

Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado

Applications of tissue culture techniques in Brazilian Cerrado fruit trees

Hernane Fernandes Pinhal^I Maristela Rosália Anastácio^I Pedro Augusto Porto Carneiro^I
Valdiney José da Silva^I Tâmara Prado de Moraes^I José Magno Queiroz Luz^{II}

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Atualmente, percebe-se uma preocupação em relação às plantas do cerrado, com grande enfoque nas fruteiras em função de suas características e usos. Apesar de ser uma área ainda pouco explorada, é crescente o número de estudos dessas espécies nativas, dentre eles, os que abrangem as técnicas de cultura de tecidos. Isso se deve uma vez que essa ferramenta biotecnológica permite a propagação de espécies com dificuldade de germinação, minimiza o problema de sementes recalcitrantes, promove a produção de mudas em larga escala, complementa bancos de germoplasma e facilita as trocas de materiais genéticos. Dessa maneira, esta revisão visa a sumarizar o histórico e panorama atual das aplicações da cultura de tecidos em fruteiras do cerrado, proporcionando sustentação para novos estudos.

Palavras-chave: fruteiras nativas, biotecnologia, cultivo in vitro.

ABSTRACT

Currently, it's been given a huge concern to the cerrado plants, focusing on fruit trees due to their characteristics and uses. Despite being a fairly unexplored area, the number of studies on these native species has increased, especially those involving tissue culture techniques. That's because this biotechnological tool provides the propagation of species with germination difficulty, reduces problems of recalcitrant seeds, promotes large scale seedling production, complements germplasm banks and facilitates the exchange of genetic materials. Therefore, this review summarizes the history and current situation of tissue culture techniques applied to Brazilian Cerrado fruit trees, providing support to further studies.

Key words: native fruit trees, biotechnology, in vitro cultivation.

INTRODUÇÃO

O bioma cerrado apresenta grande variedade de fruteiras nativas, sendo que algumas já são comercializadas, exercendo importante papel no hábito de consumo da população brasileira (SOUZA, 2000). No entanto, as espécies nativas são de difícil propagação seminífera, por apresentarem heterogeneidade no processo de maturação dos frutos e sementes com algum tipo de dormência, o que compromete a germinação e a formação de mudas em escala comercial. Soma-se a isso o fato de que muitas destas sementes são recalcitrantes, comprometendo sua longevidade e viabilidade, constituindo um limitador para a comercialização. Outro fator importante relaciona-se às altas taxas de destruição do cerrado, que, juntamente com o extrativismo predatório, originam progressivamente menores produções e perda de materiais genéticos de características desejáveis, colocando em risco real a sobrevivência de algumas espécies (LUIS, 2008).

Sendo assim, a aplicação de técnicas de cultura de tecidos em fruteiras do cerrado pode resolver ou minimizar estes entraves através da multiplicação sistematizada de plantas; intercâmbio de material genético; resgate de germoplasma e preservação de material ameaçado; redução no período de germinação;

^IPrograma de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

^{II}Instituto de Ciências Agrárias, UFU, Av. Amazonas, s/n, 38400-902, Uberlândia, MG, Brasil. E-mail: jmagno@umuarara.ufu.br.
Autor para correspondência.

isenção de pragas e doenças e; uniformização nas plântulas obtidas (MELO, 2000).

O cultivo *in vitro* é um procedimento relevante na propagação de diferentes espécies (LEDO et al., 2007), porém, o nível de conhecimento sobre essa técnica em fruteiras nativas do cerrado é incipiente, pois essas plantas encontram-se, ainda, em estado selvagem, apresentando grande variabilidade genética (ALMEIDA, 2009).

Algumas técnicas de cultura de tecidos vegetais vêm sendo empregadas em espécies de fruteiras do cerrado, algumas com relativo sucesso enquanto outras ainda necessitam de mais estudos. Dessa forma, esta revisão bibliográfica tem como enfoque apresentar os resultados até agora obtidos com cultura de tecidos em frutíferas do cerrado.

Micropropagação

Dentre as aplicações da cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a técnica de maior impacto e de resultados mais concretos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007).

Essa técnica exige condições de manuseio assépticas (SHARP et al., 1979), que muitas vezes são alcançadas com o uso de substâncias germicidas encontradas na planta doadora de explantes ou nos próprios explantes. Ainda, a escolha de uma planta-matriz de boa qualidade sanitária pode reduzir a contaminação.

Apesar de existirem diversas substâncias de ação germicida, percebe-se que a maior dificuldade nessa etapa reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Embora trabalhos venham sendo realizados com grande intensidade nessa área, propiciando base para estudos de várias espécies cultivadas, pouca atenção ainda é vinculada para as fruteiras nativas do cerrado, sendo de grande valia as informações até o momento levantadas.

Em explantes de cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile* St. Hill) inoculados em meio de cultura MS, LONDE et al. (2007) encontraram o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. Além disso, verificaram que as dosagens de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 11,0; 13,0 e 14,0g L⁻¹ de benomyl (50% de princípio ativo) foram pouco eficientes no controle desses microrganismos, sendo as concentrações acima de 12,0g L⁻¹ do fungicida passíveis de causar fitotoxicidade.

Alguns autores têm utilizado como explantes segmentos nodais provenientes de plantas obtidas por meio de germinação de sementes *in vitro*, assim como apresentado por SANTOS et al. (2006). Esses autores obtiveram êxito na cultura de tecidos de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) mesmo sem nenhum protocolo de assepsia dos segmentos nodais, os quais foram obtidos das plântulas previamente estabelecidas *in vitro* e diretamente inoculados em meio WPM. Resultado semelhante foi encontrado por DIAS et al. (2009), cujos explantes de interesse foram brotos pré-estabelecidos *in vitro* de abacaxizeiro do cerrado (*Ananas ananassoides* (Baker) L.B.Smith. Sinônimo: *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens e Leal.). Tais explantes foram transferidos para o meio de multiplicação (MS) suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 5g L⁻¹ de ágar, 0,1mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA₃), sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, não havendo problemas de contaminação. Esses trabalhos evidenciam, portanto, que materiais previamente cultivados *in vitro* podem ser utilizados como doadores de explantes, dispensando tratamentos de desinfestação, desde que cuidadosamente manuseados sob condições assépticas.

Visando a estabelecer um protocolo de assepsia para o araçazeiro (*Psidium araçá* Raddi), SOUZA et al. (2006) pulverizaram as mudas que seriam utilizadas como doadoras de explantes em intervalos de sete dias por duas semanas consecutivas com o antibiótico Agrimicina (Estreptomicina) e o fungicida Cercobin, nas doses de 2,4 e 0,7g L⁻¹, respectivamente. Posteriormente, desinfestaram os explantes excisados em câmara de fluxo laminar com álcool 70% por 10 segundos e solução de hipoclorito de sódio (concentração de 2,5% de cloro ativo) com duas gotas de Tween 20[®] por 10 minutos, sendo, em seguida, lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. Esses autores verificaram que o tipo de ramo do araçá, cultivar 'Irapuã', interferia no protocolo de assepsia, concluindo que o ramo herbáceo apresentava menores taxas de contaminações fúngica e bacteriana quando comparado ao ramo semilenhoso.

Um dos fatores que pode ter maior influência na propagação *in vitro* é o uso de fitoreguladores. Na micropropagação, sua influência já foi constatada em vários trabalhos, sendo essas substâncias, em muitos casos, indispensáveis ao bom desenvolvimento da cultura *in vitro*, tanto no estabelecimento, quanto em fases posteriores. Assim, o crescimento e a organogênese *in vitro* são altamente dependentes da interação entre as substâncias de crescimento que

ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), os quais são adicionados ao meio de cultura (GEORGE, 1996).

Na micropropagação de fruteiras nativas do cerrado, os reguladores de crescimento podem ganhar uma importância ainda maior, visto que essas espécies muitas vezes necessitam de estímulos especiais, gerados por tais compostos, para a sua adaptação e crescimento *in vitro*. Nesse sentido, segmentos nodais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) cultivados em meio WPM sem a presença de reguladores de crescimento não foram capazes de formar brotos, enquanto os explantes que foram colocados em meio contendo 0,75mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,05mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) produziram brotações. Nesse caso, BAP foi indispensável para o surgimento dos brotos, enquanto ANA potencializou o processo (SANTOS et al., 2006).

No entanto, a resposta a esses reguladores de crescimento varia de acordo com a espécie cultivada, bem como com as classes, tipos e doses de fitorreguladores utilizadas. Isso pôde ser observado no trabalho realizado por BASTOS et al. (2007), em que explantes de mangabeira (*Hancornia speciosa*) responderam de maneira diferente do pequiheiro aos estímulos conjuntos de citocininas e auxinas. Segmentos nodais cultivados em meio MS sem a suplementação de BAP conseguiram formar brotos, embora a combinação desse regulador com uma auxina (ácido indolacético (AIA)) proporcionasse maior comprimento médio e número de brotações.

Para NOGUEIRA (2003), concentrações de BAP acima de 4,0mg L⁻¹ não foram eficientes na indução de brotos axilares em segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Já concentrações de 1,0 ou 2,0mg L⁻¹ dessa citocinina promoveram a multibrotação de segmentos nodais de mangabeira, embora tenham induzido também à formação de calos na base dos explantes (SOARES et al., 2007). Resultado divergente foi obtido por STEIN et al. (2007a), que constataram que o BAP reduziu o número de brotações e o número de folhas de explantes de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.).

O equilíbrio entre auxinas e citocininas é essencial para que se alcancem os melhores resultados na micropropagação. A importância desse fator já foi demonstrada em diversas plantas cultivadas *in vitro*, sendo que para as fruteiras do cerrado parece ter a mesma relevância. Segmentos caulinares de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) cultivados em meio MS tiveram redução no

desenvolvimento com o uso de doses crescentes de BAP na ausência de ANA ou combinadas com 0,5mg L⁻¹ dessa auxina. No entanto, quando a dose de ANA utilizada foi de 0,1mg L⁻¹, notou-se uma tendência no aumento do número de brotações, até a concentração de 0,6mg L⁻¹ BAP (STEIN et al., 2007a).

O uso de diferentes tipos de fitorreguladores, mesmo que estes sejam da mesma classe hormonal, também pode influenciar na resposta da planta. DIAS et al. (2008), testando diferentes auxinas (ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA)) na multiplicação *in vitro* de abacaxizeiro do cerrado (*A. comosus* var. *ananassoides*), observaram que o AIB provocou uma produção excessiva de brotos, bem como o surgimento expressivo de calos, o que inviabilizou seu uso nesta etapa da micropropagação. Por outro lado, ANA e AIA tiveram a mesma influência no crescimento dos explantes, sem, no entanto, diferir do tratamento sem o uso de auxinas.

Embora auxinas e citocininas sejam os reguladores de crescimento mais usados na micropropagação de fruteiras do cerrado, outros compostos podem ter participação importante em diversas etapas do processo. Doses de ácido giberélico (GA₃) foram utilizadas conjuntamente com doses de BAP para o estiolamento de brotos de abacaxizeiro do cerrado (*A. comosus* var. *ananassoides*) pré-estabelecidos *in vitro*, sendo que a interação entre as doses de 1,0mg L⁻¹ de BAP e 0,5mg L⁻¹ de GA₃ proporcionou maior número de brotações, superando os tratamentos em que não foi utilizado o ácido giberélico. Além disso, GA₃, ao contrário de BAP, favoreceu o crescimento da parte aérea, sem, no entanto, influenciar no enraizamento dos explantes (DIAS et al., 2009).

Além do uso de fitorreguladores, outros fatores podem afetar a micropropagação de fruteiras do cerrado. SOUZA et al. (2006) observaram que, quando explantes de araçazeiro cv. 'Irapuã' eram retirados de plantas colocadas no escuro durante 15 dias antes do cultivo *in vitro*, havia redução no número de plantas estabelecidas em comparação aos explantes retirados de matrizes que foram mantidas sob luz, apesar de, inicialmente, ter havido maior sobrevivência de explantes provenientes de plantas colocadas no escuro. Este trabalho evidencia que a presença, e/ou ausência de luz, está entre os fatores que interferem na diminuição da oxidação de explantes, facilitando o estabelecimento e micropropagação de plantas nativas do cerrado. No entanto, esses estudos sobre os fatores que interferem na oxidação de explantes ainda são escassos.

Embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser definida como um processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão de gametas. É uma técnica importante para propagação em larga escala de plantas-elite *in vitro*, sendo que uma das suas principais aplicações em programas de melhoramento de plantas perenes relaciona-se com a possibilidade da fixação do ganho genético (GUERRA et al., 1998). Além disso, a técnica é considerada um sistema modelo para estudos de eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos em plantas superiores, apresentando aplicações biotecnológicas potenciais, tais como produção de sementes sintéticas, micropropagação e transformação genética (CASTRO et al., 2010).

Diversos fatores afetam a embriogênese somática, como o tipo de explante, condições de incubação e presença de uma auxina no meio de cultura (especialmente 2,4-D, ácido 2,4 diclorofenoxiacético). Conforme GUERRA et al. (1998), quase todas as partes das plantas podem ser usadas como fonte de explante e o uso de meios de alta concentração salina, como o meio MS, apresentam efeitos positivos no crescimento de embriões somáticos.

São poucos os trabalhos envolvendo a embriogênese somática em fruteiras do cerrado e os resultados obtidos ainda não permitem o estabelecimento de protocolos eficientes. BASTOS et al. (2007), ao cultivarem *in vitro* cotilédones de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa*), não obtiveram respostas para a regeneração de microplantas. Resultado semelhante foi obtido por LUIS (2008) trabalhando com folhas cotiledonares e raízes de plântulas de murici (*Byrsonima basiloba*). Esse autor observou que após 10 semanas de cultivo *in vitro* todos os explantes necrosaram impedindo o desenvolvimento de gemas adventícias e embriões somáticos.

Assim, percebe-se que o uso dessa técnica em fruteiras do cerrado ainda não atingiu resultados satisfatórios. Os estudos são escassos e restritos a poucas espécies. Dessa maneira, há a necessidade de ampliar seu uso para outras espécies de fruteiras do cerrado bem como para as já estudadas, ofertando maior atenção para aquelas que apresentem dificuldades de multiplicação por outros métodos ou que têm limitada variabilidade genética natural.

Germinação *in vitro*

A germinação de fruteiras nativas do cerrado fora de seu ambiente natural tem se mostrado um desafio

devido aos diversos fatores que interferem na conservação e no seu desenvolvimento. Quando se deseja a produção de mudas em larga escala, o processo se torna ainda mais difícil, em função da dormência e recalcitrância das sementes.

Com a finalidade de produzir grandes quantidades de mudas de *Ananas ananassoides* (abacaxi do cerrado) a baixo custo, tornando a atividade viável sob o aspecto econômico, FIGUEREDO et al. (2003) propagaram a espécie *in vitro* utilizando suas sementes como explantes.

Aspectos da germinação *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis*) foram estudados por STEIN et al. (2007b), objetivando superar a recalcitrância de suas sementes e viabilizar a formação de mudas da fruteira. Para tanto, foram avaliados meios de cultura com diferentes concentrações de sais (WPM, WPM/2, MS e MS/2) e diferentes concentrações de GA₃ (0; 1,73; 3,46; 5,88; e 6,92mg L⁻¹). Esses autores verificaram que o meio de cultura WPM/2 é o mais indicado para a germinação *in vitro* do ingazeiro sendo desnecessária a adição da giberelina.

Trabalho semelhante foi desenvolvido por RIBEIRO et al. (2009) que utilizaram a germinação *in vitro* como método para fornecer elementos que superassem a dormência em sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). Melhores resultados foram obtidos em meio WPM suplementado com 25-32mg L⁻¹ de GA₃.

Sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), cujos tegumentos foram retirados antes da inoculação *in vitro* em meio MS, apresentaram maior uniformidade e velocidade de germinação, além de menor percentual de plântulas anormais em relação às sementes que foram mantidas intactas (MARTINOTTO et al., 2007).

Além disso, fatores referentes à escolha das sementes devem ser considerados, pois o genótipo pode ter grande influência na responsividade do explante. Como exemplo, cita-se a mangabeira (*Hancornia speciosa*), na qual o número de subcultivos, determinado pelo maior potencial para produção *in vitro* de explantes a partir de sementes, depende do genótipo avaliado (MACHADO et al., 2004).

Após as fases de seleção e preparo da semente, a escolha do melhor meio de cultivo é uma etapa crucial para o bom desenvolvimento das fruteiras *in vitro*, uma vez que a quantidade ideal de nutrientes e o balanço osmótico adequado são elementos que definirão a germinação e as etapas subsequentes do processo. Os meios de cultivo mais encontrados em

trabalhos de germinação *in vitro* de fruteiras são o MS e o WPM (FIGUEIREDO et al., 2003; LEDO et al., 2007; SOUSA et al., 2007).

A concentração dos componentes do meio também é objeto de estudo e afeta o resultado final, além de variar de acordo com a espécie e o meio utilizado. Para o ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis*), o meio WPM, com metade da concentração iônica, proporciona 96% de germinação superando o meio MS nas concentrações de 50 e 100% e o próprio meio WPM na dose total (STEIN et al., 2007b). Por outro lado, para a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), os meios WPM 100% e MS com 50% da força iônica garantiram a máxima germinação (SOARES et al., 2009).

Os compostos benéficos ao crescimento das plantas, como o carvão ativado e os fitorreguladores, também podem ser adicionados ao meio de cultura. O emprego de carvão ativado favoreceu o desenvolvimento e enraizamento de plantas de mangabeira (*H. speciosa*) germinadas em tubos de ensaio (LEDO et al., 2007). Para o ingazeiro (*I. vera*), GA₃ adicionado ao meio de cultivo proporcionou aumento na taxa de germinação (STEIN et al., 2007b). Resultado semelhante foi encontrado com sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.), na qual doses crescentes de GA₃ proporcionaram melhores resultados para todas as características de crescimento analisadas em relação ao tratamento sem a giberelina (RIBEIRO et al., 2009). Em contrapartida, o GA₃ não teve efeito benéfico na germinação de sementes de mangabeira (*H. speciosa*) cultivadas *in vitro* (SOARES et al., 2009).

Além dos elementos que compõem o meio, outros fatores podem interferir na germinação e crescimento das fruteiras de cerrado *in vitro*. MARTINOTTO et al. (2007) observaram que a germinação e o desenvolvimento da cagaiteira (*E. dysenterica*) é mais acelerado na presença de luz.

Cultura de protoplastos

Em 1892, foram obtidos os primeiros protoplastos por meio de isolamento mecânico (KLERCKER, 1892). No entanto, a obtenção de protoplastos viáveis depende de vários parâmetros, como a espécie, o estado fisiológico da planta, o tipo e a idade do explante, além das próprias condições de isolamento do protoplasto (CARNEIRO et al., 1998). Segundo AMMIRATO (1984), o isolamento de protoplastos de células em suspensão apresenta maior eficiência, devido à uniformidade da cultura de células, o que possibilita maior controle do desenvolvimento celular.

O interesse pela cultura de protoplastos tem tido um foco particular na geração de novos híbridos

somáticos e plantas híbridas que não podem ser produzidos via hibridação convencional (DAVEY et al., 2005). No entanto, essa técnica é pouco empregada em fruteiras nativas do cerrado, sendo escassos os relatos na literatura de sua utilização. MARTINOTTO (2007) demonstrou que é possível regenerar plantas *in vitro* a partir da cultura de protoplastos de *Caryocar brasiliense* em função da alta frequência de protoplastos viáveis obtidos de tecido foliar do pequiizeiro.

CONCLUSÃO

São poucos os trabalhos envolvendo as técnicas de cultura de tecidos em fruteiras do cerrado. Dentre eles, predominam estudos de micropropagação, gerando conhecimentos principalmente para multiplicação de espécies antes pouco dominadas e servindo de base e estímulo para novas pesquisas. Ressalta-se, ainda, a necessidade de mais estudos sobre fatores muitas vezes pouco explorados, como luminosidade e tipo de ramos, que influenciam os protocolos de cultivo *in vitro*.

A germinação *in vitro* tem alcançado resultados importantes, permitindo além de outras conquistas, a superação da dormência em reduzido espaço de tempo. Mais atenção deve ser vinculada à embriogênese somática, técnica que proporciona, além de outros fatores, a produção em larga escala de mudas e que, até o momento, apresenta poucos estudos juntamente com a cultura de protoplastos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.F.P. Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e atemóia (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae. 2009. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, DF.
- AMMIRATO, P.V. Induction, maintenance and manipulation of development in embryogenic cell suspension cultures. In: VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando: Academic, 1984. V.1, p.139-151.
- BASTOS, L.P. et al. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/888/731>>. Acesso em: 12 abr. 2011.
- CARNEIRO, V.T.C. et al. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. V.1, p.413-458.
- CASTRO, L.M. et al. Embriogênese somática a partir de calos de cultivares de laranja doce. **Ciência Rural**, v.40, n.8, p.1831-

- 1834, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n8/a669cr3649.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2011. doi:10.1590/S0103-84782010000800026.
- DAVEY, M.R. et al. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v.23, p.131-171, 2005. Disponível em: <<http://infolib.hua.edu.vn/Fulltext/ChuyenDe/ChuyenDe07/CDe50/162.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2011. doi:10.1016/j.biotechadv.2004.09.008.
- DIAS, G.M.G. et al. Micropropagação de abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *ananassoides*) por estiolamento e regeneração de plântulas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.4, p.1-7, 2008. Disponível em: <<http://www.abctp.ufla.br/v4n1.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2011.
- DIAS, M.M. et al. Diferentes concentrações de reguladores de crescimento no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 10., 2009, Montes Claros, MG. **Anais...** Montes Claros: UNIMONTES, Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2009. Disponível em: <<http://www.fepeg.unimontes.br/evento2009/index.php/fepeg/fepeg2009/paper/view/269/584>>. Acesso em: 21 fev. 2011.
- FIGUEIREDO, G.S.F. et al. Germinação de sementes de *Ananas ananassoides* (Baker L. B. Sm.) (Bromeliaceae) *in vitro*. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 8., 2003, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 165p. p.91. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/liv005.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2011.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1996. 1574p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1998. V.1, p.99-169.
- GUERRA, M.P. et al. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1998. V.1, p.533-568.
- KLERCKER, J.A. Eine methode zur isoleirung labender protoplasten. **Swenka Vet' Akademia Forth Stockholm**, v.9, p.463-471, 1892.
- LEDO, A.S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de cultivo *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.5, n.4, p.989-993, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n4/07.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2011. doi: 10.1590/S1413-70542007000400007.
- LONDE, L.N. et al. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, v.23, n.3, p.94-100, 2007. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6361>>. Acesso em: 13 jan. 2011.
- LUIS, Z.G. **Propagação *in vitro* e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae)**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, DF.
- MACHADO, L.L. et al. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.5, p.431-435, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v39n5/a04v39n5.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2011. doi: 10.1590/S0100-204X2004000500004.
- MARTINOTTO, C. **Embriogênese somática e isolamento de protoplastos de pequizeiro**. 2007. 106f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, MG.
- MARTINOTTO, C. et al. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1668-1671, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n6/a10v31n6.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2011. doi: 10.1590/S1413-70542007000600010.
- MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da gabirobeira (*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.)**. 2000. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, MG.
- NOGUEIRA, R.C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, MG.
- RIBEIRO, M.N.O. et al. *In vitro* seed germination and seedling development of *Annona crassiflora*. **Scientia Agricola**, v.66, p.410-413, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sa/v66n3/17.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2011. doi: 10.1590/S0103-90162009000300017.
- SANTOS, B.R. et al. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.293-296, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v28n2/a31v28n2.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2011. doi: 10.1590/S0100-29452006000200031.
- SHARP, W.R. et al. **Plant cell and tissue culture: principles and applications**. Columbus: The Ohio State University, 1979. 892p.
- SOARES, F.P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p.1048-1053, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n4/16.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2011. doi: 10.1590/S1413-70542007000400016.
- SOARES, F.P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1847-1852, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v33nspe/25.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2011. doi: 10.1590/S1413-70542009000700025.
- SOUSA, C.S. et al. Germinação e indução de brotações *in vitro* utilizando diferentes reguladores vegetais em mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**,

v.5, p.276-278, 2007. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/247/237>>. Acesso em: 13 jan. 2011.

SOUZA, F.X. Aspectos morfológicos da unidade de dispersão de cajazeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.215-220, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v35n1/6916.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2011. doi: 10.1590/S0100-204X2000000100024.

SOUZA, J.A. et al. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1920-1922, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/>

v36n6/a41v36n6.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2011. doi: 10.1590/S0103-84782006000600041.

STEIN V.C. et al. Organogênese direta em explantes de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.723-725, 2007a. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/609/515>>. Acesso em: 13 jan. 2011.

STEIN, V.C. et al. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.1702-1708, 2007b. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n6/a15v31n6.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2011. doi: 10.1590/S1413-70542007000600015.