

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Taiza de Oliveira Zago**

**Estabelecimento *in vitro* de guavirobiera (*Campomanesia adamantium*  
(Cambess.) O. Berg)**

**DOURADOS - MS**

**2013**

**Taiza de Oliveira Zago**

**Estabelecimento *in vitro* de guavirobeira (*Campomanesia adamantium*  
(Cambess.) O. Berg)**

“Trabalho de conclusão de curso apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de BACHAREL EM BIOTECNOLOGIA na Universidade Federal da Grande Dourados”.

Orientador(a): Cláudia Roberta Damiani

**DOURADOS – MS**

**2013**

**Taiza de Oliveira Zago**

**Estabelecimento *in vitro* de guavirobeira (*Campomanesia adamantium*  
(Cambess.) O. Berg)**

“Trabalho de conclusão de curso apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de GRADUADO (A) EM BIOTECNOLOGIA na Universidade Federal da Grande Dourados.”

Orientador(a): Cláudia Roberta Damiani

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Cláudia Roberta Damiani (Presidente)

---

Prof.<sup>a</sup> Liliam Silvia Candido

---

Prof.<sup>a</sup> Fernanda Pinto

Apresentado em: \_\_ / \_\_ / \_\_

Conceito: \_\_\_\_\_

**DOURADOS – MS**

**2013**

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, pelo dom da vida, pelo seu amor e misericórdia infinitos.

Aos meus pais, Alberi Zago e Nasira Farias de Oliveira, meus maiores exemplos, sem os quais eu não teria chegado aqui. Obrigada por cada incentivo e orientação, por terem acreditado em mim e torcido por mim, pelas orações em meu favor, pelo seu amor, suas renúncias e pela preocupação para que estivesse sempre andando pelo caminho correto.

Às minhas irmãs Camila de Oliveira Zago, por estar sempre ao meu lado, e por ter tornado mais fácil superar a distância de casa e a Maria Eduarda de Oliveira Zago por sua existência, seu sorriso e graça incomparável, seu carinho e ternura que me alegrava mesmo os dias mais tormentosos.

Ao meu namorado Vinicius Godoy Camargo, por ter sido meu amigo, companheiro, confidente e ter suportado sozinho as minhas inúmeras crises, por ter participado ativamente de minha transformação para uma pessoa melhor.

À minha professora, orientadora e amiga Cláudia Roberta Damiani que ouviu pacientemente as minhas considerações partilhando comigo as suas ideias, conhecimento e experiências e que sempre me motivou e que com poucos recursos disponíveis e algumas decepções pelo caminho, porém com muita paciência e atenção, dedicou do seu valioso tempo para me orientar de maneira inigualável em cada passo deste trabalho, além dos cafés e agradáveis conversas no sofá.

À Thalita Azambuja, por participar e colaborar ativamente para a execução deste trabalho.

À todos os meus colegas do curso de Biotecnologia, que de alguma maneira tornaram minha vida acadêmica cada dia mais desafiante. Peço a Deus que os abençoe grandemente, preenchendo seus caminhos com muita paz, amor, saúde e prosperidade.

*“Não são as respostas que movem o mundo,  
São as perguntas.”*

F/Nazca para Canal Futura

## RESUMO

A guavirobeira (*Campomanesia adamantium*) é uma espécie nativa do Cerrado, com potencial para a exploração sustentada, devido à qualidade nutricional dos frutos, propriedades medicinais da planta e diversidade nas formas de exploração dos frutos. Naturalmente a guavirobeira é propagada por sementes, porém com limitações, atribuídas principalmente à recalcitrância das sementes e a perda de viabilidade germinativa. Como alternativa à propagação sexuada, este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente para assepsia e estabelecimento *in vitro* de explantes caulinares de guavirobeira. Para atingir os objetivos propostos foram avaliados diferentes agentes antimicrobianos em tratamentos e delineamentos experimentais distintos. Experimento 1: Efeito dos agentes químicos (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio a 2,5%), em diferentes tempos de exposição (5 e 10 minutos). Experimento 2: Pré-tratamento dos ramos vegetativos com ácido ascórbico ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) seguido da inoculação dos explantes em meio de cultura contendo diferentes concentrações do antibiótico rifampicina (0 - controle, 10; 20; 30 e  $40 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Experimento 3: Efeito do tratamento por imersão dos ramos vegetativos pré-estabelecimento com os agentes antimicrobianos tetraciclina ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ), carbendazim ( $1,8 \text{ g.L}^{-1}$ ), tetraciclina + carbendazim (nas respectivas concentrações) e controle (ausência de agente antimicrobiano). A partir dos resultados obtidos verificou-se que a assepsia dos explantes com hipoclorito de cálcio por 5 minutos apresentou maior eficiência no controle da contaminação fúngica e bacteriana, se comparado ao hipoclorito de sódio, bem como reduziu o percentual de oxidação dos explantes, resultando em maior porcentagem de explantes estabelecidos. A imersão dos ramos vegetativos em solução com ácido ascórbico ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por 18 horas aparentemente foi ineficiente no controle da oxidação dos explantes. Concentrações acima de  $30 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de rifampicina no meio de cultura controlaram eficientemente a contaminação por bactérias, no entanto, inibiram completamente o estabelecimento *in vitro* de guavirobeira. O tratamento com a combinação de carbendazim ( $1,8 \text{ g.L}^{-1}$ ) + tetraciclina ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ) aparentemente diminuiu a contaminação por bactérias e fungos, e em comparação com o controle, não causou oxidação dos explantes de guavirobeira durante o estabelecimento *in vitro*.

**Palavras-chave:** micropropagação, cultura de tecidos, guavira.

## ABSTRACT

*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg ('Guavirobeira') is a species native to the Brazilian Cerrado bioma. It shows great potential for sustainable exploration due to its nutritional quality, variation in fruit use and plant medicinal properties. 'Guavirobeira' is naturally propagated by seeds; however, there are some limitations related to recalcitrance and loss of viability (germinative capacity). As an alternative to sexual propagation, this experiment aimed to establish a protocol for asepsis and *in vitro* establishment of stem explants of 'guavirobeira'. In order to achieve the results it was evaluated different antimicrobial agents through treatments and distinct experimental design. Experiment 1: Effect of chemical agents (sodium hypochlorite and calcium hypochlorite at 2.5%), at different exposition periods (5 to 10 minutes). Experiment 2: Pre-treatment of plant stems with ascorbic acid (100 mg L<sup>-1</sup>) followed by explant inoculation in culture medium containing different concentrations of rifampicin antibiotic (0-control, 10, 20, 30 and 40 µg mL<sup>-1</sup>). Experiment 3: Effect of the immersion treatment of the pre-established stem with the antimicrobials tetracycline (300 mg L<sup>-1</sup>), carbendazim (1.8 g L<sup>-1</sup>), tetracycline + carbendazim (same respective concentrations) and control (no antimicrobial agent). Asepsis of the explants with calcium hypochlorite for 5 minutes showed higher efficiency in controlling fungal and bacterial contamination whether comparing to sodium hypochlorite. It also reduced the oxidation percentage of the explants which resulted in higher percentage of established explants. The immersion of plant stems in ascorbic acid solution (100 mg L<sup>-1</sup>) for 18 hours was apparently inefficient in controlling explant oxidation. Concentrations above 30 µg mL<sup>-1</sup> of rifampicin in the culture medium controlled efficiently the bacterial contamination; however it completely inhibited *in vitro* establishment of 'guavirobeira'. Combining carbendazim (1.8 g L<sup>-1</sup>) plus tetracycline (300 mg L<sup>-1</sup>) seemed to diminish bacterial and fungal contamination comparing to control and didn't cause explant contamination during *in vitro* establishment.

**Keywords:** micropropagation, tissue culture, guavira.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	10
2.1 O Cerrado .....	10
2.2 A guaviroveira .....	11
2.3 A micropropagação vegetal .....	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo Geral .....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
4.1 Experimento 1: Efeito do desinfestante e tempo de desinfestação.....	<b>Erro!</b>
	<b>Indicador não definido.</b>
4.2 Experimento 2: Pré-tratamento com ácido ascórbico e avaliação de diferentes concentrações de rifampicina no meio de cultura.....	17
4.3 Experimento 3: Efeito do tratamento com carbendazim e tetraciclina .....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
5.1 Experimento 1: Efeito do desinfestante e tempo de desinfestação.....	19
5.2 Experimento 2: Pré-tratamento com ácido ascórbico e avaliação de diferentes concentrações de rifampicina no meio de cultura.....	21
5.3 Experimento 3: Efeito do tratamento com carbendazim e tetraciclina .....	23
6. CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS .....	27



## 1. INTRODUÇÃO

A guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg) é uma das diversas frutas nativas do Cerrado que apresenta potencial de exploração sustentável a curto prazo (VIEIRA et al., 2006). Esta espécie apresenta frutos suculentos, ácidos e levemente adocicados que podem ser consumidos *in natura*, ou na forma de sucos, doces, sorvetes, matéria-prima para licores (PORTO e GULIAS, 2006); (VIEIRA et al., 2006), bem como, flavorizante na indústria de bebidas (VALLILO et al., 2006). É também considerada uma planta medicinal, possuindo propriedades antidiarréicas (PARTELLI et al., 2010).

Devido à qualidade nutricional dos frutos e sua exploração ser até o momento, extrativista e predatória, a guaviroveira tem despertado o interesse de diversos segmentos da sociedade (VIEIRA et al., 2006).

A propagação da guaviroveira é realizada naturalmente através de sementes. No entanto, um fator limitante da propagação sexuada desta espécie encontra-se na perda do poder germinativo das sementes, as quais necessitam ser semeadas logo após a sua extração dos frutos (CARMONA et al., 1994; MELCHIOR et al., 2006; SCALON et al., 2009). O comportamento das sementes de guavira indica que a espécie pode ser classificada como recalcitrante, por não suportar armazenamento à baixa temperatura e ser intolerante à dessecação (MELCHIOR et al., 2006).

Em espécies lenhosas, como a maioria das frutíferas, de acordo com Schuch e Erig (2005), o estabelecimento *in vitro* apresenta dois problemas principais: a contaminação e a oxidação. Em acréscimo a estes problemas, outro fator agravante está na origem do material utilizado como matriz para o estabelecimento *in vitro*. De acordo com Pasqual et al., (2010) plantas matrizes oriundas do campo ficam expostas a intempéries e insetos, que quando provocam ferimentos na planta, as tornam mais susceptíveis a entrada de micro-organismos patogênicos.

Em comparação às técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, entre as quais, a possibilidade de propagar rapidamente em larga escala novos genótipos, obter plantas livres de doenças e

propagar vegetativamente espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (DAMIANI e SCHUCH, 2008).

Devido à recalcitrância das sementes de guavira, a micropropagação *in vitro* pode ser usada como alternativa para a propagação da espécie. A obtenção de mudas por micropropagação depende do sucesso na fase de estabelecimento *in vitro*.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 O Cerrado**

O Cerrado, termo utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil central, é o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área, apenas pela Amazônia (EITEN, 1977). Esse bioma, encontrado predominantemente no planalto central brasileiro, ocupa mais de 200 milhões de hectares, o que, equivalente a cerca de 20% do território nacional, distribuídos principalmente nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Piauí, Maranhão e Distrito Federal. O Cerrado faz ligações com outros biomas existentes no país como o Pantanal, a Floresta Amazônica, a Caatinga e a Mata Atlântica, constituindo-se em um elo entre eles (SCIAMARELLI, 2005; PARTELLI et al., 2010). O Cerrado é considerado a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002) e de acordo com Klink e Machado (2005) possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo.

Nas últimas quatro décadas, o Cerrado passou a ser a maior fonte brasileira de grãos de soja e pastagens, além de significativo produtor de arroz, milho e algodão, passando ainda a suportar o segundo maior rebanho de gado do país. A exploração do bioma para a atividade agropecuária resultou em uma extensa conversão e fragmentação dos espaços naturais. Cerca de 80% da área original já foi alterada de alguma forma, restando apenas 20% de área natural (PREVEDELLO e CARVALHO, 2006; DOMINGOS, 2008).

Atualmente, órgãos de pesquisa, ensino, proteção ambiental e extensão rural da região têm estudado e divulgado o potencial de utilização das espécies do Cerrado, além de investir na conscientização dos agricultores quanto à importância

de preservá-las e utilizá-las de forma racional e sustentável (AVIDOS e FERREIRA, 2003).

Entre as principais espécies com potencial para a exploração sustentável estão o pequi, a mangaba, a cagaita, o araticum, o buriti, o baru e a guavira (PARTELLI et al., 2010). No entanto, a flora do Cerrado possui diversas espécies frutíferas além das acima citadas, com grande potencial de utilização agrícola, que são tradicionalmente utilizadas pela população local. Dentre, as diversas formas de uso, os frutos, em geral, são consumidos *in natura* ou na forma de sucos, licores, sorvetes, geléias e doces diversos (ALMEIDA, 1998; SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2008). Os frutos do Cerrado apresentam sabores *sui generis* e elevados teores de açúcares, proteínas, sais minerais, ácidos graxos (SILVA et al., 2001), vitaminas do complexo B e carotenóides (AGOSTINI-COSTA & VIEIRA, 2004). Baseando-se na importância nutricional e na conservação das espécies frutíferas nativas do Cerrado, fica claro, que há um grande campo com potencial a ser explorado para a inserção destas espécies em sistemas produtivos.

Neste contexto, sabendo-se que a exploração da grande maioria de frutíferas nativas é essencialmente extrativista e predatória, torna-se imprescindível estudo sobre técnicas de cultivo e propagação para o desenvolvimento de mudas destas espécies, e a seleção de genótipos superiores para viabilizar o início do desenvolvimento de um novo cultivo.

## 2.2 A guaviroveira

A guavira, *C. adamantium* (Cambess.) O. Berg, também conhecida como gabiroba, guabiroba, guabiroba-do-campo, guariroba, guabiroba-do-cerrado, guabiroba-lisa, guabiroba-branca, é fruto da guaviroveira, pertencente à família Myrtaceae (LORENZI, 1998), é uma das diversas frutas nativas do Cerrado, que apresenta potencial de exploração sustentável a curto prazo (VIEIRA et al., 2006). É uma planta com porte subarbustivo ou arbustivo de 0,3 m até 2,0 m de altura. Suas plantas apresentam ramos amarelados, com folhas opostas, simples, inteiras com pontuações translúcidas, ápice agudo, base obtusa, membranáceas, levemente avermelhadas quando jovens, coriáceas, oblongas com face ventral pruinosa e dorsal amarelada, quando adultas (FERREIRA, 1972). Floresce nos meses de

setembro a novembro, com flores brancas, solitárias, axilares ou terminais (LORENZI, 1998). A espécie *C. adamantium* é nativa, não endêmica, de ampla distribuição, Cerrado e Mata Atlântica, podendo ser encontrada nas regiões: centro-oeste, nos estados do Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul; sudeste, nos estados de Minas Gerais e São Paulo e sul, nos estados do Paraná e Santa Catarina (SOBRAL et al., 2010).

Os frutos, do tipo globoso, apresentam diâmetro de 2,0 a 2,5 cm, com polpa amarelada quando madura (FERREIRA, 1972). Os frutos atingem a maturidade no período de novembro a dezembro, sendo comestíveis e consumidos por várias espécies de pássaros e mamíferos (LORENZI, 1998).

Seus frutos suculentos, ácidos e levemente adocicados podem ser consumidos *in natura*, na forma de sucos, doces, sorvetes, pudins, pavês e como matéria prima para a fabricação de licor e vinho (PORTO E GULIAS, 2006). A análise da composição química da guavira revela também sua possível utilização como flavorizante na indústria de bebidas, uma vez que, seus frutos apresentam elevada acidez, alto teor de ácido ascórbico (vitamina C), minerais, fibras alimentares e hidrocarbonetos monoterpênicos ( $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\beta$ -z ocimeno), presentes em maior quantidade no óleo volátil dos frutos, e que lhes conferem o aroma cítrico (VALLILO et al., 2006).

A guaviroveira é também considerada uma planta medicinal, possuindo propriedades antidiarréicas, sendo suas cascas e folhas usadas sob a forma de chás (PARTELLI et al., 2010). Além disso, a planta é melífera, sendo importante para o pasto apícola (PORTO e GULIAS, 2006).

Com relação à propagação da espécie, naturalmente a guaviroveira é propagada por sementes (PORTO e GULIAS, 2006), porém, a propagação sexuada desta espécie apresenta algumas limitações, devido principalmente às suas sementes apresentarem recalcitrância, não suportando armazenamento à baixa temperaturas e sendo intolerante à dessecação (MELCHIOR et al., 2006). Devido a curta viabilidade das sementes, a germinação dever ser feita imediatamente após a colheita dos frutos (AVIDOS e FERREIRA, 2003).

Um dos grandes entraves, na obtenção de mudas para o estabelecimento de cultivos comerciais de espécies frutíferas, está na obtenção de mudas uniformes, com qualidade fitossanitária e boa produtividade. Em relação ao cultivo de frutíferas nativas do Cerrado, muitos estudos ainda precisam ser realizados nas áreas de

propagação e plantio, práticas culturais, fitossanidade, melhoramento, sistemas de produção e colheita (VIEIRA et al., 2006).

### **2.3 A micropropagação vegetal**

No estabelecimento de cultivos comerciais, a escolha de mudas com maior uniformidade genética, qualidade fitossanitária e produtividade é de extrema importância. Também é necessário levar em consideração o estágio de desenvolvimento das mudas, uma vez que, na fruticultura, o estágio adulto é importante devido à capacidade de frutificação. Para a obtenção destas características agrupadas, a propagação por sementes não é a ideal, pois, tem-se um longo período de juvenilidade, retardando a frutificação, e uma grande variabilidade genética devido à segregação e a recombinação que tem lugar no processo de reprodução sexual (SIMÃO, 1998).

Uma alternativa para a propagação de diversas espécies frutíferas, podendo ser utilizado também com as espécies nativas, encontra-se no cultivo *in vitro*, através da micropropagação (SOUZA et al., 2007). De acordo com estes últimos autores, a micropropagação permite a formação de pomares com populações de plantas homogêneas, mudas com alta sanidade, além de acelerar os métodos de propagação convencional como a enxertia.

A micropropagação é um método de propagação comumente utilizado na multiplicação das mais variadas espécies de plantas. A cultura de meristemas caulinares, isolados ou inseridos em ápices ou segmentos nodais, é o tipo mais simples de micropropagação, pois não ocorre indução de novos meristemas, mas apenas o desenvolvimento de meristemas já existentes no explante e o posterior enraizamento dos rebentos caulinares deles resultantes. Esta técnica foi a primeira a ser utilizada para fins comerciais e é, ainda hoje, frequentemente aplicada à propagação de espécies com elevado valor comercial (CANHOTO, 2010).

Em comparação às técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, entre as quais, a possibilidade de propagar rapidamente em larga escala novos genótipos, obter plantas livres de doenças e propagar vegetativamente espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (DAMIANI e SCHUCH, 2008), como por exemplo, algumas espécies nativas do Cerrado (ANDRADE, 2002). A micropropagação permite também, a

produção de mudas durante todo o ano, independentemente das estações do ano e a redução do tempo necessário à propagação da espécie (SCHUCH e ERIG, 2005). Através da micropropagação é possível obter plantas altamente homogêneas a partir de plantas heterozigotas, possibilitando o aproveitamento da heterose ou vigor híbrido (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), sem as limitações da produção de sementes. Além das vantagens obtidas na propagação vegetativa através da micropropagação, esta técnica também apresenta aplicação prática nos programas de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasmas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O processo de micropropagação ou clonagem *in vitro*, pode ser dividido em três estágios de acordo com Grattapaglia e Machado (1998). O primeiro estágio envolve a seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas. Uma vez estabelecido os explantes, segue-se para o segundo estágio, chamado de multiplicação *in vitro*, no qual, os propágulos são submetidos a sucessivas subculturas (repicagens) em meio próprio para a multiplicação. No terceiro estágio, os propágulos multiplicados são enraizados, aclimatados e transferidos para o solo.

O desenvolvimento de uma planta depende da interação de fatores internos, como as substâncias orgânicas, os hormônios, que desempenham importante função na regulação do crescimento, e externos, como a luz, a temperatura e o fotoperíodo (SCHUCH e ERIG, 2005). De acordo com os mesmos autores, o aspecto mais interessante da propagação *in vitro* está justamente no grau de controle que pode ser exercido sobre, praticamente, todos os estágios de desenvolvimento, do estabelecimento até a multiplicação e enraizamento da planta. As condições de estabelecimento de cada espécie podem variar, em relação às necessidades de fatores endógenos e exógenos, que controlam seu crescimento e desenvolvimento.

Com relação a espécies frutíferas do Cerrado, poucas pesquisas têm sido conduzidas no sentido de obter mudas micropropagadas diretamente de gemas caulinares. A grande maioria dos trabalhos realizados envolve a obtenção de mudas através da germinação *in vitro* ou a partir da embriogênese somática via embriões zigóticos. Em ambos os casos, germinação *in vitro* ou embriogênese somática via embriões zigóticos, o material utilizado é de origem sexuada, não caracterizando a formação de clones (SCHUCH e ERIG, 2005).

Dentre os trabalhos com espécies frutíferas nativas do Cerrado cultivadas *in vitro*, pode-se citar a germinação *in vitro* de sementes e o crescimento inicial de plântulas de mangabeira, *Hancornia speciosa* Gomes (LÉDO et al, 2007); o efeito da escarificação e da luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) (MARTINOTTO et al., 2007); o estudo de embriões somáticos obtidos através de calos produzidos por embriões zigóticos em macauba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius) (MOURA et al., 2008); micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) através de segmentos nodais obtidos de sementes germinadas *in vitro* (SANTOS et al., 2006).

Mediante a dificuldade de obtenção de mudas através de sementes, a aplicação da técnica de micropropagação ou clonagem *in vitro* surge como técnica alternativa e promissora para a conservação das espécies frutíferas nativas do Cerrado, mantendo a propagação fiel dos genótipos selecionados, subsidiando a produção de mudas para a instalação de pomares comerciais, bem como, garantindo a preservação das espécies.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

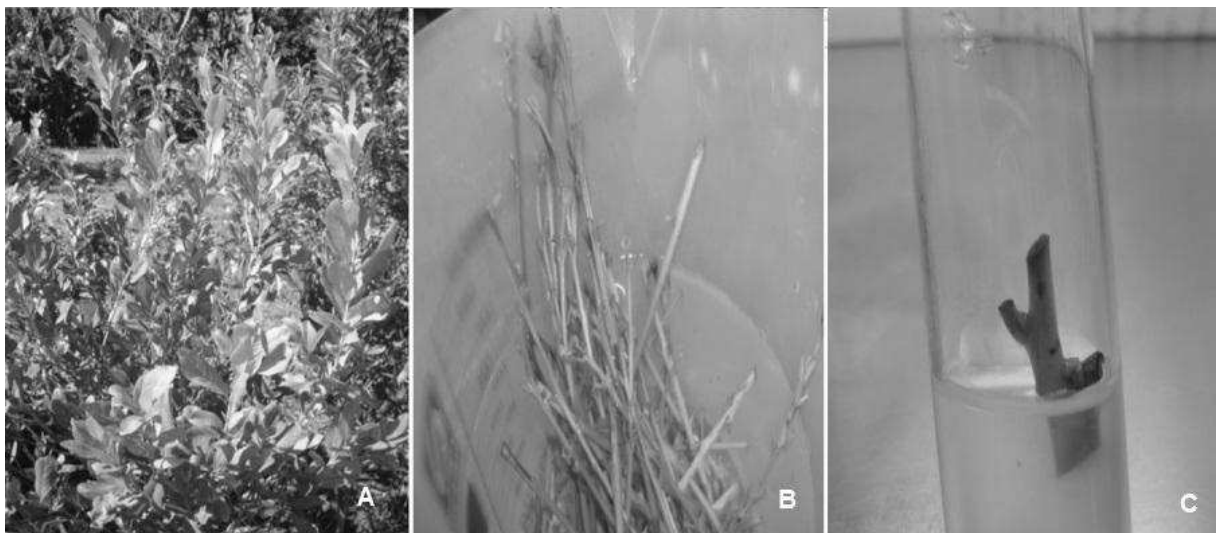
Estabelecer um protocolo de esterilização superficial dos explantes visando à redução da contaminação fúngica e bacteriana durante o estabelecimento *in vitro* de guavirobeira;

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Definir o agente desinfestante adequado para o estabelecimento *in vitro*;
- ✓ Avaliar o tempo de desinfestação efetivo na desinfestação dos explantes;
- ✓ Avaliar a ação de antioxidantes no controle da oxidação dos explantes *in vitro*;
- ✓ Avaliar a eficiência do uso de agentes fungicidas e bactericidas no controle da contaminação *in vitro*.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Botânica e Multiuso, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS. O material vegetal foi obtido de ramos vegetativos jovens de plantas de guavirobeira, *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da UFGD. Os explantes caulinares foram preparados com aproximadamente 2,0 cm, mantendo-se 2 gemas laterais sem a presença de folhas,. Em todos os experimentos os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio WPM (Wood Plant Medium, LLOYD e MCCOWN, 1980), acrescido de 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (6 – benzilaminopurina), 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar, e, posteriormente, o meio de cultura foi autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram transferidos para câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, submetidos a um período de escuro de 7 dias e após este período, mantidos sob luminosidade com densidade de fluxo de fótons de 45 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de 4 repetições e cada repetição constituída de 8 tubos de ensaio com um explante cada.



**Figura 1.** A) Plantas matrizes de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg do Horto de Plantas Medicinais (FCA); B) Ramos vegetativos de *C. adamantium* utilizados para a retirada dos segmentos nodais durante o estabelecimento *in vitro*; C) Explante de *C. adamantium* inoculado em meio de cultura. UFGD, Dourados, MS, 2013.



#### **4.1 Experimento 1: Efeito do desinfestante e tempo de desinfestação**

Os fatores estudados foram o tempo de desinfestação (5 e 10 minutos) e o tipo de desinfestante (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio a 2,5 % de cloro ativo), obtendo-se um fatorial 2x2, totalizando 4 tratamentos. A esterilização superficial dos ramos vegetativos foi realizada em câmara de fluxo laminar com álcool 70% por 1 minuto e posteriormente realizou-se os tratamentos com a adição de 1 gota de Tween 80 para cada 500 mL de solução de hipoclorito, seguido da lavagem do material vegetal por 3 vezes com água estéril. Após o processo de esterilização superficial os explantes foram preparados e inoculados em meio de cultura.

As avaliações foram realizadas aos 56 dias após a inoculação. As variáveis analisadas foram contaminação fúngica, contaminação bacteriana, explantes oxidados, e explantes estabelecidos (considerando estabelecidos aqueles que emitiram brotações). Durante as avaliações os tubos com contaminações e com explantes totalmente oxidados foram descartados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de 4 repetições e cada repetição constituída de 8 tubos de ensaio com um explante cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ), através do programa estatístico Winstat (Machado et al., 1999). Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de  $X/100$ , onde X foi o valor obtido.

#### **4.2 Experimento 2: Pré-tratamento com ácido ascórbico e avaliação de diferentes concentrações de rifampicina no meio de cultura**

Para a realização deste experimento, após a coleta, os ramos foram imersos em solução de ácido ascórbico ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e mantidos durante 18 h antes dos procedimentos de esterilização superficial e estabelecimento *in vitro*. A esterilização superficial dos ramos vegetativos foi realizada através da lavagem em álcool 70% (1 minuto) e imersão em solução de hipoclorito de cálcio (2,5%) contendo 1 gota de Tween 80 para cada 500 mL de solução de hipoclorito, por 10 minutos, sob agitação. Posteriormente, o material vegetal foi lavado por 3 vezes em água estéril. Após a

esterilização superficial, os explantes foram preparados e inoculados em meio de cultura contendo diferentes concentrações do antibiótico rifampicina (0 - controle, 10; 20; 30 e 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), totalizando 5 tratamentos.

As avaliações foram realizadas aos 28 dias após a inoculação. As variáveis analisadas foram contaminação fúngica, contaminação bacteriana, explantes oxidados, e explantes estabelecidos (considerando estabelecidos aqueles que emitiram brotações). Durante as avaliações os tubos com contaminações e com explantes totalmente oxidados foram descartados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de 4 repetições e cada repetição constituída de 8 tubos de ensaio com um explante cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente por regressão polinomial ( $P < 0,05$ ), através do programa Winstat (Machado et al., 1999). Os dados obtidos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de  $X/100$ , onde  $X$  foi o valor obtido.

### **4.3 Experimento 3: Efeito do tratamento com carbendazim e tetraciclina**

Os tratamentos consistiram de imersão em solução de tetraciclina ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ), carbendazim ( $1,8 \text{ g.L}^{-1}$ ), tetraciclina + carbendazim e controle (ausência de agente antimicrobiano, usando somente água destilada), totalizando 4 tratamentos. Os ramos vegetativos foram mantidos em imersão nos respectivos tratamentos por 18 horas e, ao final deste período, o material foi esterilizado superficialmente com álcool 70% por 1 minuto, seguido da imersão em hipoclorito de cálcio (2,5 %) contendo 1 gota de Tween 80 para cada 500 mL de solução de hipoclorito, por 5 min, sob agitação. Posteriormente, o material vegetal foi lavado por 3 vezes em água estéril, seguido do preparo e inoculação dos explantes em meio de cultura.

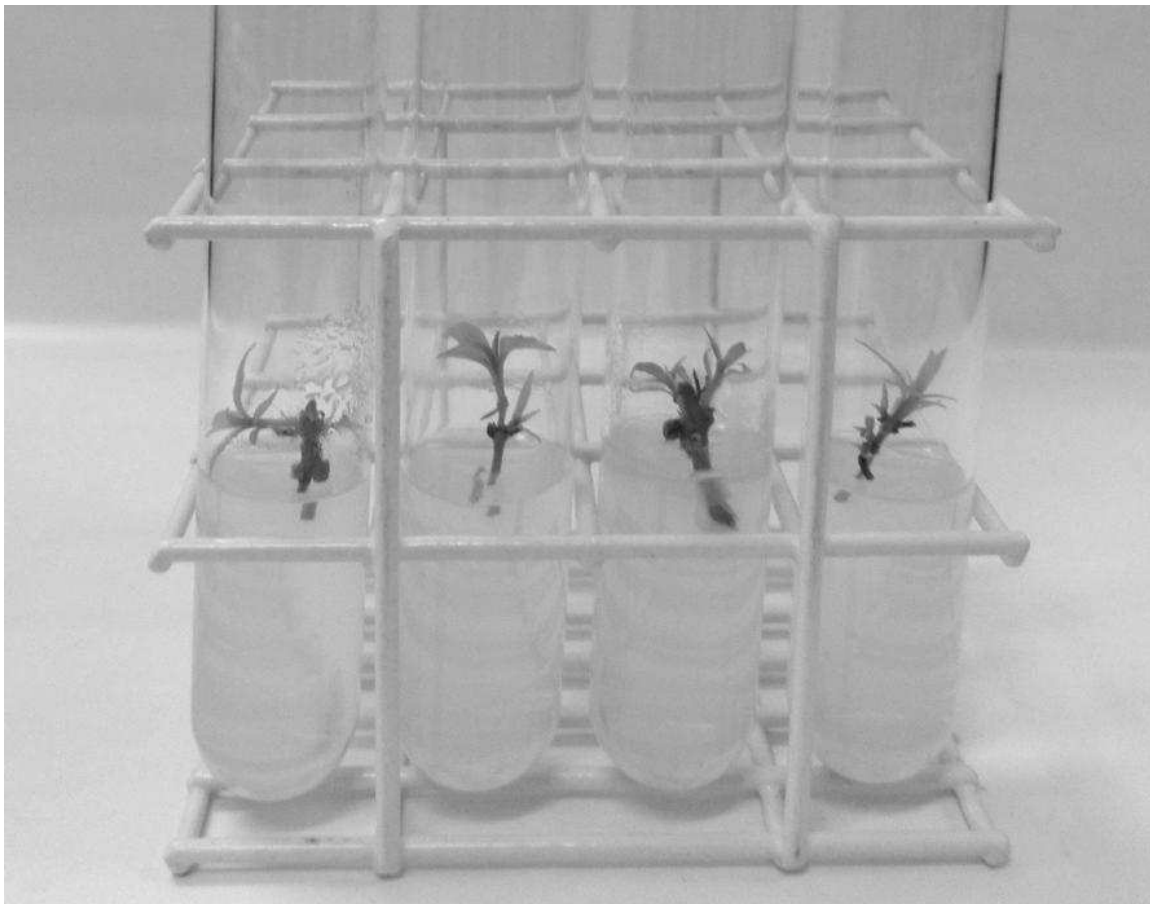
As avaliações foram realizadas 28 dias após a inoculação. As variáveis analisadas foram contaminação fúngica, contaminação bacteriana, explantes oxidados, e explantes estabelecidos (considerando estabelecidos aqueles que emitiram brotações). Durante as avaliações os tubos com contaminações e com explantes totalmente oxidados foram descartados.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo cada tratamento constituído de 4 repetições e cada repetição constituída de 8 tubos de

ensaio com um explante cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ), através do programa Winstat (Machado et al., 1999). Os dados de porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de  $X/100$ , onde  $X$  foi o valor obtido.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

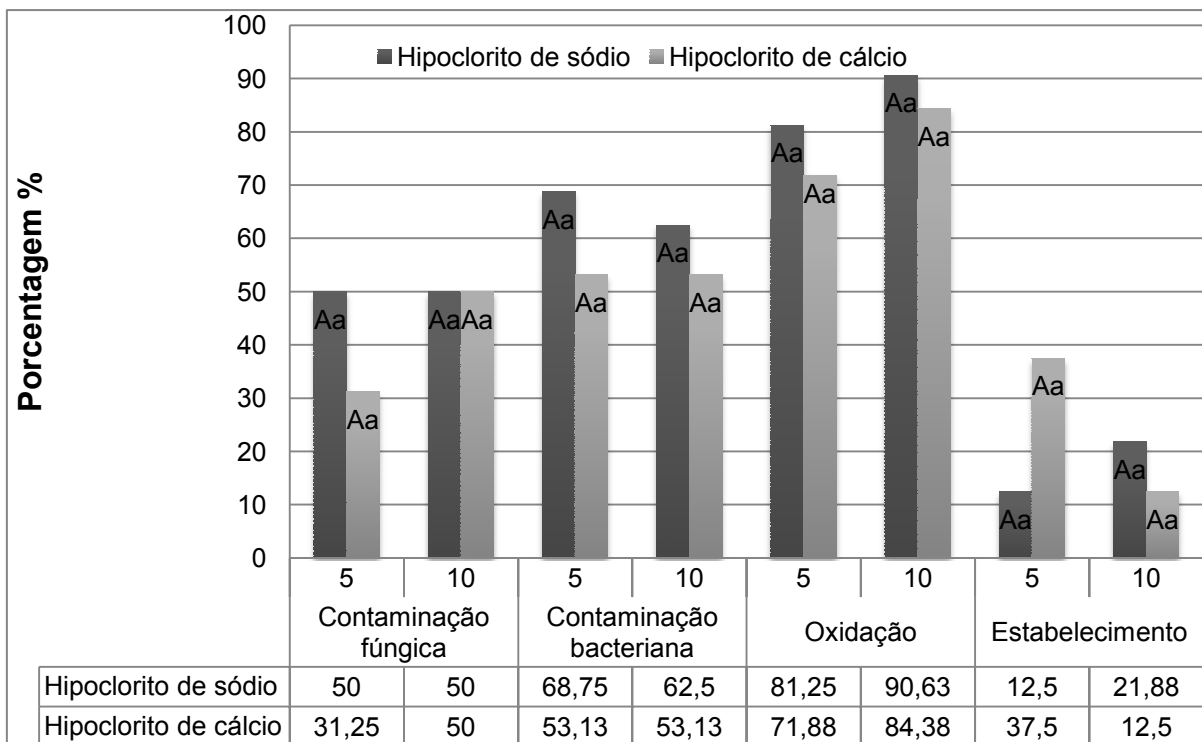
### 5.1 Experimento 1: Efeito do desinfestante e tempo de desinfestação



**Figura 2.** Explantes de guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg) estabelecidos *in vitro* aos 56 dias de cultivo. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

Como pode ser observado na figura 3, a desinfestação com hipoclorito de cálcio apresenta maior eficiência no controle da contaminação causada principalmente por bactérias (51,12%), bem como, explantes tratados com este desinfestante, apresentam menor porcentagem de oxidação 71,88%. Considerando o tratamento com hipoclorito de cálcio e os tempos de exposição ao mesmo, é

possível também verificar que explantes tratados por 5 minutos apresentam menor porcentagem de contaminação fúngica (31,25%) e menor oxidação (71,88%) e como resultado principal, maior porcentagem de explantes estabelecidos (37,5%). A redução da oxidação com a diminuição do tempo de exposição ao hipoclorito (5 minutos) pode ser justificada pelo fato de que o cloro, principal componente do hipoclorito, quando liberado em meio aquoso produz ácido hipocloroso, o qual tem como característica, elevado poder oxidante (PASQUAL et al., 2002), desta forma, quanto menor a exposição ao hipoclorito, menor a oxidação dos explantes. Apesar disso, a comparação das médias dos resultados obtidos não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

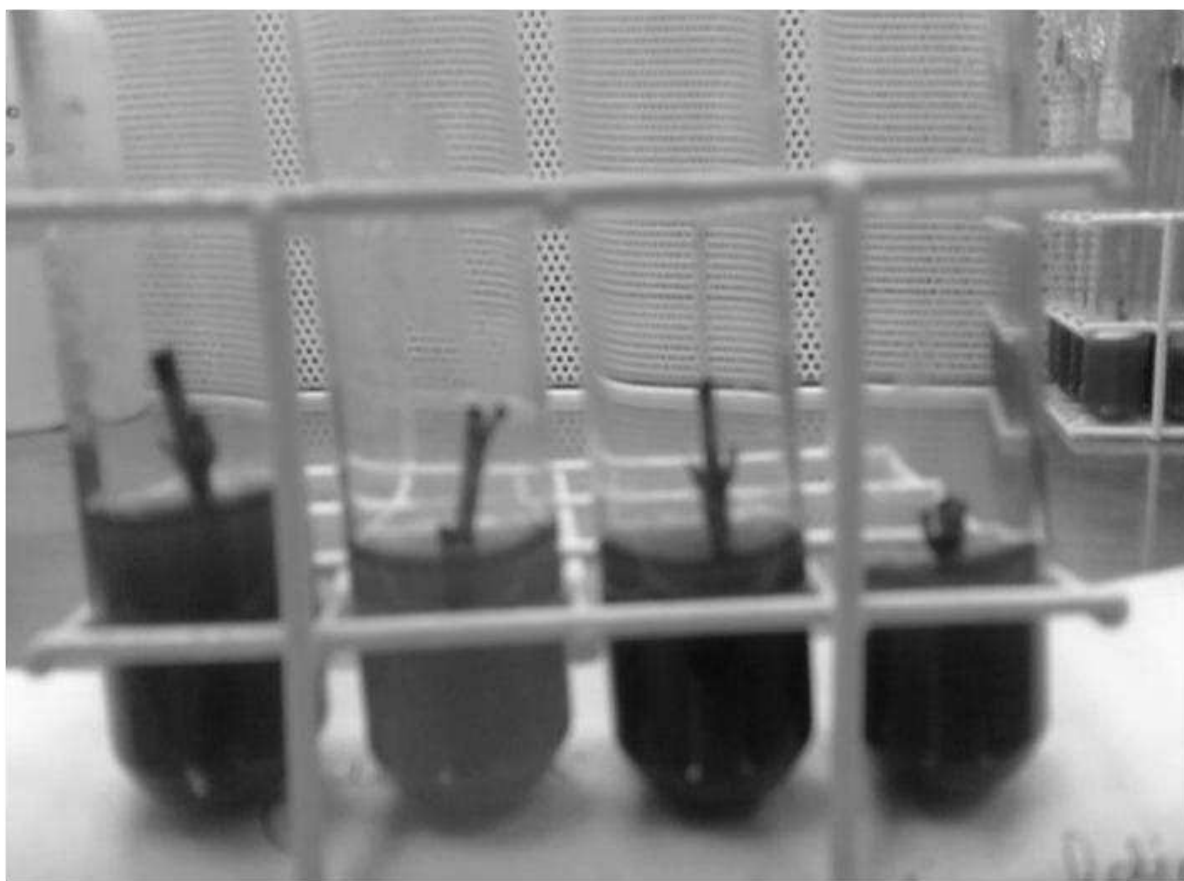


**Figura 3.** Porcentagem de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação e estabelecimento *in vitro* de guaviroveira (*Campomanesia adamantium*) ao final de 56 dias. Letras iguais não diferem estatisticamente no teste de Duncan a 5% de probabilidade. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2012.

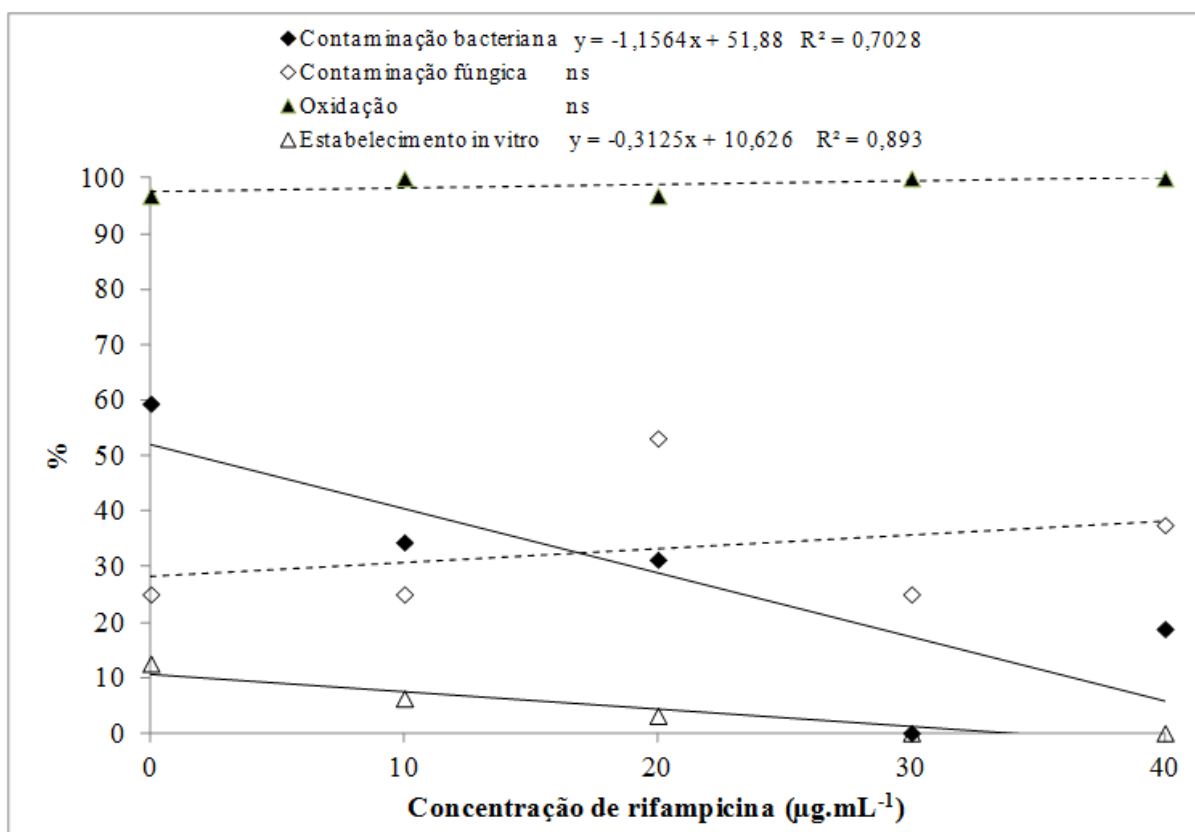
A baixa porcentagem de estabelecimento resultante do elevado índice de contaminação por fungos e bactérias verificados neste experimento, podem ser justificados pelo fato das plantas matrizes serem oriundas do campo. De acordo com Pasqual et al. (2010) plantas matrizes oriundas do campo ficam expostas a intempéries e insetos, que quando provocam ferimentos na planta, as tornam mais susceptíveis a entrada de microrganismos patogênicos.

## 5.2 Experimento 2: Pré-tratamento com ácido ascórbico e avaliação de diferentes concentrações de rifampicina no meio de cultura

Observou-se um comportamento linear decrescente da contaminação bacteriana com o aumento da concentração de rifampicina no meio de cultura, como fica claro na figura 5. Porém, com o aumento da concentração do antibiótico verificou-se uma redução significativa do número de explantes estabelecidos, chegando a zero nas concentrações de 30 e 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A inibição do estabelecimento com o uso de rifampicina nas concentrações de 30 e 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  indica um provável efeito fitotóxico.



**Figura 4.** Explantes de guavirobeira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg) em meio de cultura com rifampicina aos 7 dias de estabelecimento *in vitro*. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.



**Figura 5.** Porcentagem de contaminação bacteriana, fúngica, oxidação e estabelecimento *in vitro* de guaviroveira (*Campomanesia adamantium*) em função da concentração do antibiótico rifampicina no meio de cultura. Dourados, MS, 2013.

Os resultados obtidos neste experimento indicam que o tratamento dos ramos vegetativos com ácido ascórbico na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> antes do estabelecimento *in vitro*, independentemente da adição de rifampicina no meio de cultura, foi ineficiente no controle da oxidação dos explantes, observando-se valores acima de 90% de oxidação.

Estudos conduzidos por Coutinho et al. (2008) demonstraram que o extrato das folhas de guaviroveira apresenta elevada atividade antioxidante provavelmente associada a presença de alto teor de compostos fenólicos. A produção abundante de compostos fenólicos é comum em plantas frutíferas pertencentes à família Myrtaceae (FACHINELLO et al., 2005). Espécies que produzem compostos fenólicos, em geral, são benéficas para a saúde humana. No entanto, durante a preparação dos explantes para o estabelecimento *in vitro*, o corte causa a liberação destes compostos, os quais, em contato com o meio, são oxidados pelas enzimas polifenases produzindo substâncias tóxicas e inibindo o crescimento dos explantes (OLIVEIRA et al., 2007). A oxidação dos polifenóis leva a produção de substâncias de composição complexa, como as quinonas, que, de acordo com Teixeira et al.

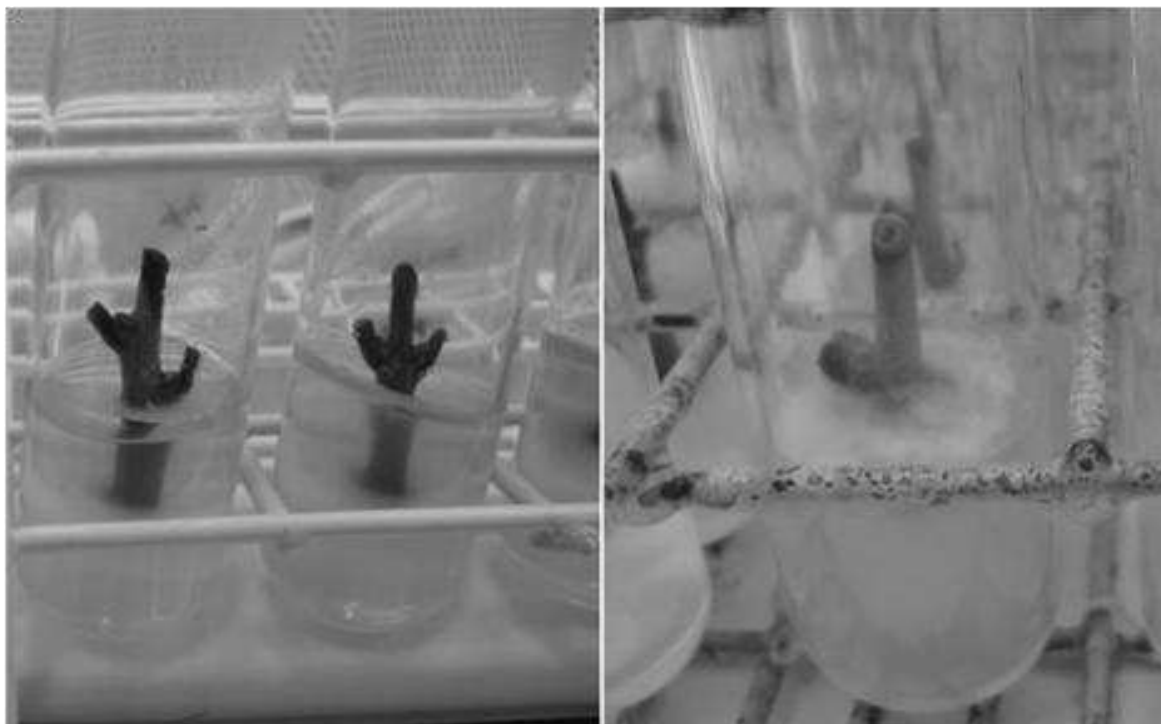
(2001), podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula. Estes dados contribuem para explicar o elevado porcentagem de oxidação e o baixo estabelecimento *in vitro* verificados neste trabalho.

Carneiro et al. (2000) também observaram que o uso de rifampicina no meio de cultura, além de prejudicar o desenvolvimento dos explantes de bananeira 'Maçã', após o estabelecimento, provoca deformações na parte aérea e redução no tamanho final dos explantes. Por outro lado, Vianna et al. (1997) verificou que o emprego de rifampicina por imersão (solução de 300 mg.L<sup>-1</sup>) e/ou adição no meio de cultura (50 mg.L<sup>-1</sup>) controlou satisfatoriamente as contaminações de caráter endofítico, obtendo-se 70% dos explantes sadios, sem sinais de fitotoxicidade em explantes de mamoeiro provenientes do campo.

Conforme observado e de conhecimento geral, a rifampicina é eficiente no controle da contaminação bacteriana, porém, o controle da contaminação fúngica é outro fator determinante no sucesso do estabelecimento *in vitro*. Através dos resultados obtidos verificou-se um elevado porcentagem de contaminação por este micro-organismo, sendo necessários estudos posteriores com agentes fungicidas para controlar este contaminante.

### **5.3 Experimento 3: Efeito do tratamento com carbendazim e tetraciclina**

Em relação a contaminação fúngica, os explantes tratados com carbendazim apresentaram uma redução de aproximadamente 10% em comparação aos explantes sem tratamento. Por outro lado, o tratamento com carbendazim causou aumento na oxidação dos explantes.



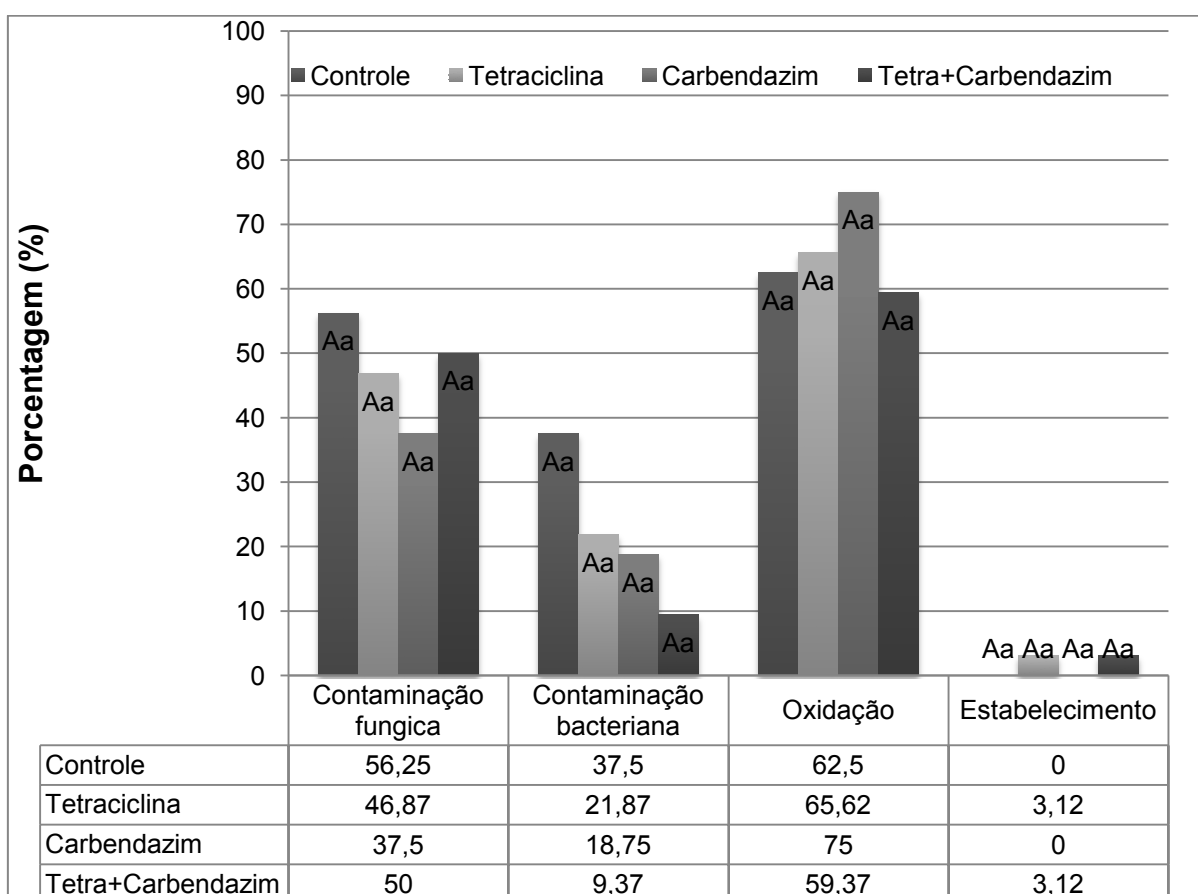
**Figura 6.** Explantes de guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg) com contaminação fúngica, bacteriana e oxidação aos 7 dias de estabelecimento *in vitro*. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

Com relação a contaminação bacteriana observou-se que o tratamento com tetraciclina reduziu a contaminação em aproximadamente 15% e a combinação de tetraciclina + carbendazim reduziu cerca de 28%. É possível também observar que a aplicação de carbendazim + tetraciclina, além de reduzir a contaminação bacteriana, também reduziu a contaminação fúngica em comparação com o controle e, de fundamental importância, não aumentou a oxidação dos explantes, o que é um fator determinante para o sucesso do estabelecimento *in vitro*. Apesar disso as variáveis analisadas, a comparação das médias dos resultados obtidos não apresentou diferenças significativas.

Em pitangueira, uma espécie também da família Myrtaceae, Lattuada (2010) utilizando o mesmo agente bactericida, a tetraciclina, porém numa concentração inferior ( $60 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e a combinação desta com o fungicida Benomyl<sup>®</sup> ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ ), obteve resultados positivos com o tratamento da planta matriz, onde nenhuma contaminação foi verificada. No entanto, ao contrário dos resultados observados neste experimento, o mesmo autor observou que os tratamentos com tetraciclina e tetraciclina + Benomyl<sup>®</sup> causaram um elevado porcentagem de oxidação, respectivamente, 75 e 85%.



Apesar dos tratamentos com agentes antimicrobianos controlarem aparentemente a contaminação por fungos e bactérias, houve baixa porcentagem de estabelecimento. A inibição do desenvolvimento de brotações pode ser devido a liberação de compostos fenólicos, comumente encontrados em grande quantidade em espécies da família Myrtaceae (FACHINELLO et al., 2005), os quais, em contato com o meio, são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o crescimento dos explantes (OLIVEIRA et al., 2007). Outra explicação plausível para o nulo ou baixo porcentagem de estabelecimento pode estar relacionada à presença de micro-organismos que, em geral, competem com os explantes, em espaço, carboidratos, nutrientes e outros compostos, podendo também liberar no meio substâncias tóxicas prejudiciais ao crescimento do material *in vitro* (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).



**Figura 7.** Porcentagem de contaminação fúngica, contaminação bacteriana, oxidação e estabelecimento *in vitro* de guaviroveira (*Campomanesia adamantium*) ao final de 28 dias, tratados com diferentes agentes antimicrobianos. Letras iguais não diferem estatisticamente no teste de Duncan a 5% de probabilidade. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2013.

## 6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a espécie *Campomanesia adamantium* apresenta elevada oxidação dos explantes, sendo que a imersão dos ramos em solução de ácido ascórbico é ineficiente para controlar essa característica.

A desinfestação por 5 minutos com hipoclorito de cálcio é mais eficiente no controle da contaminação bacteriana e oxidação, resultando em maior porcentagem de explantes estabelecidos.

Concentrações acima de  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de rifampicina no meio de cultura controlam eficientemente a contaminação por bactérias, no entanto, inibem completamente o estabelecimento *in vitro* de guaviroveira.

O tratamento com a combinação de carbendazim ( $1,8 \text{ g.L}^{-1}$ ) + tetraciclina ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ) aparentemente diminui a contaminação por bactérias e fungos, e em comparação com o controle, não aumentou a oxidação dos explantes de guaviroveira durante o estabelecimento *in vitro*.

Novos estudos são necessários para avaliar outros agentes antioxidantes e microbicidas.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T.; VIEIRA, R.F. Frutas **nativas do Cerrado: qualidade nutricional e sabor peculiar**, 2004. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./biotecnologia/index.html>. Acesso em: 12 fev. 2012.
- ALMEIDA, S.P. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. 188p.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2002. 16 p. (Documentos 58).
- AVIDOS, M.F.D.; FERREIRA, L. T. Frutos dos Cerrados - Preservação gera muitos frutos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.15, p.36-41, 2003. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio15/frutos.pdf>. Acesso em 05 fev. 2012.
- BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). **Global warming and other eco-myths**. p. 29-60. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA, 2002.
- CANHOTO, J.M. **Biotecnologia vegetal – da clonagem de plantas à transformação genética**. Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010. 407p.
- CARMONA, R.; REZENDE, L.P.; PARENTE, T.V. Extração química de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.16, n.1, p.31-33, 1994.
- CARNEIRO, M. de F.; SILVA, G.D da; XIMENES, P.A.; CARNEIRO, I.F.; BORGES, J.D. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n.1, p.29-35, 2000.
- COUTINHO, I.D.; COELHO, R.G.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N.K.; SILVA, J.R.; VILEGAS, M.W.; CARDOSO, C.A.L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, São Paulo, v. 33, n.4, p.53-60, 2008.
- DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.482 - 487, 2008.
- DOMINGOS, D.C.C. Alternativas de uso sustentável do bioma Cerrado através de práticas extrativistas e agro-extrativistas. **Revista Acadêmica Senac Minas**, n.4, p.5<sup>-14</sup>, 2008. Disponível em: <http://www3.mg.senac.br/Revistasenac/edicoes/edicao4.htm>. Acesso em: 04 fev. 2012.

EITEN, G. Delimitação do conceito de Cerrado. **Arquivos do Jardim Botânico**, Rio de Janeiro, v.21, p.125-134, 1977.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. (Eds.). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

FERREIRA, M. B. **Frutos comestíveis nativos do D.F.: gabiobas, pitangas e araçás**. Cerrado, Brasília, v. 4 n. 18, p. 11-16, 1972.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, 1998. 509p.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant Propagation: principles and practices**. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997, 770p.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Revista Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, n.1, 2005.

LATTUADA, D.S. Dissertação (Mestrado) **Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. Porto Alegre, 2010, 88p. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/24513/000747088.pdf?sequence=1>. Acesso em: 04 jul. 2012.

LEDO, A. da S.; SECA, G.S.V.; BARBOZA, S.B.S.C.; SILVA JUNIOR, J.F. da. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n.4, 2007.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.

LORENZI, H. 1998. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum. 352p.

MACHADO, A.A.; SILVA, J.G.C.; SILVEIRA JUNIOR, P.; CONCEIÇÃO, A.R. **Winstat-sistema de análise estatística para Windows**, 2005.

MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SANTOS, B.R.; SOARES, F.P.; NOGUEIRA, R.C. SILVA, A.A.N. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1668-1671, 2007.

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**, Brasília, v.28, n.3, p.141-150, 2006.

MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; DE SÁ JUNIOR, A.Q.; CARVALHO M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**.95, p.175-184, 2008.

OLIVEIRA, F.F.M.; SILVA, K.M.B. E; OLIVEIRA, G.F. de; DANTAS, I.M.; CAMACHO, R.G.V. Micropropagação de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.20, n.3, p.152-159, 2007.

PARTELLI, F.L.; TAKEUCHI, K.P.; NAVES, R.V.; CHAVES, L.J. Frutas do Cerrado: Alternativa sustentável. **A lavoura**, Rio de Janeiro, n.676, p.12-15, 2010. Disponível em: [http://www.sna.agr.br/artigos/676/ALAV676-art\\_frut.pdf](http://www.sna.agr.br/artigos/676/ALAV676-art_frut.pdf). Acesso em: 24 de jun. de 2011.

PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, A. G.; PEREIRA, A. R. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. IN: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.

PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; CAMPOS, K.P. de; SANTOS, E.C.; CAMPOS, R.J.C. de. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.71-76, 2002.

PORTO, A.C.; GULIAS, A.P.S.M. Gabiroba. In: VIEIRA, R.F.; COSTA, T. da S.A.; SILVA, D.B. da; FERREIRA, F.R.; SANO, S.M. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, 322p.

PREVEDELLO, J.A.; CARVALHO, C.J.B. de. Conservação do Cerrado Brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v.4, n.1, p.39-57, 2006.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M. de; SILVA, D.P.C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D. de O. Micropropagação de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2, p.293-296, 2006.

SCALON, S. de P. Q.; LIMA, A.A. de; SCALON FILHO, H.; VIEIRA, M. do C. Germinação de sementes e crescimento inicial de mudas de *Campomanesia adamantium* Camb.: efeito da lavagem, temperatura e de bioestimulantes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, vol.31, n.2, p.096-103, 2009.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

SCIAMARELLI, A. **Estudo florístico e fitossociologia da “Mata de dourados”, fazenda Paradoiro, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil**. Campinas, São Paulo: UNICAMP, 2005, 120p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SILVA, D.B. et al. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 179p.

SILVA, M.R.; LACERDA, D.B.C.L.; SANTOS, G.G.; MARTINS, D.M. de O. Caracterização química de frutos nativos do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, 2008.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba. FEALQ, 1998. 762p.

SOBRAL, M., PROENÇA, C., SOUZA, M., MAZINE, F., LUCAS, E. 2010. Myrtaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB010308>. Acesso em 12 mar. 2012.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C.; FERRI, J.; SOARES, G.C.; Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), **Revista Brasileira Agrociências**, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, 2007.

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J.R.S. Biotecnologia aplicada à produção de mudas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 3, n.19, 2001.

VALLILO, M.I.; LAMARDO, L.C.A.; GABERLOTTI, M.L.; OLIVEIRA, E. de; MORENO, P.R.H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p.805-810, 2006.

VIANNA, G.R.; COUTO, F.A.A.; OLIVEIRA, A.B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, Campinas, v.56 n.2, 1997.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T.S.; SILVA, D.B.; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil**. 1ªEd. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2006, v.1, 322 p.