

Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*

Micropropagation and conservation of *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. *in vitro* germoplasm bank

Leticia Maria Martins^I Ana Maria Soares Pereira^{II} Suzelei de Castro França^{II}
Bianca Waléria Bertoni^{III*}

RESUMO

A *Macrosyphonia velame* é uma planta medicinal do Cerrado, pertencente à família Apocynaceae, e conhecida popularmente como velame branco. Extratos de raízes de velame são utilizados pela população como depurativo e anti-sifilítico. Este trabalho teve como objetivo desenvolver o protocolo de micropropagação de *M. velame*, com vistas à conservação da espécie em Banco do Germoplasma *in vitro*. Sementes foram coletadas nos municípios de Sacramento, Tapira e Araxá, MG, e utilizadas como fonte de explantes. Segmentos nodais de plântulas axênicas foram transferidos para meio MS/2 suplementado com BAP, Cinetina, 2ip e TDZ em diferentes concentrações (0,25; 5,0 e 1,0mg L⁻¹). Para o enraizamento, brotações com 2cm de altura foram transferidas para meios MS/2 suplementado com 1,0; 5,0; e 10,0mg L⁻¹ de IBA ou ANA e cultivadas por 5, 10 e 30 dias, sendo em seguida subcultivadas em MS/2 por mais trinta dias e só então avaliadas quanto à formação de raízes. Na aclimatização e enraizamento *ex vitro*, foram utilizados substratos Plantmax[®], areia e solo individualmente ou em combinações (1:1) de areia/Plantmax[®]; areia/solo; Plantmax[®]/solo. Para o estabelecimento do Banco de Germoplasma, brotações com 3,5cm foram transferidas para meio MS/2 suplementado com 2% de sacarose + 4% de manitol ou sorbitol; 2% de sacarose + 4% de manitol ou sorbitol + 2mg L⁻¹ de pantotenato de cálcio; 2% de sacarose + 4% de manitol ou sorbitol + 2mg L⁻¹ de espermidina. A porcentagem de germinação *in vitro* foi baixa, 33%, 4% e 2% das sementes coletadas em Araxá, Tapira e Sacramento, respectivamente. O meio MS/2 sem adição de citocinina promoveu a proliferação de brotos (4,0 por gema), alongação (5,2cm), número de gemas (8,6) e reduziu vitrificação (4%). Em relação aos substratos testados, as plântulas se desenvolveram melhor no Plantmax[®], sendo que 40% das plântulas sobreviveram e a maioria apresentou formação de raízes. Plântulas cultivadas por três meses em meio de cultura

MS/2 + 2% de sacarose + 4% de manitol + 2mg L⁻¹ de pantotenato de cálcio, sob condições de Banco de Germoplasma, apresentaram 40% de sobrevivência.

Palavras-chave: Apocynaceae, cultura de tecidos, planta medicinal, Cerrado, velame.

ABSTRACT

Root extracts of *Macrosyphonia velame* an Apocynaceae native of Brazilian Cerrado, known as white velame have been popularly used as depurative and anti-syphilitic agent. The aim of the present research was to develop a micropropagation protocol for the *in vitro* conservation of *M. velame* in a germplasm bank. Seeds of velame collected in Sacramento, Tapira and Araxá, MG, Brazil, were used as initial explants. Nodal segments from axenic plantlets were inoculated on MS/2 medium supplemented with different concentrations (0.25, 5.0 and 1.0mg L⁻¹) of BAP; kinetin; 2iP or TDZ. For *in vitro* rooting, plantlets (2cm high) were inoculated on MS/2 medium supplemented with IBA or NAA (1.0, 5.0, and 10.0mg L⁻¹), maintained for 5, 10 and 30 days and sub-cultured to MS/2 medium for an additional thirty days before evaluating rooting. For acclimatization and *ex vitro* rooting plantlets were transplanted into Styrofoam boxes containing either Plantmax[®], sand and soil one by one or in combinations (1:1) of sand/Plantmax[®]; sand/soil; Plantmax[®]/soil. For the *in vitro* conservation of *M. velame* in germplasm bank plantlets (3.5cm high) were inoculated on MS/2 medium supplemented with either 2% sucrose + 4% of mannitol or sorbitol; 2% sucrose + 4% mannitol or sorbitol + 2mg L⁻¹ calcium pantothenate; 2% of sucrose + 4% of mannitol or sorbitol + 2mg L⁻¹ spermidine. The proportion of seed germination was considered low, 33%, 4% and 2% for seeds collected in Araxá, Tapira and Sacramento respectively. Explants cultured on MS/2 medium without addition of cytokinin showed enhanced height (5.2cm),

^IPrograma de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.

^{II}Unidade de Biotecnologia de Plantas Mediciniais, UNAERP, 14096-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil. E-mail:

bbertoni@unaerp.br *Autor para correspondência.

increased number of buds (8.6), proliferation of 4 shoots per bud and minimal (4%) proportion of vitrification. Plantlets acclimatized *ex vitro* developed better in Plantmax® substrate, most plantlets presented root formation and survival reached 40%. *M. velame* plantlets cultured for three months on MS/2 added with 2% sucrose + 4% mannitol + 2mg L⁻¹ of calcium pantothenate, under germoplasma bank conditions presented 40% of survival.

Key words: *Apocinaceae*, tissue culture, medicinal plant, Cerrado, *velame*.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e apresenta características peculiares por sua constituição em mosaicos, com vegetação que varia desde campos abertos até formações florestais. A riqueza de espécies, tanto da flora quanto da fauna, é expressiva, representando cerca de 30% da biodiversidade brasileira (AGUIAR & CAMARGO, 2004).

Este bioma apresenta uma flora medicinal riquíssima e vem sofrendo um histórico processo de degradação, principalmente pela produção de monoculturas, sobretudo de plantas anuais como soja, arroz e milho que ocupam áreas extensas, comprometendo a heterogeneidade e riqueza florística (ALMEIDA et al., 1998). Com a expansão da fronteira agrícola, a fauna e muitas espécies vegetais medicinais bem como o conhecimento a elas associado vêm desaparecendo, o que contribuiu para que o Cerrado se tornasse um dos 25 *hotspots* mundiais (MEYERS et al., 2000).

Segundo FACHIM & GUARIM (1995), plantas como *velame* (*Macrosyphonia velame*), verga teso (*Anemopaegma arvense*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e mangava brava (*Lafoensia pacari*) estão enquadradas na categoria de espécies vulneráveis. Essa situação é agravada pelo fato de essas plantas conterem seus princípios ativos nas raízes, xilopódios e entrecasca, cuja retirada dos órgãos ou parte da planta compromete a sobrevivência da espécie.

Macrosyphonia velame é uma espécie medicinal nativa do Cerrado, pertencente à família *Apocynaceae*. É conhecida popularmente como *velame-branco*, *velame*, *babado*, *barbasco*, *flor-de-barbeiro* e *jalapa-branca*. A raiz é amplamente utilizada pela população como anti-inflamatório, depurativo, anti-sifilítico, coceiras, dermatoses, úlceras externas e, eczemas (SIQUEIRA, 1982; MACEDO & FERREIRA, 2004). Até o presente momento, embora a espécie *M. velame* seja amplamente utilizada por comunidades tradicionais que habitam o cerrado, não há relatos de um programa de conservação e utilização de uso

sustentável de populações naturais da espécie. Para casos como esses, segundo AUGUSTIN et al. (2002), o desenvolvimento de protocolo de micropropagação é indicado por apresentar um potencial prático de produção em larga escala de plântulas, o que poderá evitar a erosão genética.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação de *Macrosyphonia velame*, com vistas à conservação da espécie em banco de germoplasma *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Micropropagação

A coleta de sementes e material botânico para confecção de exsiccatas foi realizada nos municípios de Sacramento, Tapira e Araxá (MG) no mês de maio de 2006, as exsiccatas foram depositadas no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (*Voucher* HPMU-015).

As sementes foram submetidas a quatro tratamentos de assepsia: 1-24 horas em solução de cercobim 1% e logo após transferidas para álcool 70% durante 30 segundos; 2- 24 horas em solução de cercobim 1% +10mg L⁻¹ cefotaxima +10mg L⁻¹ de gentamicina + 10mg L⁻¹ de canamicina, transferidas para álcool 70% por 30 segundos e, posteriormente, permaneceram 30 minutos em solução de hipoclorito de cálcio 0,5%; 3-4 horas em solução de cercobim 1% + 10mg L⁻¹ de gentamicina e transferidas para uma solução de hipoclorito de cálcio 0,5%, durante 30 minutos. No tratamento quatro, as sementes permaneceram 24 horas em cercobim 1% + 10mg L⁻¹ de cefotaxima + 10mg L⁻¹ de gentamicina + 10mg L⁻¹ de canamicina, em seguida, foram transferidas para uma solução de álcool 70% por 30 segundos e, posteriormente, permaneceram 30 minutos em hipoclorito de cálcio 1% pH 5,0. Após os tratamentos, as sementes foram lavadas em água autoclavada e inoculadas em meio Wood Plant (WP). Após 30 dias de cultivo, avaliaram-se a porcentagem de germinação e o número de sementes axênicas.

Segmentos nodais retirados de brotações axênicas advindas de sementes de *M. velame* germinadas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura MS/2, suplementado com 0,25; 0,5 e 1,0mg L⁻¹ de BAP (Benzilaminopurina), Cinetina, 2ip (Isopentenil aminopurina) e TDZ (Thidiazuron). Após 30 dias, realizaram-se avaliações quanto ao número e comprimento de broto, número de gemas por broto e presença de calos nos explantes.

Brotações mantidas em MS/2 com 6cm de altura e com cinco gemas foram utilizadas no experimento de posição da gema. Foram seccionadas as gemas localizadas em quatro diferentes posições no caule (gema apical, 2ª, 3ª e 4ª gema) e inoculadas em

meio de cultura MS/2 suplementado com 0,5mg L⁻¹ de BAP. Os explantes foram mantidos nesse meio de cultura por 30 dias e posteriormente avaliados quanto ao número e a altura das brotações.

Brotações com 2cm de comprimento foram transferidas para meios MS/2 basal e MS/2 suplementado com 1,0; 5,0 e 10,0mg L⁻¹ de IBA (Ácido indolbutírico) ou ANA (Ácido naftalenoacético) para induzir o enraizamento. Os explantes permaneceram nos respectivos meios por 5, 10 e 30 dias, sendo, em seguida, transferidos para MS/2 isento de regulador, permanecendo por 30 dias antes da avaliação em relação à presença ou ausência de raízes.

Na aclimatização foram utilizadas brotações com 5cm de comprimento, transferidas para sacos de polietileno preto perfurados, nas dimensões 10x15cm, contendo como substrato: 1- solo; 2- areia; 3- Plantmax[®]; 4- solo e areia (1:1); 5- solo e Plantmax[®] (1:1); e 6- areia e Plantmax[®] (1:1). Foram utilizadas 15 brotações por tratamento, as quais foram mantidas em casa de vegetação e submetidas à irrigação diária. As avaliações foram realizadas após 15, 30 e 45 dias em relação à sobrevivência das plântulas e presença ou ausência de raízes.

Conservação

Brotações mantidas em sala de crescimento com 3,5cm de comprimento foram transferidas para os seguintes meios de cultura: 1- MS/2 + 2% de sacarose + 4% de manitol; 2- MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol; 3- MS/2 + 2% de sacarose + 4% de manitol + 2mgL⁻¹ de pantotenato de cálcio; 4- MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol 2mg L⁻¹ de pantotenato de cálcio; 5- MS/2 + 2% de sacarose + 4% de manitol + 2mg L⁻¹ de espermidina; 6- MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol + 2mg L⁻¹ de espermidina.

As brotações permaneceram por três meses em ambiente de Banco de Germoplasma *in vitro* à temperatura de 18±1°C, fotoperíodo de 12 horas, intensidade luminosa a 25mmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria. Foram utilizadas 30 brotações por tratamento.

As análises foram realizadas em triplicata e o delineamento adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão através do programa SISVAR V.4.3, sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Micropropagação

Sementes de *M. velame* submetidas ao tratamento com solução de cercobim 1%+10mg L⁻¹ de

cefotaxima, gentamicina e canamicina, por 24 horas, posteriormente imersas em solução de álcool 70% por 30 segundos, transferidas em seguida para solução de hipoclorito de cálcio 0,5% durante 30 minutos e finalmente lavadas em água autoclavada antes de serem inoculadas mostraram eficiência de descontaminação de 85±8%.

Apesar do êxito na desinfestação, a porcentagem de germinação foi baixa, sendo 33±5% para sementes advindas de Araxá, 4±0,8% de Tapira e 2±0,5% de Sacramento e, além disso, a germinação foi lenta e desuniforme. Algumas sementes iniciaram a germinação após 20 dias, mas a maioria emitiu a radícula apenas 40 ou 60 dias após a inoculação. Esse resultado provavelmente está relacionado à diversidade genética do material e ou dormência da semente.

O experimento de micropropagação (Tabela 1) mostrou que os explantes de *M. velame* desenvolveram-se melhor em meio MS/2 sem adição de citocinina com crescimento das brotações de 5,2cm de altura, produzindo 8,6 gemas por haste e menor porcentagem de vitrificação (4%).

Estudos realizados com espécies endêmicas do Cerrado têm revelado que, de modo geral, ausência ou reduzidas concentrações de citocininas são mais adequadas para o desenvolvimento *in vitro* dessas espécies. Além disso, concentrações menores de reguladores de crescimento são preferidas por diminuir as possibilidades de ocorrência de variação somaclonal e também representam menor custo (FLORES et al., 2007).

A posição da gema na haste interferiu no desenvolvimento do explante. O melhor resultado foi obtido com a gema apical que promoveu maior altura das brotações (2,85cm) e maior número de gemas por haste (6,15), o que possibilitou a obtenção de um maior índice de multiplicação *in vitro* da espécie. Trabalhos realizados com outras espécies, a exemplo de *Maytenus ilicifolia* e *Mandevilla velutina*, também mostraram a importância de se investigar a posição da gema para a obtenção de maior número de brotos por explante (PEREIRA et al., 1995; BIONDO et al., 2007).

Com relação ao enraizamento, brotações que permaneceram por 5 e 10 dias em contato com o meio de cultura suplementado com ANA ou IBA não enraizaram. Foram necessários 30 dias de exposição às auxinas para obtenção de raízes. O IBA (10mg L⁻¹) foi o melhor tratamento, por ter estimulado o enraizamento em 17% das plântulas, as quais apresentaram 1,5 raízes por broto. De modo geral, a presença de auxina no meio de cultura promoveu também a proliferação de calos. Segundo ANDRADE et al. (2000), a presença de calos na base do explante na fase de enraizamento não

Tabela 1 - Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas em segmento nodal de *M. velame*.

Tratamentos	Nº Brotos	Nº Gemas por haste	Altura (cm)	% Necrose	% Calos	% Vitrificação
MS/2	4,0a	8,6a	5,2a	7b	4 ^a	4c
MS/2 + 0,25mg L ⁻¹ BAP	4,4a	6,3b	3,3b	10b	10a	20b
MS/2 + 0,50mg L ⁻¹ BAP	3,8a	6,2b	2,9b	27a	27 ^a	20b
MS/2 + 1,00mg L ⁻¹ BAP	3,0b	3,5c	1,9c	44a	10 ^a	40a
CV(%)	9,54	15,91	13,30	14,27	10,94	11,53
MS/2 + 0,25mg L ⁻¹ Cinetina	2,9a	5,3a	4,5a	4a	14 ^a	4c
MS/2 + 0,50mg L ⁻¹ Cinetina	2,8a	4,6b	2,7b	14a	24 ^a	47a
MS/2 + 1,00mg L ⁻¹ Cinetina	3,1a	4,9b	2,6b	30a	4 ^a	27b
CV(%)	17,69	23,57	13,20	23,08	16,19	11,41
MS/2 + 0,25mg L ⁻¹ 2ip	3,4a	5,9a	3,5a	24a	40 ^a	7a
MS/2 + 0,50mg L ⁻¹ 2ip	4,1a	7,1a	3,0a	7a	37 ^a	17a
MS/2 + 1,00mg L ⁻¹ 2ip	3,6a	6,1a	3,1a	10a	30 ^a	14a
CV(%)	16,22	20,89	9,59	14,75	16,61	10,14
MS/2 + 0,25mg L ⁻¹ TDZ	3,0a	5,0a	3,0a	7b	27 ^a	30a
MS/2 + 0,50 mg L ⁻¹ TDZ	2,5b	3,8b	2,5a	10a	30 ^a	30a
MS/2 + 1,00 mg L ⁻¹ TDZ	2,1b	3,5b	2,8a	27a	17 ^a	7b
CV(%)	16,54	22,80	15,80	11,43	13,83	13,09

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si na coluna pelo teste de Scott-Knott (5%).

é desejável, pois pode dificultar o processo de aclimatização e comprometer também o crescimento da parte aérea.

A relação concentração de auxina e tempo de exposição do explante pode ser determinante para o enraizamento *in vitro* (NEGASH et al., 2000). Assim, altas concentrações de auxina durante reduzido período e a transferência das plântulas para um meio livre de regulador de crescimento têm sido apontados como procedimentos adequados para o enraizamento de várias espécies cultivadas *in vitro* (TANTOS et al., 2001).

A aclimatização e enraizamento *ex vitro* apresentou maior índice de enraizamento no substrato Plantmax® (40%), com 3,5 raízes por planta e média de 7,5cm de comprimento.

O Plantmax® é um substrato que apresenta boa capacidade de reter água, aeração eficiente, contém significativo teor de matéria orgânica e também possui elevada porosidade (KLEIN et al., 2000). É a somatória dessas características que provavelmente facilitou a produção e maior crescimento das raízes de *M. velame*.

A possibilidade de enraizamento *ex vitro* de *M. velame* é um fator importante a ser considerado no protocolo de micropropagação, pois reduz o tempo e o custo de produção, não sendo necessário à indução do enraizamento *in vitro*, o que torna ainda mais viável economicamente essa tecnologia para a espécie em estudo.

Conservação

Os tratamentos utilizados para obtenção de protocolo de conservação de germoplasma *in vitro* de *M. velame* responderam de maneira muito semelhante em relação à porcentagem de sobrevivência e número de brotos, entretanto o manitol foi melhor que o sorbitol para reduzir o número de gemas por haste. Embora não tenha sido registrada diferença significativa, o meio de cultura MS/2 + 2% de sacarose + 4% de manitol + 2mg L⁻¹ de pantotenato de cálcio foi considerado adequado para manter plântulas de *M. velame* em Banco de Germoplasma *in vitro* (Tabela 2). Os agentes osmóticos como o manitol e o sorbitol têm sido utilizados com a finalidade de alterar a disponibilidade de trocas gasosas, proteger as membranas celulares das baixas temperaturas e reduzir a hiperacididade, evitando a vitrificação (ENGELMAN, 1991).

A manutenção de plântulas de *M. velame* em banco de germoplasma *in vitro* é um passo importante no processo de conservação da espécie. Ao mesmo tempo, viabiliza a produção em larga escala de plantas com excelente condição fitossanitária, para atender a demanda da indústria de medicamentos fitoterápicos no Brasil.

CONCLUSÃO

É possível micropropagar *M. velame* em meio MS/2 basal sem o uso de reguladores vegetais e conservar plântulas da espécie em banco de

Tabela 2 - Efeito de poliamina e agentes osmóticos na sobrevivência de explantes de *M. velame* mantidos em banco de germoplasma.

Meio de cultura	% sobrevivência	Nº Brotos	Nº Gemas	Comprimento da brotação (cm)
MS/2 + 2% de sacarose + 4% de manitol	30a	2,2a	4,5b	2,4a
MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol	40a	3,1a	6,6a	3,7a
MS/2 + 2% de sacarose + 4% de manitol + 2mg L ⁻¹ de pantotenato de cálcio	40a	2,6a	4,0b	2,2a
MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol 2mg L ⁻¹ de pantotenato de cálcio	17a	1,7a	4,0b	2,1a
MS/2 + 2% de sacarose + 4 % de manitol + 2mg L ⁻¹ de espermidina	30a	1,9a	4,7b	3,2a
MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol + 2mg L ⁻¹ de espermidina	44a	2,9a	6,9a	3,6a
CV(%)	25,74	28,21	24,53	29,80

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si na coluna pelo teste de Scott-Knott (5%).

germoplasma *in vitro*. A presença de auxina no meio de cultura é fundamental para o enraizamento *in vitro* de *M. velame* e novos estudos deverão ser realizados para otimizar o enraizamento *in vitro* da espécie. O enraizamento de *M. velame* pode ser realizado *ex vitro* concomitantemente ao processo de aclimatização.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.M.S.; CAMARGO, A.J.A. **Cerrado: ecologia e caracterização**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 249p.
- AUGUSTIN, L. et al. Micropropagação vegetal e sua importância econômica. In: BRAMMER, S.P.; IORCZESKI, E. (Eds.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p.135-153.
- ALMEIDA, S.P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.
- ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myrcodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-180, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542009000100008>. Acesso em: 16 nov. 2010. doi: 10.1590/S1413-70542009000100008.
- BIONDO, R. et al. Micropropagation, seed propagation and germoplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.). **Scientia Agricola**, v.64, n.3, p.263-268, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v64n3/08.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2010. doi: 10.1590/S0103-90162007000300008.
- ENGELMAN, F. *In vitro* conservation of tropical plant Germoplasma: a review. **Euphytica**, v.57, p.227-243, 1991.
- FACHIM, E.; GUARIM, V.L.M.S. Conservação da biodiversidade: espécies da flora de Mato Grosso. **Acta Botânica Brasileira**, v.9, n.2, p.281-287, 1995.
- FLORES, R. et al. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.9, n.1, p.1-7, 2007.
- KLEIN, V.A. et al. Propriedades físico-hídricas de substratos hortícolas comerciais. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6 n.3, p.218-221, 2000.
- MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.1, p.40-44, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v14s0/a16v14s0.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2010. doi: 10.1590/S0102-695X2004000300016.
- MEYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- NEGASH, A. et al. In vitro regeneration and micropropagation of enset from Southeastern Ethiopia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.62, p.153-158, 2000. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/w582625437487888/fulltext.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2010. doi: 10.1023/A:1026701419739.
- PEREIRA, A.M.S. et al. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.295-297, 1995. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/w1361250r5004222/fulltext.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2010. doi: 10.1007/BF00030003.
- SIQUEIRA, J.C. Plantas do cerrado na medicina popular. **Jornal Brasileiro de Ciência**, v.2, n.8, p.41-44, 1982.
- TANTOS, A. et al. Triacantanol-siported micropropagation of woody plants. **Plant Cell reports**, v.20, p.16-21, 2001. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/3dyd43106pf9em8m/fulltext.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2010. doi: 10.1007/s002990000282.