



Propagação in vitro de sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel): uma espécie florestal nativa

In vitro propagation of "sucupira branca" (*Pterodon emarginatus* Vogel): a native forest specie

Propagación in vitro de "sucupira-branca" (*Pterodon emarginatus* Vogel): una especie forestal nativa.

Regiane Aparecida Canatto

Mestre, UFV, Brasil.
regianecanatto@gmail.com

Bruno Éric Siqueira Albino

ASA II Eng. Ambiental, UNESP, Brasil.
brunoalbino@tupa.unesp.br

Antônio Teixeira Cordeiro

Professor Doutor, UFV, Brasil.
atcordei@ufv.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar um protocolo de estabelecimento, multiplicação e enraizamento da espécie *Pterodon emarginatus* Vogel. As sementes foram incubadas em meio Murashige e Skoog (MS). Os tratamentos de desinfestação consistiram de imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) por diferentes tempos (5, 10, 15 e 20 minutos). Para a multiplicação *in vitro*, ápices caulinares e segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura MS contendo diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L⁻¹) de 6-benzilaminopurina (BAP). No enraizamento *in vitro* das brotações foram utilizadas diferentes concentrações de ácido indol-butírico (AIB) ou ácido naftaleno acético (ANA) (0; 1; 2 e 4 mg L⁻¹). A incubação dos tubos foi realizada no claro em sala de crescimento. Nas primeiras duas semanas de cultivo não foram observadas contaminações em nenhum tratamento. Após 21 dias, apenas no tratamento com 5 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO) foi observado 28,5% de contaminação. Observou-se que a desinfestação utilizando NaClO por um período de tempo de 10 minutos proporcionou melhor descontaminação e germinação das sementes. A utilização de 0,5 mg L⁻¹ de BAP foi eficaz para a formação de brotações em ápices caulinares e segmentos nodais, tendo essas comprimento adequado para serem levadas ao processo de enraizamento. No entanto, não ocorreu enraizamento em nenhum dos tratamentos testados. Portanto, foi desenvolvido, no presente trabalho, um protocolo viável para a multiplicação *in vitro* de sucupira-branca. Novos estudos serão realizados visando à obtenção de mudas para projetos de recomposição ambiental de áreas degradadas.

PALAVRAS-CHAVE: Micropropagação. Cultura de tecidos. Plantas lenhosas.

ABSTRACT

The objective of the study was to establish a protocol for the establishment, multiplication and rooting of *Pterodon emarginatus* Vogel. Seed explants were plated on Murashige e Skoog (MS). Disinfection treatments consisted of immersion of seeds in sodium hypochlorite (NaClO) for different periods of times (5, 10, 15 and 20 minutes). For *in vitro* multiplication, apical and nodal segments were inoculated onto MS culture medium containing different concentrations (0; 0.5; 1.0; 2.0 mg L⁻¹) of 6-benzylaminopurine (BAP). *In vitro* rooting of shoots were used different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) or naftalen acetic acid (NAA) (0, 1, 2 and 4 mg L⁻¹). Incubation of the tubes was carried out inside the growth room with artificial lighting. In the first two weeks of growing any type of contamination is observed in the experiment. After 21 days, only the test with 5 minutes of exposure to sodium hypochlorite (NaClO) showed 28.5% of contamination. It was observed that the disinfection using NaClO by a 10 minute time period provides better decontamination and seed germination. The use of 0.5 mg L⁻¹ BAP was effective for shoot formation in apical and nodal segments, those having suitable length to be brought to rooting process. However, no rooting occurred in any of the tested treatments. So, it was developed in the present work, a viable protocol for the *in vitro* multiplication of "sucupira-branca". Further studies will be conducted in order to obtain seedlings for environmental restoration projects of degraded areas.

PALAVRAS-CHAVE: Micropropagation. Tissue culture. Woody plants.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar un protocolo de establecimiento, multiplicación y enraizamiento de la especie *Pterodon emarginatus* Vogel. Las semillas se inocularon en medio de cultivo Murashige e Skoog (MS). Los tratamientos de desinfestación consistieron en la inmersión de las semillas en hipoclorito de sodio (NaClO) durante diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 minutos). Para la multiplicación *in vitro*, segmentos apicales y nodales se inocularon en medio de cultivo MS que contiene diferentes concentraciones (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L⁻¹) de 6-bencilaminopurina (BAP). En el enraizamiento de brotes *in vitro* se utilizaron diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) o ácido naftalenacético (NAA) (0, 1, 2 y 4 mg L⁻¹). La incubación de los tubos se llevó a cabo en el interior de la sala de cultivo con iluminación artificial. En las dos primeras semanas de cultivo no se observó ningún tipo de contaminación en los ensayos. Después de 21 días, se observó que sólo el ensayo con 5 minutos de exposición al hipoclorito de sodio (NaClO) alcanzó el 28,5% de contaminación. Se observó que la desinfestación usando NaClO por un período de tiempo de 10 minutos proporciona una mejor descontaminación y germinación de la semilla. El uso de 0,5 mg L⁻¹ BAP fue eficaz para la formación de brotes en los segmentos apical y nodales, los que tienen una longitud adecuada para ser puestos a disposición del proceso de enraizamiento. Sin embargo, no ocurrió el enraizamiento en ninguno de los ensayos testados. Por lo tanto, se ha desarrollado en el presente trabajo, un protocolo viable para la multiplicación *in vitro* de "sucupira-branca". Se llevarán a cabo estudios adicionales con el fin de obtener plántulas para proyectos de restauración ambiental de zonas degradadas.

PALAVRAS-CHAVE: Micropropagación. Cultivo de tejidos. Plantas leñosas.

1 INTRODUÇÃO

A devastação das florestas tropicais constitui um dos mais graves problemas ecológicos enfrentados hoje pelo Brasil. A drástica redução das florestas tropicais elevou as taxas estimadas de extinção de espécies a cifras significativamente altas. Ainda que os números sejam imprecisos e, considerando-se os processos naturais de extinção, acredita-se que o homem tenha elevado estas taxas para algo em torno de 100 a 1000 vezes (MEDEIROS, 2003). A conservação de recursos genéticos vegetais dos biomas tropicais é um tema de importância mundial. Enquanto muitas espécies estão em risco de extinção nas regiões temperadas, várias espécies desaparecem todos os dias nos trópicos. A proteção de espécies frente à iminente extinção é, portanto uma questão prioritária. A conservação e o manejo da biodiversidade, mesmo em áreas protegidas nos trópicos, constituem-se em desafios complexos que requerem conhecimentos básicos sobre a distribuição e a abundância de espécies, suas interações mutualistas, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (BASSAN et al., 2006).

Apesar de atualmente as espécies florestais exóticas suprirem a demanda por produtos madeireiros, estas não são indicadas para a recuperação de áreas degradadas, onde se busca recompor as características originais do ambiente, para isso diversas árvores nativas são indicadas, pois apresentam infinitas qualidades, bastando para isso, que ocorra aprimoramento do conhecimento da biologia das espécies.

A propagação de espécies florestais normalmente é via sementes, o que muitas vezes resulta em baixo rendimento de mudas, devido às dificuldades que certas espécies apresentam em sua reprodução como; frutificação irregular, dificuldade na coleta de sementes, devido à grande dimensão das árvores, germinação irregular e crescimento lento das plantas (RIBAS et al., 2005). Outro método é através da propagação vegetativa, com destaque para a cultura de tecidos *in vitro* ou clonagem *in vitro*, também denominada micropropagação. Devido ao tamanho dos propágulos utilizados, a micropropagação é a técnica de cultivo *in vitro* de maior impacto dentre as diversas técnicas de cultura de tecidos e tem mostrado enorme importância prática e potencial nas áreas agrícola, florestal e hortícola (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; BORGATTO; HAYASHI, 2002). Esta possibilita a produção de mudas a partir de qualquer tecido da planta doadora, mantendo estáveis as características genotípicas de interesse, aumentando em grande escala a produtividade, ocupando menor espaço, produzindo durante todo ano, mantendo a produção isenta de riscos ambientais, climáticos e dentro dos padrões desejáveis de fitossanidade (SERAFINI et al., 2001; JUNGHANS et al., 2014).

Diversas dificuldades estão sendo encontradas para a micropropagação de espécies lenhosas, dentre estas podemos citar a oxidação fenólica que pode dificultar o estabelecimento *in vitro*, sendo causada pela liberação de compostos fenólicos, ocorrendo devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes (FLORES et al., 1998). Outro entrave encontrado para o uso extensivo da micropropagação é a obtenção de culturas livres de contaminação, principalmente por bactérias, pois nem sempre se pode eliminá-las com o uso de antibióticos

(CHAVES et al., 2005); além disso, a recalcitrância *in vitro* (falta de resposta morfogênica) deve ser observada, e as espécies lenhosas em particular, possuem destaque entre as espécies recalcitrantes (SOUZA; JUNGHANS, 2006; MOYO et al., 2011). Apesar das adversidades encontradas na micropropagação de espécies florestais nativas, as vantagens do emprego desta técnica estimulam o desenvolvimento de protocolos mais eficientes de micropropagação.

A espécie *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira-branca) é uma essência nativa dos cerrados brasileiros, sendo encontrada em Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul (COELHO et al., 2001). Na medicina, o óleo essencial de *P. emarginatus* é fortemente aromático sendo usado no combate ao reumatismo, diabetes e doenças respiratórias (bronquite e amigdalite) (LEONHARDT et al., 2010; HOSCHIED; CARDOSO, 2015). Além dessas várias atividades biológicas, o óleo de sucupira-branca apresenta propriedade larvicida contra o mosquito da dengue (*Aedes aegypti*) (OLIVEIRA et al., 2016).

A sucupira-branca é planta amplamente incorporada à etnobotânica brasileira, sendo geralmente preservada pela agricultura e pecuária familiar, podendo ser encontrada como elemento de sombreamento em pastos e em roças artesanais. MASCARO, TEIXEIRA e GILBERT (2003) destacam que a exploração dos frutos de sucupira branca causa pouca perturbação ao meio ambiente, podendo ser feita de maneira sustentável e permitindo aumento de renda das famílias envolvidas.

As sementes de *P. emarginatus* possuem dormência causada pela impermeabilidade dos tegumentos ao oxigênio e à água, possivelmente pela existência de inibidores químicos da germinação (REIS, 1976). Na literatura são poucos os relatos envolvendo a cultura de tecidos de *P. emarginatus*. A principal referência se restringe ao trabalho realizado por COELHO et al. (2001) onde foram estudadas as melhores condições para germinação *ex vitro* e *in vitro* de sementes.

Este trabalho teve como o objetivo desenvolver um protocolo de estabelecimento, multiplicação e enraizamento para a espécie sucupira-branca (*P. emarginatus* Vogel), visando à obtenção de mudas para projetos de recomposição ambiental de áreas degradadas.

2 METODOLOGIA/MÉTODO DE ANÁLISE

2.1 DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SUCUPIRA-BRANCA (*PTERODON EMARGINATUS* VOGEL)

O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) meia força, contendo vitaminas, 1,5 % (p/v) de sacarose e 0,01% (p/v) de mio-inositol. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,8, e acrescido 0,5% (p/v) de ágar, sendo o meio autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min.

Após a quebra dos frutos utilizando uma morsa mecânica, as sementes de *P. emarginatus* foram lavadas com detergente neutro e desinfestadas em álcool etílico 70% (v/v) por 30 segundos e em seguida em NaClO 5% (v/v) por 20 minutos. Após esse procedimento, com o auxílio de uma pinça, o tegumento das sementes foi removido. As sementes foram levadas até a câmara de fluxo, e submetidas à desinfestação em álcool etílico 70% (v/v) durante um minuto

e em seguida em NaClO 2% de cloro ativo com 3 gotas de Tween® 20 por 5, 10, 15 e 20 minutos, mantendo agitação constante. Posteriormente as sementes foram lavadas três vezes em água deionizada e autoclavada. A inoculação foi realizada em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultivo líquido com ponte de papel. A incubação ocorreu no ambiente iluminado da sala de crescimento, com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares de 20W (Luz do dia especial, Osram, Brasil). As observações quanto à contaminação e germinação foram feitas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação.

2.2 ORGANOGÊNESE IN VITRO EM ÁPICES CAULINARES E SEGMENTOS NODAIS DE *P. EMARGINATUS*.

Os explantes foram obtidos a partir de vitroplantas geradas da germinação asséptica de sementes, assim como descrito anteriormente. Os ápices caulinares e segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio, contendo aproximadamente 10 mL de meio MS, complexo vitamínico, 2% (p/v) de sacarose, 0,01% (p/v) de mio-inositol e diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L^{-1}). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e acrescido 0,5% (p/v) de ágar, antes da autoclavagem a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min. A incubação dos frascos foi realizada no claro, em sala de crescimento, sob temperatura de 27 ± 2 °C com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes tubulares de 20W (Luz do dia especial, Osram, Brasil). As observações quanto o número de brotos formados e tamanho destes foram feitas aos 30 dias após a inoculação.

2.3 ENRAIZAMENTO IN VITRO DE BROTAÇÕES DE *P. EMARGINATUS* COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB) E ÁCIDO NAFTALENO ACÉTICO (ANA)

Os explantes foram obtidos a partir multibrotações geradas em meio de cultivo com 0,5 mg L^{-1} de BAP, assim como descrito no experimento de multiplicação in vitro. As brotações foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo aproximadamente 10 mL de meio MS, complexo vitamínico, 2% (p/v) de sacarose, 0,01% (p/v) de mio-inositol e 0,25% de carvão ativado.

O experimento foi composto por um fatorial 2x4, formado pela combinação de duas auxinas (AIB ou ANA) em diferentes concentrações (0; 1; 2 e 4 mg L^{-1}). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e acrescido 0,5% (p/v) de ágar, antes da autoclavagem a 120 °C, 1,1 Pa por 20 min. A incubação dos tubos foi realizada no claro, em sala de crescimento, sob temperatura de 27 ± 2 °C com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes tubulares de 20W (Luz do dia especial, Osram, Brasil). As observações quanto ao número de raízes formadas foram feitas aos 30 dias após a inoculação.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado totalizando 10 repetições por tratamento, composta por um tubo de ensaio contendo um explante. Os dados foram

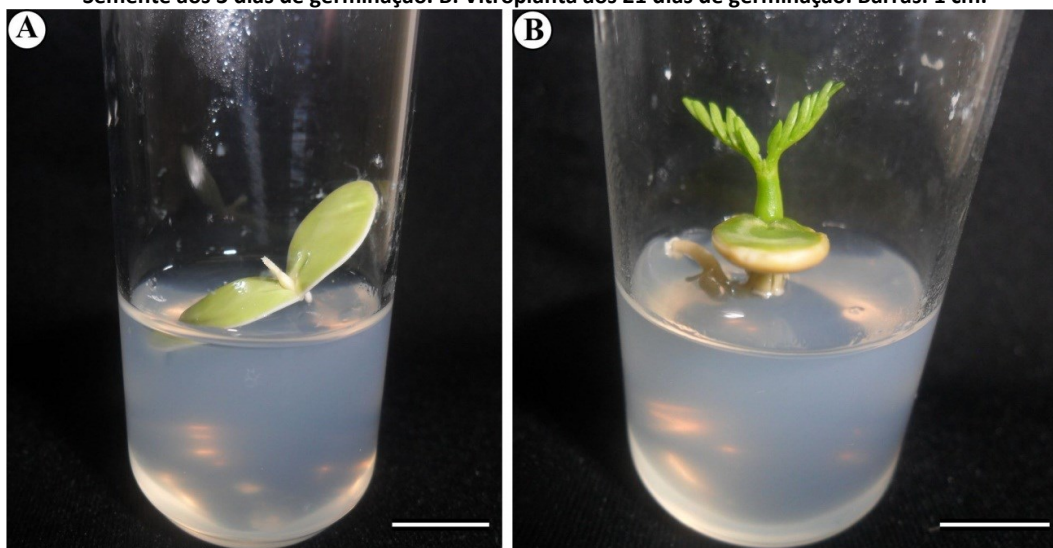
tabulados e expressos em forma de média com seu respectivo erro padrão. O experimento foi repetido três vezes.

3 RESULTADOS

3.1 DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SUCUPIRA-BRANCA (*PTERODON EMARGINATUS* VOGEL).

Aos três dias de incubação já foram observadas sementes de *P. emarginatus* iniciando o processo de germinação. Decorridos 21 dias as sementes já haviam germinado e formado vitroplantas com parte aérea bem desenvolvida e início do desenvolvimento do sistema radicular (Fig. 1).

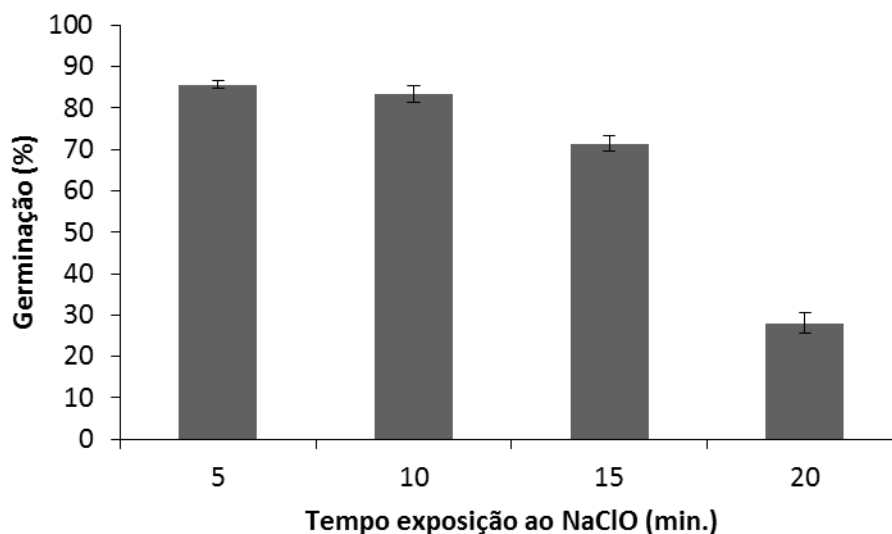
Figura 1: Germinação de sementes de *P. emarginatus* submetidas à desinfestação com NaClO por 10 minutos. A: Semente aos 3 dias de germinação. B: Vitroplanta aos 21 dias de germinação. Barras: 1 cm.



Fonte: Cannato, 2013.

A porcentagem de germinação das sementes de *P. emarginatus* sofreu decréscimo com o aumento do tempo de exposição ao NaClO (Fig. 2). Sugere-se que o tempo de exposição das sementes ao cloro promoveu danos a estas, afetando sua germinação. A maior média de germinação (85%), foi obtida nos tratamentos que utilizaram o tempo de exposição de 5 e 10 minutos (Fig. 2).

Fig. 2: Porcentagem de germinação e contaminação de sementes de *P. emarginatus*, 21 dias após inoculação, em diferentes tempos de exposição ao NaClO. Barras representam o desvio padrão (n=10).



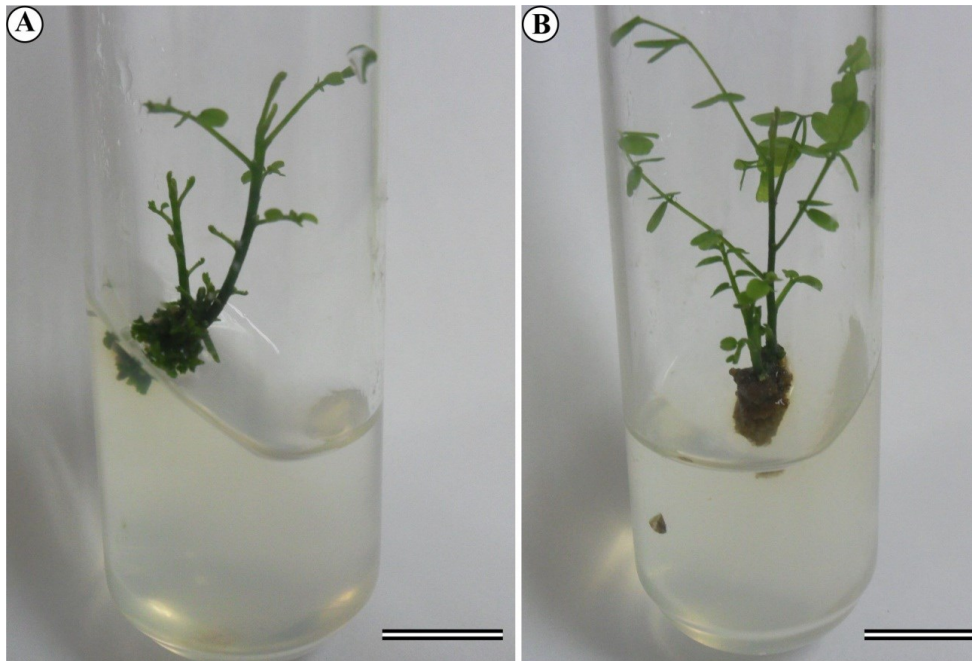
Segundo WEDLING et al. (2006) várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio. No entanto, RUBIM et al. (2010) alerta que o hipoclorito de sódio pode danificar estruturas essenciais da semente, como o embrião, levando a diminuição das taxas de germinação.

Nas primeiras duas semanas de cultivo não foram observadas contaminações em nenhum tratamento. Após 21 dias, apenas no tratamento com 5 minutos de exposição ao NaClO foi observado 28,5% de contaminação.

3.2 ORGANOGÊNESE *IN VITRO* EM ÁPICES CAULINARES E SEGMENTOS NODAIS DE *P. EMARGINATUS*.

Ao final de 90 dias de incubação, em todos os tratamentos, com exceção do controle, ocorreu a formação de calos na base dos explantes e de brotações nos ápices caulinares e segmentos nodais (Fig. 3).

Figura 3: Organogênese em *P. emarginatus*. A: Brotações oriundas de ápices caulinares em meio com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. B: Brotações oriundas de segmentos nodais em meio com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Barras = 1 cm.



Diferenças significativas foram verificadas entre o número de ápices e de segmentos nodais com formação de brotações em função das diferentes concentrações de BAP. Na ausência do regulador de crescimento as taxas de multiplicação obtidas para ápices e segmentos nodais foram de 1 e de 0,4; respectivamente (Fig. 4 e 5). No entanto, médias de 1,83 brotações por ápice caulinar e de 1,85 brotações por segmento nodal, foram obtidas nos tratamentos que continham concentração de BAP igual ou superior a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Fig. 3, 4 e 5).

Observou-se a formação de tufos com agrupamentos de pequenas brotações quando se utilizou 2 mg L^{-1} de BAP. Resultados semelhantes foram observados por COELHO (1999), em estudos de multiplicação in vitro de sucupira-branca a partir de segmentos nodais. A autora observou formação de tufos de brotações quando utilizou concentrações mais elevadas de BAP para a multiplicação in vitro da espécie.

Figura 4: Número de brotos de *P. emarginatus* gerados a partir de ápices caulinares em diferentes concentrações de BAP. Barras representam o desvio padrão (n=10).

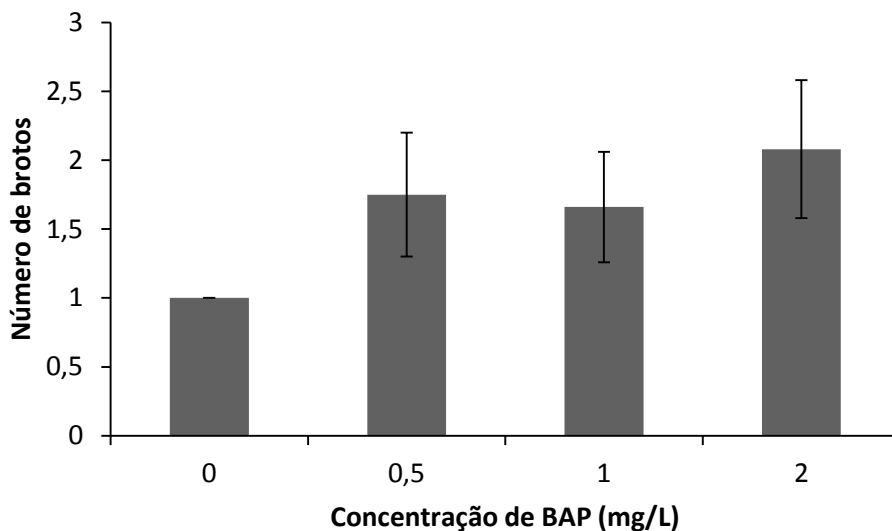
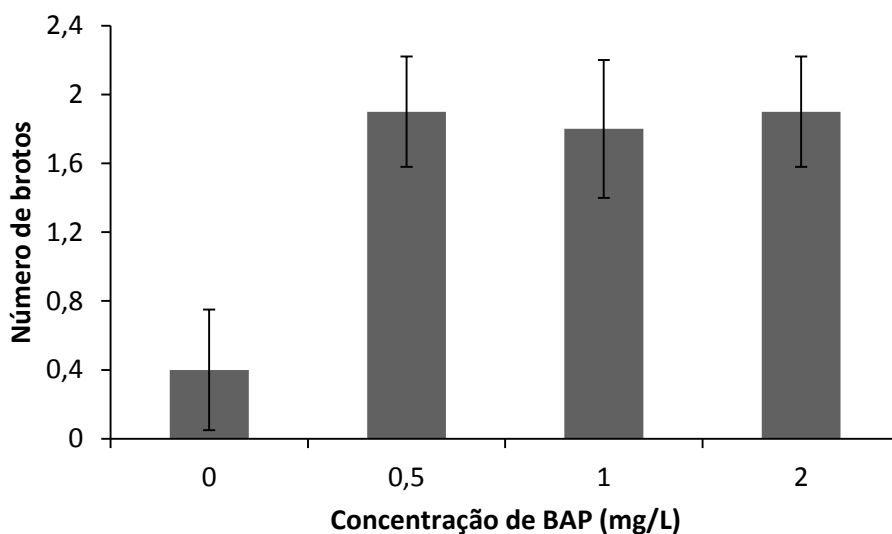


Figura 5: Número de brotos de *P. emarginatus* gerados a partir de segmentos nodais em diferentes concentrações de BAP. Barras representam o desvio padrão (n=10).



O aumento da concentração de BAP adicionada ao meio de cultivo promoveu a diminuição do comprimento das brotações originadas tanto de ápices quanto de segmentos nodais (Fig. 6 e 7). Na organogênese a partir de ápices caulinares, a utilização de 0; 0,5 e 1 mg L⁻¹ de BAP permitiu obter brotações com comprimento maior e estatisticamente iguais entre si, no entanto, partindo de segmentos nodais as maiores médias foram obtidas com 0,5 e 1 mg L⁻¹ de BAP (Fig. 6 e 7).

Resultados semelhantes foram observados por VILLA et al. (2005), na multiplicação de amoreira-preta 'Ébano', onde com o aumento da concentração do BAP também observaram



diminuição no comprimento das brotações. Vários autores já afirmaram que esse regulador de crescimento não é responsável pelo alongamento de brotos (EARLE e LANGHANS, 1974; PAIVA et al., 1997; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Figura 6: Comprimento das brotações de *P. emarginatus* geradas a partir de ápices caulinares em diferentes concentrações de BAP. Barras representam o desvio padrão (n=10).

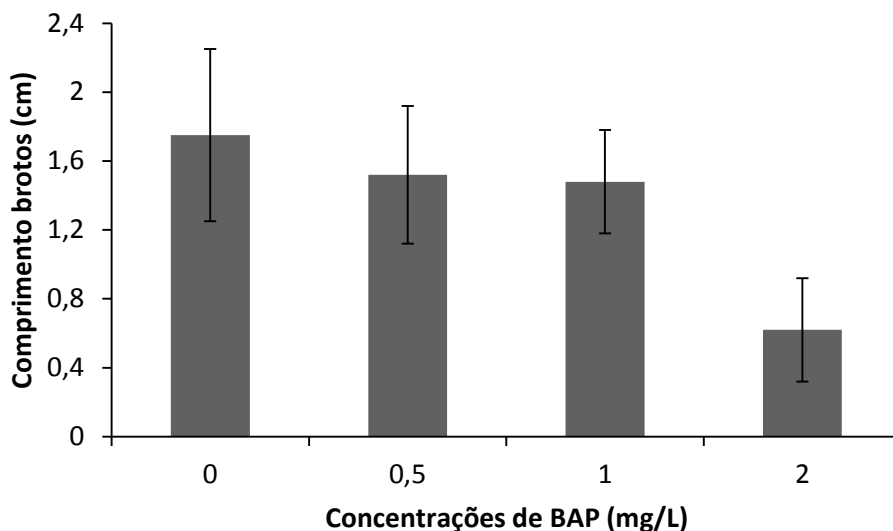
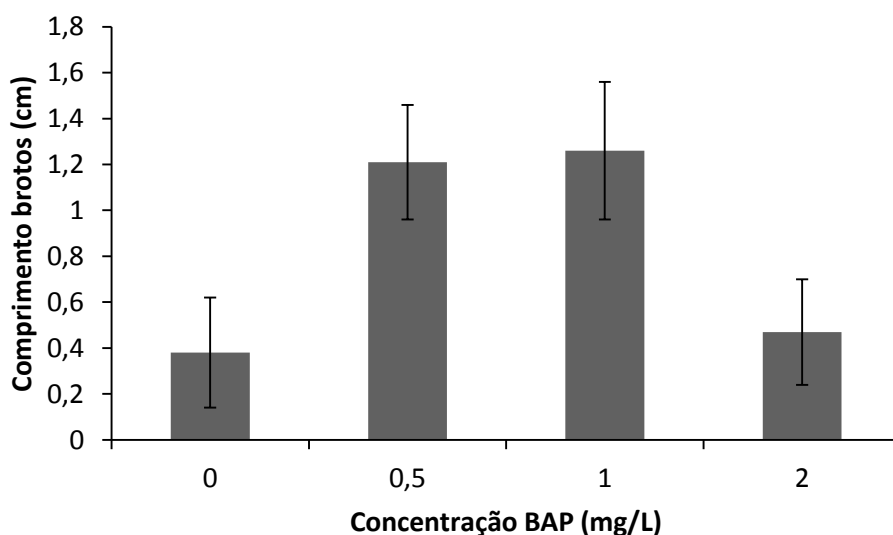


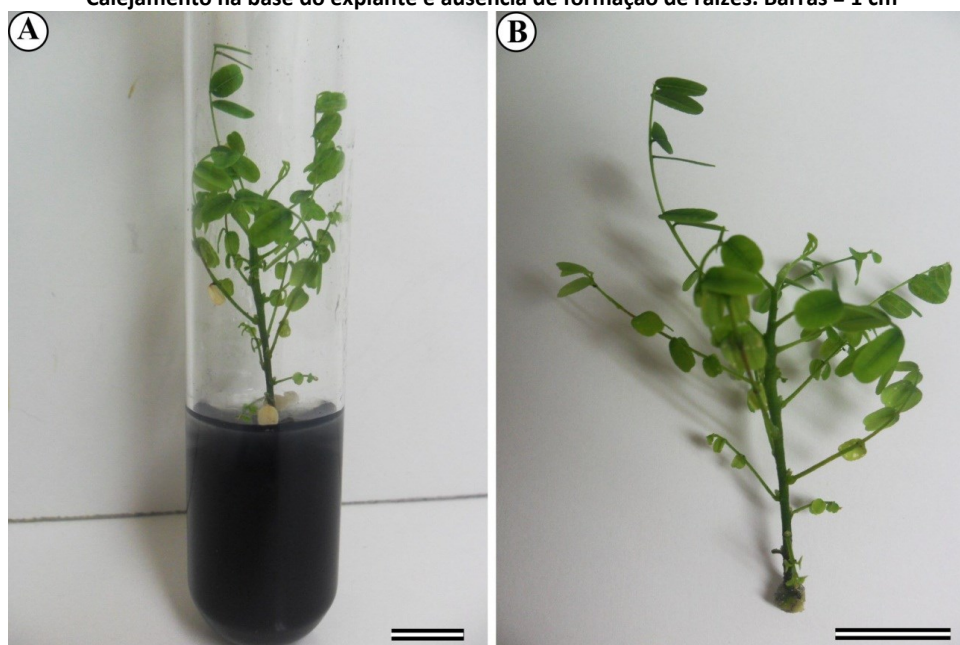
Figura 7: Comprimento das brotações de *P. emarginatus* geradas a partir de segmentos nodais em diferentes concentrações de BAP. Barras representam o desvio padrão (n=10).



3.3 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES DE *P. EMARGINATUS* COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB E ANA.

Decorrido o período de incubação, em nenhum dos tratamentos aplicados foi observada a formação de raízes nas brotações de *P. emarginatus* (Fig. 8A). Segundo GRIMALDI et al., (2008), o enraizamento in vitro encontra grandes dificuldades, especialmente para as espécies de plantas lenhosas. Os tratamentos promoveram apenas o calejamento da base dos explantes (Fig. 8B). Resultados semelhantes foram observados por RADMANN et al., (2002) no enraizamento in vitro de Macieira 'M-9'. Novos estudos deverão ser realizados para buscar a indução da rizogênese em *P. emarginatus*, uma vez que esta etapa é essencial para o sucesso da aclimatização das mudas.

Figura 8: Aspecto geral das brotações de *P. emarginatus* durante o experimento de enraizamento. A: Brotação submetida ao tratamento com 4 mg L^{-1} de AIB combinado com 0,25% (p/v) de carvão ativado. B: Calejamento na base do explante e ausência de formação de raízes. Barras = 1 cm



4 CONCLUSÃO

A desinfestação utilizando NaOCl por um período de tempo de 10 minutos proporcionou melhor descontaminação e germinação das sementes.

A utilização de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP foi eficaz para a formação de brotações com comprimento adequado para serem levadas ao processo de alongamento.

Devido a não ocorrência de enraizamento nos explantes novos testes deverão ser realizados para buscar a rizogênese na espécie, e assim, alcançar os resultados esperados.

5 AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao CNPq e a Fitoclone pelo apoio financeiro; e a Universidade Federal de Viçosa pela disponibilização da infraestrutura laboratorial.

6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BASSAN, J. S.; REINIGER.; L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de Canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). *Ciência Florestal*, v. 16, n.1, p. 381-390, 2006.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. *Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal*. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-254.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 29, n. 1, p. 1281-1287, 2005.

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

COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CID, L. P. B.; LAMEIRA, A. O. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (BENTH.) BENTH.] in vitro e ex vitro. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 1, p. 38-48, 2001.

EARLE, E. D.; LANGHANS, R. W. Propagation of *Crysanthemum* in vitro: production, growth and flowering of plantlets from tissues culture. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 99, n. 1, p. 352-358, 1974.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração in vitro de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 4, n.1, p. 201-205, 1998.

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

GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M. A.; MUNIZ, A. W.; GUIDOLIN, A. F. Enraizamento in vitro de frutíferas da família Rosaceae. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v. 7, n.1, p. 160-168, 2008.

HOSCHEID, J.; CARDOSO, M. L. C. Sucupira as a Potential Plant for Arthritis Treatment and Other Diseases. *Hindawi Publishing Corporation Arthritis*, London, V. 2015, n.1, p. 1-12, 2015.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: EMBRAPA, 2014. 386p.

LEONHARDT, V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 24, n. 6, p. 749-758, 2010.

MASCARO, U. C. P.; TEIXEIRA, D. F.; GILBERT, B. Avaliação da sustentabilidade da coleta de frutos de "sucupira branca" (*Pterodon emarginatus* Vogel) após queda espontânea. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 23-25, 2004.

MEDEIROS, J. D. A biotecnologia e a extinção de espécies. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 30, n.1, p. 109-113, 2003.

MOYO, M.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Recalcitrant effects associated with the development of basal callus-like tissue on caulogenesis and rhizogenesis in *Sclerocarya birrea*. *Plant Growth Regulation*, New York, v. 63, n. 1, p. 187-195, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Malden, v. 15, n. 1, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; AMADO, J. R. R.; CRUZ, R. A. S.; ROCHA, C. F.; SOUTO R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; SANTOS, K.; CONCEIÇÃO, E. C.; OLIVEIRA, L. A. R.; KELECOM, A.; FERNANDES, C. P.; CARVALHO, J. C. T. Development of a larvicidal nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. *PLOS ONE*, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2016.

PAIVA, P. D. O.; JOSÉ, S. C. B. R.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito do ácido naftaleno acético e GA3 na micropropagação de violeta. *Ceres*, Viçosa, v. 44, n. 1, p. 392-398, 1997.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. Á. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro de porta-enxertos de macieira 'M-9'. *Revista Brasileira Fruticultura*, v. 24, n. 1, p. 624-628, 2002.

REIS, G. G. *Estudos sobre a dormência de sementes de sucupira (Pterodon pubescens Benth)*. Dissertação de mestrado. 1976. 41 f. Dissertação mestrado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1976.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma lolyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 517-524, 2005.

RUBIM, R. F.; VIEIRA, H. D.; ARAÚJO, E. F.; VIANA, A. P.; COELHO, F. C. Tratamento com hipoclorito de sódio para remoção do pergaminho e aceleração da germinação de sementes de café conilon. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 88-98, 2010.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; Azevedo, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, 2002. 463 p.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. Introdução à micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação in vitro da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. *Ciência Agrotecnologia*, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.