamente, visto que, essa etapa só pode ser realizada quando as mudas produzidas *in vitro* não se encontram em um tamanho reduzido, assim, o efeito das giberelinas no alongamento

das regiões vegetativas permite que um maior número de indivíduos possa ser aclimatizado, diminuindo o período de permanência do material vegetal *in vitro* (DE ALCANTARA et al., 2014).

Em *Eucalyptus dunnii*, espécie pertencente à mesma família da guavira, Myrtaceae, Navroski et al. (2013) também não verificaram efeito da aplicação de GA₃ sobre o alongamento *in vitro* da espécie, os genótipos estudados, ao serem estimulados com GA₃ reduziram o número e o comprimento das brotações, aumentando a formação de calos. Simões et al. (2012) estudaram o efeito das mesmas concentrações de giberelinas testadas neste experimento, durante a germinação *in vitro* de pimenta-longa (*Piper hispidinervum*) e ao contrário dos resultados obtidos, os autores verificaram que o comprimento da parte aérea foi maior na menor concentração estudada, 1,0 mg L⁻¹ de GA₃. Neste sentido é importante salientar que os reguladores de crescimento apresentam respostas diferentes de acordo com a espécie cultivada bem como as classes, tipos e concentrações utilizadas (BASTOS et al., 2007) e até mesmo reguladores de crescimento que pertencem à mesma classe hormonal podem induzir respostas diferenciadas na planta (DIAS et al., 2008).

O uso de diferentes concentrações de ácido giberélico não influenciou no comprimento da raiz principal (Figura 3), sendo observada uma média geral de 1,8 cm.

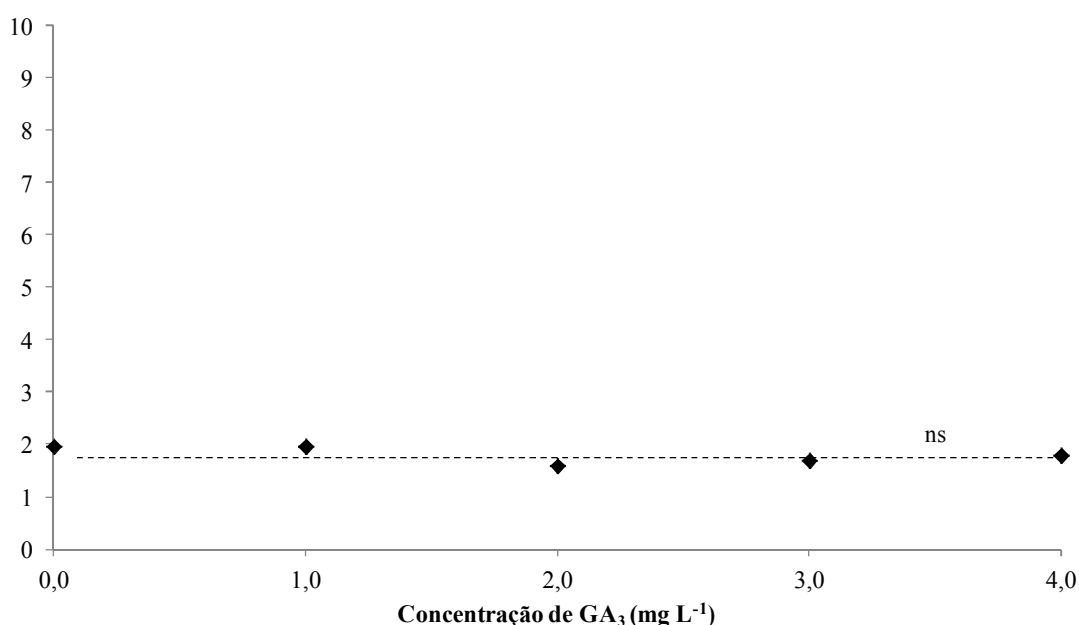


Figura 3. Comprimento médio da raiz principal de plântulas de guavira (*Campomanesia adamantium*) germinadas *in vitro* utilizando diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) aos 45 dias após inoculação.

A atuação das giberelinas na resposta de muitos órgãos da planta é dependente da espécie, do estágio de desenvolvimento, da concentração e da interação de vários fatores. De

acordo com Lima et al. (2009), na maioria das espécies o uso de giberelinas favorece o alongamento celular e estimula a raiz primária a romper os tecidos que restringem seu crescimento. No entanto, como observado neste experimento, o uso de diferentes concentrações de GA₃ não influenciou no crescimento de raiz. De acordo com o trabalho de Torres et al. (2013) com *Capsicum frutescens* (Solanaceae) também não ocorreram alterações notáveis da ação hormonal na crescimento radicular das plântulas, pois o tratamento controle e os tratamentos com adição de giberelina apresentaram resultados similares. Durante a germinação *in vitro* de pimenta-longa (*Piper hispidinervum*) utilizando as mesmas concentrações de GA₃ testadas neste experimento, Simões et al. (2012) verificaram uma redução de forma acentuada do comprimento da raiz.

Semelhante aos resultados verificados no comprimento médio da raiz, para o número de folhas por plântula as concentrações de ácido giberélico testadas, não exerceram influência sobre esta variável (Figura 4).

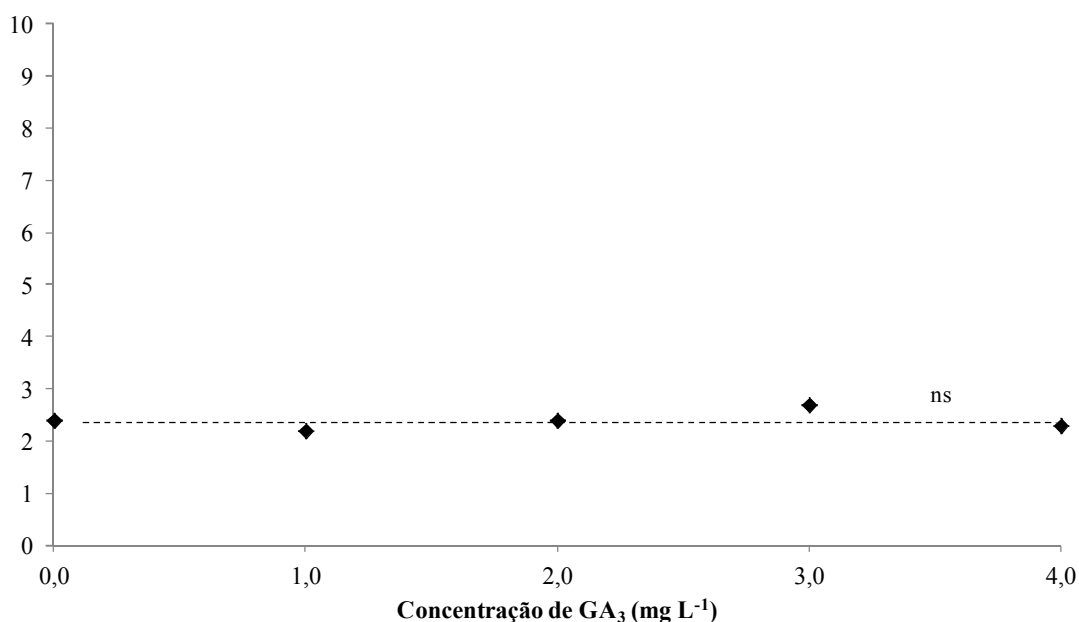


Figura 4. Número médio de folhas por plântula de guavira (*Campomanesia adamantium*) germinadas *in vitro* utilizando diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) aos 45 dias após inoculação.

Em plantas micropropagadas de porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’, durante o processo de aclimatização, Machado et al. (2005) estudaram o efeito da aplicação de diferentes concentrações de giberelinas por aspersão e observaram que o número de folhas foi afetado pela aplicação de GA₃, uma vez que o ácido giberélico por ser um indutor da superação de dormência de gemas, pôde proporcionar o maior número de folhas nas plantas, resultando no desenvolvimento da gema apical.

Quanto ao aspecto geral das plântulas (Figura 5), sementes germinadas na presença de GA₃ desenvolveram plantas mais alongadas e com folhas mais desenvolvidas quando comparados àqueles provenientes de sementes germinadas na ausência de regulador.

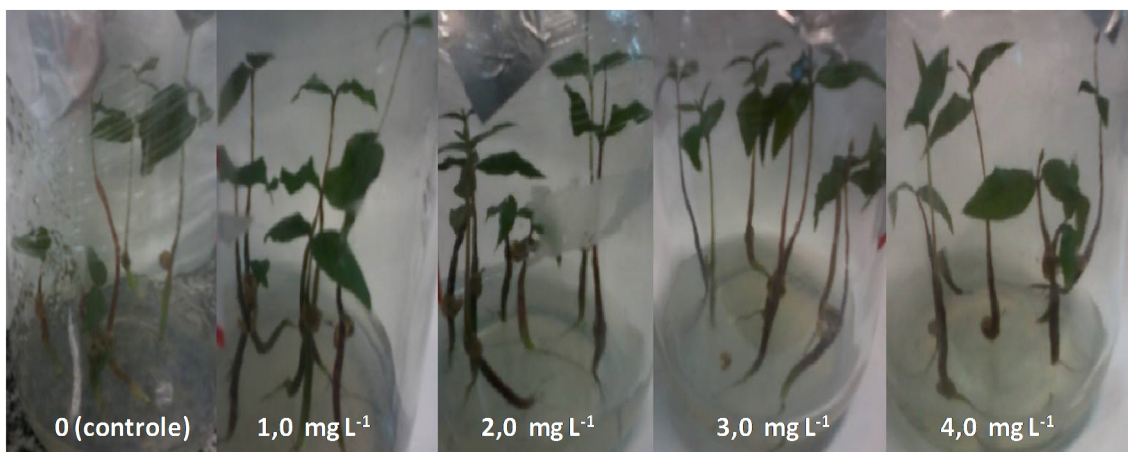


Figura 5. Aspecto geral das plântulas de guavira (*Campomanesia adamantium*) germinadas *in vitro* utilizando diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃), aos 45 dias após inoculação.

3.2 Efeito de concentrações de TDZ (thiadizurom (N-fenil-N-1,2,3-tiazol-5-tiuréia)) na organogênese *in vitro* de folhas de guavira

Nas condições em que o experimento foi conduzido e comparando as médias por regressão polinomial, os dados obtidos com relação à formação de calo nos explantes não diferiram estatisticamente entre as concentrações de TDZ testadas (Figura 6). Mesmo não havendo diferença estatística entre os tratamentos observou-se que o uso de 20 µM de TDZ se comparado ao controle, aumentou em 25% a formação de calos, respectivamente, 85 e 60%.

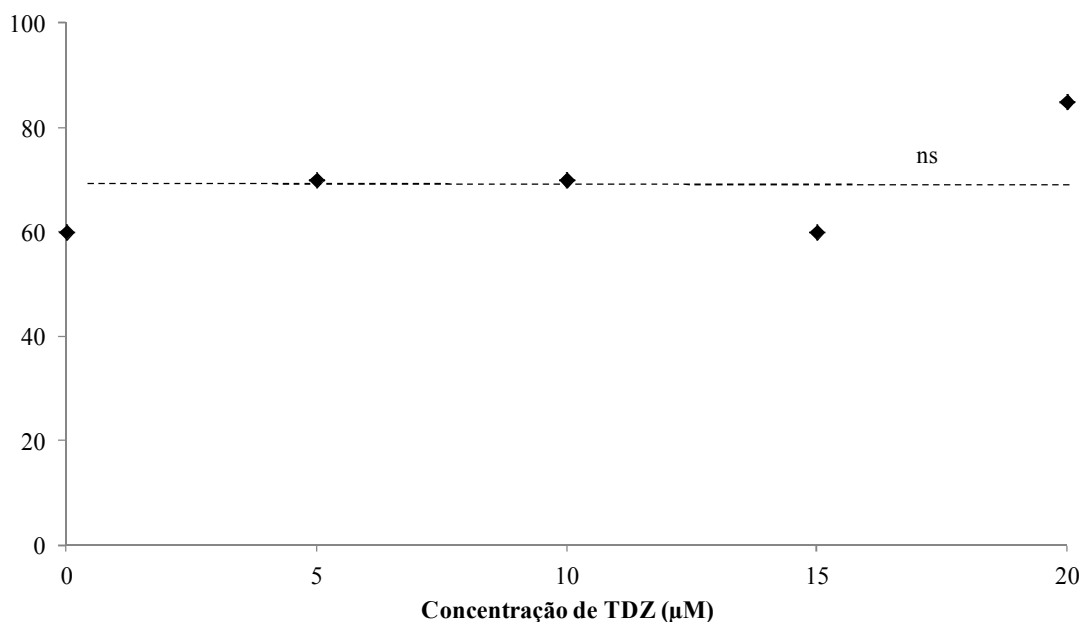


Figura 6. Porcentagem de calos formados por explante durante a organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) utilizando diferentes concentrações de TDZ, aos 56 dias de cultivo.

Valores próximos aos verificados neste experimento, foram registrados por Dibax et al. (2010), utilizando explantes foliares de *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae), cultivados em meio de cultura MS N/2, que encontraram maior porcentagem na formação de calos (73%) utilizando as concentrações de 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ.

Tanto a indução de calos, como a regeneração de plantas a partir de explantes, exigem a presença de uma concentração e combinação adequada de reguladores de crescimento nos meios de cultura, sendo dependentes do tipo de explante, componentes do meio, condições de crescimento, cultura e variedade (SHERKAR e CHAVAN, 2014). O thidiazuron (TDZ) é reconhecidamente um regulador efetivo no controle e indução da morfogênese *in vitro*. Desde a década de 80 existem relatos do efeito do TDZ na indução de gemas adventícias em um grande número de espécies (ACHARJEE et al., 2012). As concentrações utilizadas variam de acordo com o objetivo a ser alcançado, baixas concentrações deste fitormônio promovem a regeneração de tecidos vegetais, promovendo a formação de brotos, podendo também auxiliar na superação da dormência de gemas. Enquanto que, concentrações mais elevadas são capazes de induzir o desenvolvimento de calos (FLORES, 2006). De modo geral, o TDZ aumenta a propagação vegetativa *in vitro* tanto pelo desenvolvimento da embriogênese somática (GRANER et al., 2013) quanto pela indução de organogênese em uma grande variedade de espécies (GUO, 2012), além de exercer outros efeitos fisiológicos em diferentes espécies conhecidas, como indução da germinação de sementes, desenvolvimento e

crescimento dos cotilédones, formação de tricomas e aparição de estômatos em peças florais (ROY et al., 2012).

Quanto ao percentual de explantes oxidados, semelhante à formação de calos, não houve diferenças significativas entre os tratamentos quando analisados os dados por regressão polinomial (Figura 7). Estes resultados sugerem que o processo de oxidação dos explantes não é influenciado pela presença do regulador de crescimento TDZ e sim derivado do próprio explante ou da manipulação do mesmo. O processo de oxidação é comum, principalmente em espécies da família Myrtaceae, devido a produção e liberação de compostos fenólicos, verificado pelo escurecimento das superfícies seccionadas dos explantes e pela modificação da coloração, e inclusive escurecimento do meio de cultura (MICHELUZZI, 2007).

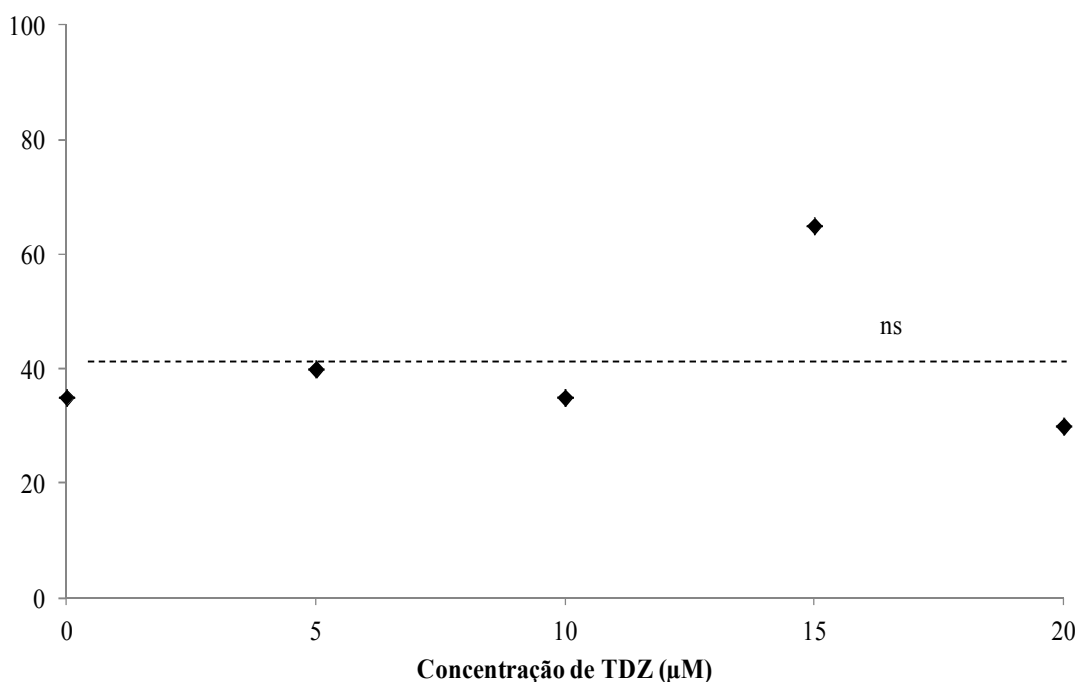


Figura 7. Porcentagem de explantes oxidados durante a organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) utilizando diferentes concentrações de TDZ, aos 56 dias de cultivo.

Com relação à emissão de brotações, em nenhuma das concentrações testadas e durante o período de avaliação (56 dias) houve emissão de brotações, conforme pode ser observado na figura 8.

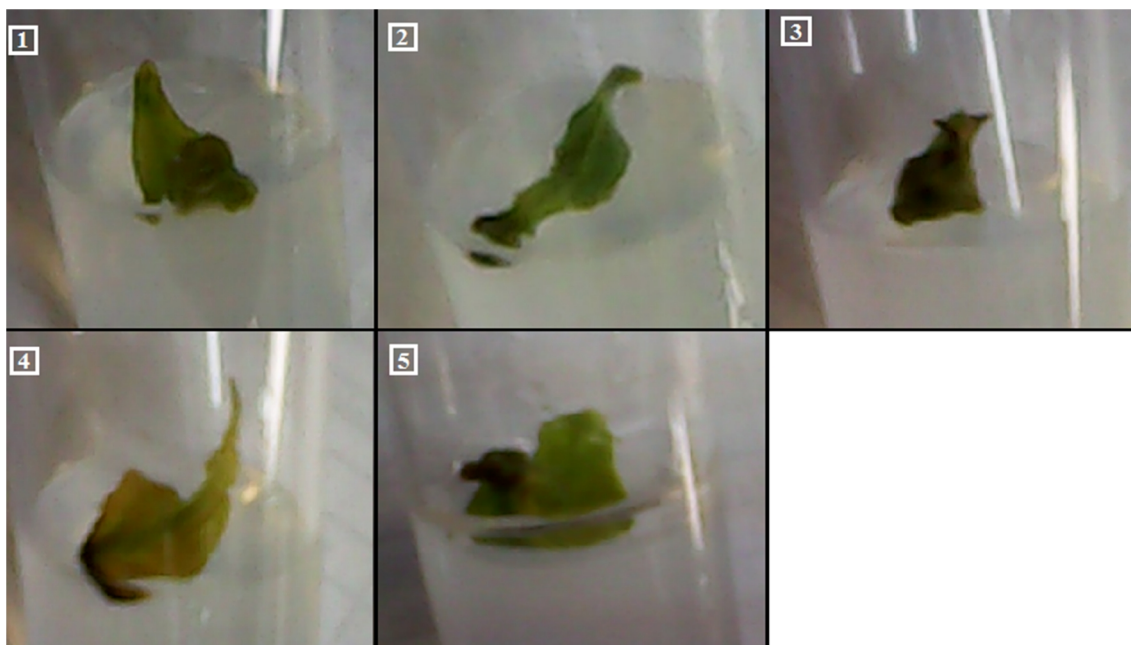


Figura 8. Aspecto visual da formação de calos durante o processo de organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) a partir de explantes foliares, aos 56 dias de cultivo em meio MS suplementado com diferentes concentrações de TDZ. 1 – Controle (0); 2 – 5,0 μM ; 3 – 10 μM ; 4 – 15 μM ; 5 - 20 μM .

3.3 Organogênese *in vitro* de guavira utilizando diferentes tipos de explantes e diferentes reguladores de crescimento.

Neste experimento verificou-se que a formação de calos é dependente do tipo de explante utilizado. Explantes provenientes de entre-nós caulinares são mais responsivos e apresentam maior formação de calos em meio de cultura suplementado com 5,0 μM de TDZ e na combinação de TDZ + ANA, nas respectivas concentrações, 5,0 e 1,0 μM , quando comparados com explantes provenientes de raízes nos mesmos tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de calos formados por explante durante a organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) utilizando diferentes tipos de explantes e reguladores de crescimento aos 56 dias de cultivo.

Tipo de explante	Explantes que formaram calo (%)		
	TDZ (5 μM)	ANA (1 μM)	TDZ+ANA (5+1 μM)
Entre-nó	100 a A*	52 a B	100 a A
Raiz	20 b B	44 a AB	64 b A

*Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferiram entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Apesar da dediferenciação dos explantes formando calos, não houve emissão de brotações (Figura 9), podendo este fato estar relacionado ao uso de concentrações hormonais inadequadas nesta espécie.

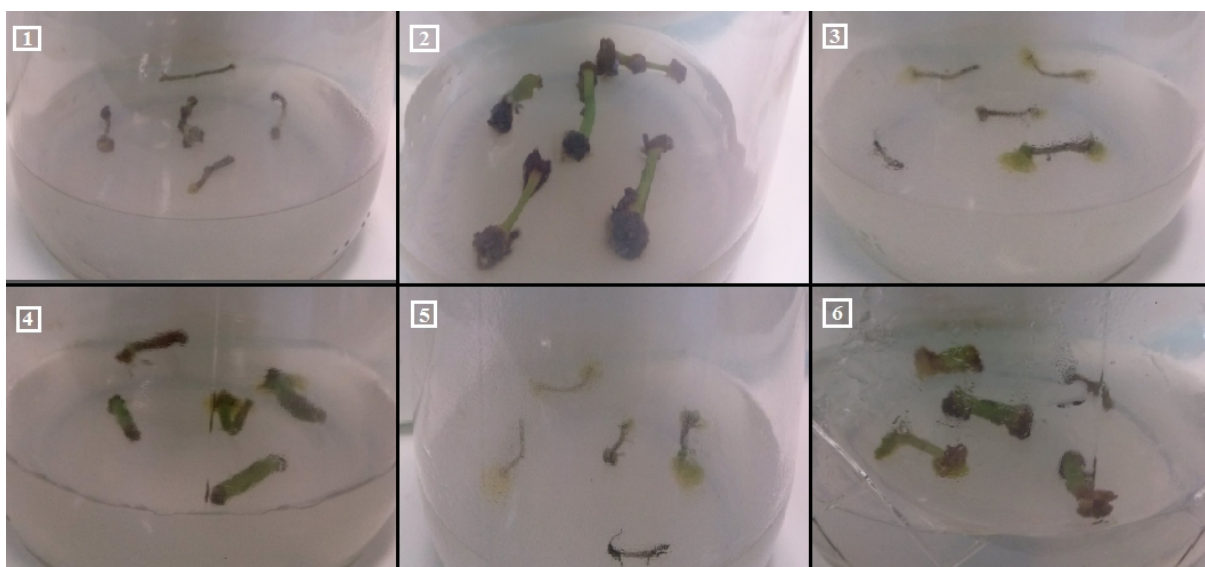


Figura 9. Aspecto visual da formação de calos durante o processo de organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) a partir de explantes caulinares internodais e radiculares, cultivados em meio MS suplementado com diferentes reguladores de crescimento. 1 – Raiz, 5,0 μM de TDZ; 2 – Entre-nó, 5,0 μM de TDZ; 3 – Raiz, 1,0 μM de ANA; 4 – Entre-nó, 1,0 μM de ANA; 5 – Raiz, 5,0 μM de TDZ + 1 μM de ANA; 6 – Entre nó, 5 μM de TDZ + 1 μM de ANA.

De acordo com Silva et al. (2011) além da espécie, o uso e a otimização da concentração do regulador de crescimento possui papel determinante na indução da regeneração *in vitro*. Este fitoregulador tem sido mais eficiente que outros tipos de citocininas, como o BAP (6-benzilaminopurina) e a cinetina, principalmente em espécies lenhosas.

O efeito estimulante do TDZ sobre a indução de calos foi observado também por De Carvalho et al. (2011) em videiras (*Vitis vinifera*), onde a formação de calos foi influenciada de maneira significativa pelo tipo de explante utilizado, uma vez que os internódios foram os mais responsivos com percentual em 47,4%, em comparação aos segmentos foliares em apenas 7,2%. Os mesmos autores verificaram que concentrações elevadas de TDZ, respectivamente, 5 μM e 10 μM , propiciaram elevada formação de calos, porém destacam a concentração de 2,5 μM como mais vantajosa por promover melhores resultados durante a regeneração de brotos.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram verificados por Gobara (2011). O mesmo observou que em explantes radiculares de mogno (*Swietenia macrophylla*

King) o uso de 0,1 μM de ANA combinado com 0,5; 1,0 e 1,5 μM de TDZ induziram reduzida formação de calos e nenhuma diferenciação destes calos em gemas.

De acordo com Oliveira-Cauduro et al. (2014), a formação de calos além de ser influenciada pela concentração de TDZ, também é influenciada pelo meio de cultura utilizado. Em híbridos de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* os mesmos autores verificaram que em meio de cultura JADS adicionado de 0,5 μM de TDZ ocorreu à formação de calos em 83,3% dos explantes, enquanto em meio MS, com a mesma concentração de TDZ, os autores verificaram a formação de calos em somente 55% dos explantes.

Quanto à oxidação dos explantes, nas concentrações testadas, os reguladores de crescimento utilizados não exerceram influência sobre está variável (Tabela 2). Por outro lado, observou-se que a oxidação é dependente do tipo de explante utilizado. Explantes internodais, nos tratamentos testados, não apresentaram oxidação, enquanto que, explantes radiculares apresentaram oxidação em todos os tratamentos, mesmo que em valores relativamente baixos. Provavelmente este fato está associado às células da raiz apresentar maior sensibilidade e suscetibilidade à luz, resultando em maior atividade das enzimas oxidativas.

Tabela 2. Porcentagem de explantes oxidados durante a organogênese *in vitro* de guavira (*Campomanesia adamantium*) utilizando diferentes tipos de explantes e regulador de crescimento aos 56 dias de cultivo.

Tipo de explante	Explantes oxidados (%)		
	TDZ (5 μM)	ANA (1 μM)	TDZ+ANA (5+1 μM)
Entre-nó	0 a A*	0 b A	0 b A
Raiz	8 a A	16 a A	20 a A

*Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferiram entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade de erro.

A ocorrência da oxidação em explantes de plantas lenhosas é um problema comum (JASKANI et al., 2008; DE CARVALHO et al., 2011). De acordo com Ribeiro et al. (2013) à oxidação dos explantes geralmente ocorre em função da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos vegetais. No cultivo *in vitro* o processo de oxidação pode ser desencadeado por injúrias causadas aos tecidos vegetais, como o corte dos explantes com bisturi (CID e TEIXEIRA, 2010) ou devido à utilização de agentes químicos na esterilização superficial. O tecido lesionado libera compostos fenólicos que em contato com as enzimas polifenoloxidasas oxidam os polifenóis formando as quinonas. As quinonas são substâncias altamente ativas e,

posteriormente à sua produção, polimerizam e ou oxidam proteínas para formar compostos melânicos, os quais são responsáveis pelo escurecimento das partes excisadas dos explantes e do meio de cultura (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). O acúmulo de polifenóis e de produtos da oxidação modificam a composição do meio e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000), inibindo o crescimento e podendo causar a morte dos explantes (SATO et al., 2001).

5. CONCLUSÕES

O uso de ácido giberélico durante a germinação *in vitro* de sementes de guavira, independentemente da concentração testada promove um aumento do percentual de germinação. O uso de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido giberélico é suficiente para promover 100% de germinação, enquanto que o uso de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ promove um aumento elevado do comprimento de parte aérea. O uso de GA_3 nas concentrações estudadas não alteraram o comprimento da raiz principal e número de folhas por plântulas.

Na organogênese *in vitro* de guavira, explantes foliares cultivados em meio contendo $20 \text{ }\mu\text{M}$ TDZ apresentam maior porcentagem de formação de calos e menores percentuais de oxidação. Explantes provenientes de entre-nós caulinares são mais responsivos e apresentam maior formação de calos, em meio de cultura suplementado com $5,0 \text{ }\mu\text{M}$ de TDZ e em meio suplementado com TDZ + ANA ($5,0+1,0 \text{ }\mu\text{M}$), quando comparados aos explantes provenientes de raízes nos mesmos tratamentos. Explantes radiculares apresentaram maior percentual de oxidação, principalmente nos tratamentos com ANA e ANA+TDZ.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARJEE, S.; HANDIQUE, P. J.; SARMAH, B. K. Effect of thidiazuron (TDZ) on *in vitro* regeneration of blackgram (*Vigna mungo* L.) embryonic axes. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, Korea, v.15, 2012.

AMARAL, E. V. E. J. **Caracterização morfológica e identificação taxonômica de espécies de Campomanesia ruiz e pavon (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Goiás. Jataí: UFG, 2012.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, 2000.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais**. Documentos, 58. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2002.

ARAÚJO, L. R.; ALVES, E. U.; RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, A. A. M. Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Eugenia jambolana* Lam. após remoção da polpa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.1, 2015.

ARENHART, R. A.; ZAFFARI, G. R. Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 1, 2008.

AZAMBUJA, T. M. S. **Estabelecimento *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg**. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

BASTOS, L. P.; MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; DA ROCHA, M. C.; HANSEN, D. S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl. 2, 2007.

BERG, O.C. Myrtaceae. In K.F.P. von Martius (org.) **Flora Brasiliensis** v. 14. 1857-1859.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage-Myrtaceae**. Dissertação (Mestrado em Insumos, Medicamentos e Correlatos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba: UFPR, 2010.

BRAUN, H.; LOPES, J. C.; DE SOUZA, L. T.; SCHMILDT, E. R.; CAVATTE, R. P. Q.; CAVATTE, P. C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3, 2010.

CANDOLLE, A. P. **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis**. Paris, Treuttel et Wurtz. v.3. 1828.

CARMONA, R.; REZENDE, L. P.; PARENTE, T. V. Extração química de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.1, 1994.

CARVALHO, D. C.; DA SILVA, A. L. L.; TANNO, G. N.; PURCINO, M.; BIASI, L. A. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, 2011.

CERQUEIRA, M. D. **Estudo Fitoquímico de Myrcia rotundifolia (Berg.) Legrand.(Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia. Salvador: UFBA, 2002.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

COSTA, E.; SILVA, P. N. L.; JORGE, M. H. A.; FERREIRA, A. F. A. Guavira emergence and seedling production with substrates containing organic compost and soil under different screen environments. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.4, 2012.

DE ALCANTARA, G. B.; MACHADO, M. P.; RIBEIRO, D. de S.; WIPPEL, H. H.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DE OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E. Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações *in vitro* de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 1, 2014.

DIAS, G. M. G.; DE CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; MORAIS, J. P. S. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. **Plant Cell Culture e Microporpagation**, Lavras, v.4, n.1, 2008.

DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; VIEIRA, L. G. E.; MOLINARI, H. B. C.; DE CAMPOS, M. K. F.; QUOIRIN, M. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 54, n. 1, 2010.

DRESCH, D. M.; SCALON, S. P. Q.; MASETTO, T. E.; MUSSURY, R. M. Storage of *Campomanesia adamantium*(Cambess.) O. Berg Seeds: Influence of Water Content and Environmental Temperature. **American Journal of Plant Sciences**. v. 5, n. 17. 2014.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, 2005.

FALEIRO, F. G.; DE ANDRADE, S. R. M.; DOS REIS JÚNIOR, F. B. **Biotechnology: state of the art applications in agriculture**. Embrapa Cerrados. 2011.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de β-ecdisona em Pfaffia glomerata e Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae)**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FORZZA, R. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.2, 2010. Disponível em: <<http://www.santoandre.sp.gov.br/pesquisa/ebooks/344924.pdf>> Acesso em: 31 jan. 2015.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrech, The Netherlands: Springer. v. 1, 2008.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrech, The Netherlands: Springer. v. 1, 2008.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa - CNPH. 1998.

GOBARA, B. N. K. **Calogênese a partir de segmentos de epicótilos e raízes de mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Monografia - Curso de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2011.

GRANER, E. M.; OBERSCHELP, G. P. J.; BRONDANI, G. E.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; DE ALMEIDA, C. V.; ALMEIDA, M. de. TDZ pulsing evaluation on the *in vitro* morphogenesis of peach palm. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 19, 2^a ed., 2013.

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

GUO, B.; STILES, A. R.; LIU, C. Thidiazuron enhances shoot organogenesis from leaf explants of *Saussurea involucreta* Kar. Et Kir. **In vitro Cellular e Developmental Biology-Plant**, v. 48, 2012.

IMATOMI, M. **Estudo alelopático de espécies da família Myrtaceae do Cerrado**. Tese (Doutorado em Ecologia e Ciências Naturais) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos: UFSCar. 2010.

JASKANI, M. J.; ABRAS, H.; SULTANA, R.; KHAN, M. M.; QASIM, M.; KHAN, I. A. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, 2008.

KATAOKA, V. M. F.; MELO, A. M. M. F.; EBERHARDT, G. M.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana de dos extratos etanólicos das cascas dos frutos e das folhas de *Campomanesia adamantium*. In: Simpósio Nacional Cerrado e Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília. **Anais**. Brasília: EMBRAPA Cerrados, 2008.

LANDRUM, L.R. Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae). **Flora Neotropica**. New York. v.45. 1986.

LIMA, C. S. M.; BETEMPS, D. L.; TOMAZ, Z. F. P.; GALARÇA, S. P.; RUFATO, A. R. Germinação de sementes e crescimento de maracujá em diferentes concentrações do ácido giberélico, tempos de imersão e condições experimentais. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 15, n. 1-4, 2009.

LIMA, D. F.; GOLDENBERG, R.; SOBRAL, M. O gênero Campomanesia no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**. Rio de Janeiro. v.62, n.3, 2011.

LINNAEUS, C. **Species plantarum**. Salvius, Stockholm. v.2. 1753.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas** (de consumo *in natura*). São Paulo: Plantarum. 2006.

MACHADO, A. A.; SILVA, J. G. C.; SILVEIRA JUNIOR, P.; CONCEIÇÃO, A. R. **Winstat-sistema de análise estatística para Windows**, 1999.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A.; COSTACURTA, M. A. Aplicação de ácido giberélico em mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’. **Scientia Agrária**, Curitiba, v.6, n.1, 2005.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; MACHADO NETO, N. B. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb.-Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, 2006.

MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da gabiobeira (*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, MG. 2000.

MICHELUZZI, F. C. **Estudo da organogênese *in vitro* de explantes foliares de macieira (*Malus domestica* Borkh) Cv. Galaxy**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, 1962.

NAVROSKI, M.C.; REINIGER, L.R.S.; PEREIRA, M. de O.; CURTI, A.R.; PAIM, A.F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* maiden. **Cerne**, Lavras, v.19, n.4, 2013.

OLIVEIRA, M. I. U.; LANDRUM, L. R.; DE OLIVEIRA, R. P.; FUNCH, L. S. A. New species of Campomanesia (Myrtaceae) from Bahia, Brazil, and its relationships with the C. xanthocarpa complex. **Phytotaxa**. v. 149, n. 1, 2013.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y.; ADAMUCHIO, L. G.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J. BESPALHOK FILHO, J. C.; DIBAX, R.; QUOIRIN, M. Organogênese indireta a partir de explantes foliares e multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 2, 2014.

PASCOAL, A. C. R. F. **Prospecção de antioxidantes e de substâncias com atividade antiproliferativa em *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em biologia vegetal) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas: UNICAMP, 2012.

PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D. HONDA, N. K. CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SATO, D. N. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, 2009.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; DA SILVA, V. J.; DE MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.7, 2011.

RESENDE, M. L. F; GUIMARÃES, L. L. **Inventários da Biodiversidade do Bioma Cerrado: Biogeografia de Plantas**. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. Disponível em: <ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/levantamento/biogeografia.pdf> Acesso em: 14 janeiro 2015.

RIBEIRO, J. M.; MELO, N. F.; COELHO, A. K. N. S.; PINTO, M. S. T. Uso da rapadura como meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de bananeira cv maçã. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 5, 2013.

RIBEIRO, M. N. O. *et al.* *In vitro* seed germination and seedling development of *Annona crassiflora*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.66, 2009.

ROCHA, G. F.; FERREIRA, L. G.; FERREIRA, N. C.; FERREIRA, M. E. Detecção de desmatamentos no bioma cerrado entre 2002 e 2009: padrões, tendências e impactos. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 63, n. 03, 2011.

ROY, A. R.; SAJEEV, S.; PATTANAYAK, A.; DEKA, B. C. TDZ induced micropropagation in *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. and assessment of genetic variation in the regenerated plants. **Plant Growth Regulation**, v. 68, 3^a ed., 2012.

RUFINI, A. L. **Uso Múltiplo e Sustentável do Cerrado *Sensu Stricto*: Utilizando Programação Linear Inteira**. Tese (Doutorado em Florestas de Produção) – Universidade Federal de Lavras. Lavras: UFLA, 2014.

RUIZ, H.; PAVÓN, J. **Florae Peruvianae et Chilensis Prodromus**. La Imprenta de Sancha, Madrid, 1794.

SANTOS, C. A. C.; VIEIRA, E. L.; PEIXOTO, C. P.; LEDO, C. A. S. Germinação de sementes e vigor de plântulas de maracujazeiro amarelo submetidos à ação do ácido giberélico. **BioScience Journal**, Uberlândia, v. 29, n.2, 2013.

SANTOS, G. M.; DE PAIVA, J. C. Q. C.; SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M. Avaliação da intensidade luminosa no desenvolvimento inicial de espécies frutíferas nativas do cerrado. **Acta Biológica Catarinense**, v. 1, n. 1, 2014.

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

SCALON, S. P. Q.; DE LIMA, A. A.; SCALON FILHO, H.; VIEIRA, M. C. Germinação de sementes e crescimento inicial de mudas de *Campomanesia adamantium* Camb. O. Berg.: Efeito da lavagem, temperatura e de bioestimulantes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, 2009.

SHERKAR, H. D; CHAVAN, A. M. Effect of 2, 4-D, BAP and TDZ on callus induction and shoot regeneration in potato. **Science Research Reporter**, vol.4, n.1, 2014.

SILVA, I. M. C. ; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J. Resposta diferencial ao uso do thidiazuron na regeneração *in vitro* de marmeleiros, CVS. Adams e MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 17, n. 3-4, 2011.

SIMÕES, M. A.; VASCONCELOS, J. M.; DE OLIVEIRA, J. P.; BELTRÃO, R. T.; MANFIO, C. E.; FERMINO JUNIOR, P. C. P.; RAPOSO, A. Efeito do ácido giberélico (AG₃) no alongamento *in vitro* de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) durante a micropropagação. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, Belém, v.7, n.14, 2012.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. California: Academic Press, 2000.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P. Q.; ROSA JUNIOR, E. J. Germinação assimiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, 2012.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10307>. Acesso em: 01 fevereiro 2015.

SOUZA, J. C.; PICINELLI, A. C.; AQUINO, D. F. S.; DE SOUZA, V. V.; SCHMITZ, W. O.; TRAESEL, G. K.; CARDOSO, C. A. L.; KASSUYA, C. A. L.; ARENA, A. C. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. **Nutritional neuroscience**, 2014.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, L. C.; EMRICH, E. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v.31, 2007.

TABARES, E.; PACHÓN, I.; ROCA, W.M. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry, 1984. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation-Technology and Application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

TORRES, R. C.; BORGES, K. C. A. S. Ação da giberelina no crescimento de pimenta (*Capsicum frutescens*). **Cadernos UniFOA**. Edição Especial Ciências da Saúde e Biológicas / Centro Universitário de Volta Redonda. Ano VIII, Volta Redonda: FOA, 2013.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; DE OLIVEIRA, E.; MORENO, R. H.. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 4, 2006.

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; DA SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

ZAGO, T. O. **Estabelecimento *in vitro* de guavirobeira (*Campomanesia adamantium* (Camb.) O. Berg)**. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.