

Multiplicação e alongamento *in vitro* de vinhático (*Plathymania reticulata*)*In vitro* multiplication and elongation of vinhatico (*Plathymania reticulata*)Luciana Coelho de Moura¹, Miranda Titon², Natane Amaral Miranda³,
Tamires Pinto Moreira⁴ e Marcio Leles Romarco de Oliveira⁵**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do tipo de explante e de reguladores de crescimento na multiplicação no alongamento *in vitro* de gemas axilares de vinhático. Segmentos cotiledonares e nodais foram e inoculados em meio WPM suplementado com combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA). Para implantação dos experimentos foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso (DIC) em esquema fatorial 2x3x2 (dois tipos de explantes, três concentrações de BAP e duas concentrações de ANA) com quatro repetições e seis explantes por repetição. A fase de multiplicação foi constituída pelo cultivo inicial e três subcultivos subsequentes (subcultivos 1, 2 e 3), sendo em cada um deles repetidos os procedimentos descritos anteriormente. Avaliou-se o número de gemas por explante. Na fase de alongamento foram montados dois experimentos. Gemas axilares foram inoculadas em meio WPM suplementado com combinações de ANA e BAP estabelecendo um DIC em esquema fatorial 3x3 (três concentrações de ANA e três concentrações de BAP) com cinco repetições e quatro explantes por repetição. Todos os procedimentos do experimento anterior foram repetidos, utilizando, dessa vez, concentrações de ácido giberélico (GA₃) estabelecendo um DIC com quatro repetições e seis explantes por repetição. Avaliou-se o comprimento do maior broto (cm) para ambos os experimentos. A multiplicação de gemas axilares de vinhático foi alcançada utilizando-se segmentos cotiledonares e a concentração de 0,6 mg.L⁻¹ de BAP adicionada ao meio de cultura. O cultivo inicial da fase de multiplicação foi superior aos subcultivos 1, 2 e 3, utilizando-se como material vegetal, plântulas recém germinadas. As combinações ANAxBAP e as concentrações de GA₃ adicionadas ao meio de cultura utilizadas nesse trabalho não foram eficientes no alongamento de brotos de vinhático.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, espécie nativa, propagação de plantas.

Abstract

The aim this study was to verify the effect of explant type and growth regulators on the *in vitro* multiplication and elongation of vinhático axillary bud. Cotyledon and nodal segments were inoculated in WPM supplemented with combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (ANA). We used a completely randomized design (DIC) in factorial scheme 2x3x2 (two types of explants, three BAP concentrations and two ANA concentrations) with four replications and six explants per replication. The multiplication phase was formed by an initial culture and three subsequent subcultures (subculture 1, 2 and 3), and in each replication using the procedures described previously. We evaluated the number of buds per explant. For the elongation phase two experiments were set up. Axillary buds were inoculated in WPM supplemented with ANA and BAP combinations establishing a DIC in factorial scheme 3x3 (three ANA concentrations and three BAP concentrations) with five replications and four explants per replication. All experimental procedures were repeated using concentrations of gibberellic acid (GA₃) established in a DIC with four replications and six explants each. We evaluated the length of the longest bud (cm) for both experiments. The multiplication of axillary buds of vinhático was achieved by using cotyledon segments and a concentration of 0,6 mg.L⁻¹ BAP added to the culture medium. The initial culture of the multiplication phase was superior to subcultures 1, 2 and 3, using newly germinated seedlings. The combinations and concentrations ANA x BAP and GA₃ added to the culture medium used in this work weren't efficient for the elongation of vinhático.

Keywords: Tissue culture, native species, plant propagation.

¹Engenheira Florestal – Mestranda em Ciência Florestal. UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – CEP: 39100-000 – Diamantina – MG – E-mail: lucianacm2005@yahoo.com.br

²Engenheira Florestal – Professora Dra. UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Engenharia Florestal – CEP: 39100-000 – Diamantina – MG – E-mail: titonmiranda@yahoo.com.br

³Graduando em Engenharia Florestal. UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Departamento de Engenharia Florestal – CEP: 39100-000 – Diamantina – MG – E-mail: natane.am@hotmail.com

⁴Graduando em Engenharia Florestal. UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha – E-mail: tamirespmoreira@hotmail.com

⁵Engenheiro Florestal. Professor Doutor. UFVJM – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Engenharia Florestal – CEP: 39100-000 – Diamantina – MG – E-mail: marcioromarco@gmail.com

INTRODUÇÃO

Plathymenia reticulata, vulgarmente conhecida como vinhático, é uma espécie arbórea originalmente brasileira pertencente à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae (LORENZI, 2002). É característica de formações abertas de cerrado e de sua transição para as florestas. Sua importância econômica é devida à madeira de alta qualidade e ao uso potencial em recuperação de áreas degradadas (BRAGA *et al.*, 2007). É utilizada ainda como planta medicinal e possui propriedades antiinflamatória e antimicrobiana (FERNANDES *et al.*, 2005).

A produção de mudas de vinhático é realizada principalmente via seminal, e a taxa de emergência é inferior a 20%. Isto ocorre devido à impermeabilidade do seu tegumento restringir a entrada de água e oxigênio, retardando o processo de emergência (SANTOS *et al.*, 2004). Porém, com a escarificação mecânica com lixa na extremidade arredondada das sementes, obtiveram-se taxa de germinação superior a 90% para sementes de vinhático (BRAGA *et al.* 2007).

A micropropagação representa uma alternativa para produção de mudas em situações onde há baixo percentual de emergência, quando a semente é insumo limitante, ou ainda quando há grande quantidade de sementes, sendo dispendiosa a escarificação. Além disso, técnicas de propagação vegetativa são importantes quando se deseja obter material vegetal geneticamente uniforme, adequado a processos industriais (OLIVEIRA *et al.*, 2003), ou ainda, geneticamente adaptado às condições ambientais específicas. Segundo Carvalho (2008), a propagação vegetativa de vinhático pode ser feita por microestacas medindo de 3 a 5 mm de comprimento.

Para o uso prático da micropropagação é necessário otimizar as condições de cultivo para cada espécie ou genótipo. Dentre os fatores que mais influenciam a maximização do potencial genotípico *in vitro*, estão os reguladores de crescimento, em especial as auxinas e as citocininas (ROGALSKI *et al.*, 2003).

Das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que proporciona, em geral, os melhores resultados na multiplicação *in vitro* de diversas espécies (SANTOS *et al.*, 2006), além de ser economicamente mais viável que outras fontes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; ROCHA *et al.*, 2009).

A auxina ácido naftalenoacético (ANA) e a giberelina ácido giberélico (GA₃), adicionadas ao

meio de cultura, podem promover o aumento do comprimento dos brotos, devido ao estímulo da divisão e alongamento das células (ROCHA *et al.*, 2009).

Este trabalho teve por objetivo verificar o efeito do tipo de explante e de reguladores de crescimento na multiplicação e no alongamento *in vitro* de gemas axilares de vinhático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estabelecimento das culturas assépticas

Frutos de vinhático foram coletados em matizes localizadas no Parque Estadual do Biribiri, município de Diamantina, MG em setembro/outubro de 2009. Após o beneficiamento, as sementes foram armazenadas em sacos de polietileno e mantidas em temperatura ambiente durante 10 meses. Para a germinação *in vitro*, as sementes foram inicialmente escarificadas com lixa d'água nº 20 e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 minutos. Foram utilizados frascos de cultivo (55 mm x 90 mm) contendo 40mL de meio de cultura constituído por sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar Merk. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8±0,01 e foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1atm. Foram inoculadas cinco sementes por frasco, os quais foram vedados com filme transparente de PVC e mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux e temperatura de 27° ± 2 até a ocorrência da germinação.

Multiplicação de gemas axilares

Das plântulas germinadas *in vitro* com aproximadamente 30 dias, isentas de qualquer contaminação por microorganismos, foram retirados os dois tipos de explantes (segmentos cotiledonares e segmentos nodais, com tamanho aproximado de 1cm). Para o cultivo inicial, os explantes foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio (25mm x 150mm) contendo 10 ml de meio de cultura básico previamente preparado e autoclavado. Utilizou-se o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) com 100% da concentração dos sais e vitaminas, suplementado com 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg.L⁻¹ de polivinilpirrolidona - PVP, 20 g.L⁻¹ de sacarose, 5 g L⁻¹ de ágar Merck, BAP e ANA em concentrações variando de acordo com os tratamentos e o

pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$. Foram utilizadas as concentrações de 0,1; 0,3 e 0,6 mg.L⁻¹ de BAP combinadas com 0,01 e 0,03 mg.L⁻¹ de ANA. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2x3x2 (dois tipos de explantes, três concentrações de BAP e duas concentrações de ANA) com quatro repetições e seis explantes por repetição. O experimento foi conduzido em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux e temperatura de $27^{\circ} \pm 2$.

A fase de multiplicação foi constituída pelo cultivo inicial e três subcultivos subseqüentes (subcultivos 1, 2 e 3), sendo em cada um deles repetidos os procedimentos descritos anteriormente. Para avaliar o efeito do tipo de explante (segmentos cotiledonares e segmentos nodais), respeitou-se o histórico do explante, ou seja, no subcultivo 1 foram usadas gemas axilares retiradas de segmentos nodais e de segmentos cotiledonares do cultivo inicial, e assim sucessivamente.

Aos 30 dias para o cultivo inicial e aos 40 dias para os subcultivos 1, 2 e 3, avaliou-se o número de gemas axilares por explante. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste Tukey de comparação de médias e análise de regressão linear, utilizando o software Statistica 10.0 (STATSOFT, 2010).

Alongamento de gemas axilares

Nesta etapa foram utilizados segmentos nodais obtidos a partir dos subcultivos da fase de multiplicação, provenientes do tratamento em que se utilizou a combinação de 0,6 mg.L⁻¹ de BAP e 0,03 mg.L⁻¹ de ANA. O meio de cultura básico utilizado foi semelhante ao descrito no experimento de multiplicação, porém com modificações referentes à adição dos reguladores de crescimento, conforme descrito nos experimentos 1 e 2.

Experimento 1: Foram utilizados explantes do subcultivo 2. Os tratamentos foram constituídos pelas combinações das concentrações de 0,1; 0,3 e 0,6 mg.L⁻¹ de ANA com 0,01; 0,03 e 0,06 mg.L⁻¹ de BAP que foram adicionadas ao meio de cultura básico. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial 3x3 (três concentrações de BAP e três concentrações de ANA), com cinco repetições e quatro explantes por repetição. Considerou-se um frasco de cultivo contendo 40 mL de meio de cultura com quatro explantes como repetição. Após a inoculação, os frascos com os explantes foram mantidos em sala de cultura durante 90 dias.

Experimento 2: Foram utilizados explantes do subcultivo 3. Os tratamentos utilizados foram as concentrações de 0, 4, 8, 12 e 16 mg.L⁻¹ de ácido geberélico (GA₃), que foram adicionados ao meio de cultura básico. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso com quatro repetições e seis explantes por repetição. Considerou-se para a repetição seis tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura e um explante cada. O experimento foi mantido em sala de cultura por um período de 90 dias.

O comprimento do maior broto (cm) foi avaliado nos dois experimentos aos 60 e aos 90 dias de alongamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise descritiva, com o auxílio do software Statistica 10.0 (STATSOFT, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Multiplicação de gemas axilares

Com relação ao número médio de gemas por explante, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) para a interação tipo de explante x concentrações de ANA no cultivo inicial e no subcultivo 3; para o tipo de explante no cultivo inicial e subcultivos 1 e 2; e para as concentrações de BAP nos subcultivos 1, 2 e 3 (Tabela 1). É comum observar, nesse tipo de experimento, coeficientes de variação experimental um pouco mais altos, já que os explantes foram retirados de plântulas recém germinadas e com grande variação genética, concordando com Santos *et al.* (2006), que encontraram coeficientes de variação experimental de até 76% para o número de gemas em brotos de pequi.

No desdobramento da interação tipo de explante x concentrações de ANA, o número de gemas axilares por explante obtido com a utilização de segmento cotiledonar foi estatisticamente superior ao segmento nodal na concentração 0,01 mg.L⁻¹ de ANA do cultivo inicial e do subcultivo 3 (Tabela 2). A concentração 0,01 mg.L⁻¹ foi superior à 0,03 mg.L⁻¹ de ANA para o segmento cotiledonar do subcultivo 3 para essa mesma característica. Considerando o efeito do explante isoladamente nos subcultivos 1 e 2, o segmento cotiledonar foi novamente superior ao segmento nodal.

De acordo com Ferri *et al.* (1981), a habilidade de emissão de brotos em segmentos cotiledonares é devida à maior juvenilidade desse tipo de explante, já que o cotilédone é uma

Tabela 1. Resultados da análise de variância referente ao número médio de gemas por explante de vinhático no cultivo inicial e nos subcultivos 1, 2 e 3 em função do tipo de explante e das concentrações de ANA e BAP.
Table 1. Results of analysis of variance for the mean number of buds per explant of vinhático initial culture and subcultures 1, 2 and 3 combined with types of explants and concentrations of ANA and BAP.

FV	GL	Quadrados Médios			
		Cultivo Inicial	Subcultivo 1	Subcultivo 2	Subcultivo 3
Explante (EXP)	1	96.29**	27.15**	10.80**	1.25 ^{ns}
ANA	1	0.02 ^{ns}	1.40 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.54 ^{ns}
BAP	2	12.97 ^{ns}	14.09**	12.53**	15.16**
EXP*ANA	1	31.66*	1.84 ^{ns}	1.80 ^{ns}	10.74*
EXP*BAP	2	8.14 ^{ns}	1.46 ^{ns}	0.57 ^{ns}	0.09 ^{ns}
ANA*BAP	2	0.27 ^{ns}	1.72 ^{ns}	0.31 ^{ns}	2.34 ^{ns}
EXP*ANA*BAP	2	6.06 ^{ns}	2.09 ^{ns}	0.49 ^{ns}	1.82 ^{ns}
Resíduo	36	5.62	0.69	0.76	1.76
Média Geral		5.62	1.79	1.43	2.09
CVexp (%)		42.18	46.41	60.96	63.48

* e ** = significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ^{ns} = não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F; FV = fonte de variação; GL = graus de liberdade; CVexp = coeficiente de variação experimental.

estrutura embrionária formada por meristema, tecido não diferenciado, capaz de multiplicar-se por divisão celular e formar outros tecidos. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2010), onde o segmento cotiledonar apresentou a maior capacidade de regeneração em relação ao segmento nodal em explantes de *Erythrina velutina*.

Tabela 2. Número médio de gemas por explante de vinhático em função da interação explante x ANA e dos tipos de explante para o cultivo inicial e os subcultivos 1, 2 e 3.

Table 2. Mean number of buds per vinhático explant related to the interaction explant vs. ANA and types of explant for initial culture and subcultures 1, 2 and 3.

		ANA (mg.L ⁻¹)	
		0,01	0,03
Cultivo Inicial			
Explante	Seg. Cotiledonares	7.8 Aa	6.2 Aa
	Seg. Nodais	3.4 Ab	5.0 Aa
Subcultivo 1			
Explante	Seg. Cotiledonares	2.5 a	
	Seg. Nodais	1.0 b	
Subcultivo 2			
Explante	Seg. Cotiledonares	1.9 a	
	Seg. Nodais	1.0 b	
Subcultivo 3			
Explante	Seg. Cotiledonares	2.8 Aa	1.7 Ba
	Seg. Nodais	1.6 Ab	2.3 Aa

Valores em uma mesma linha, seguidos por letras maiúsculas idênticas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores em uma mesma coluna, seguidos por letras minúsculas idênticas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação ao efeito do BAP isoladamente, para os subcultivos 1, 2 e 3 observou-se uma tendência crescente do número de gemas axilares por explante à medida que se aumentou a concentração do regulador de crescimento (Figura 1). Ribas et al. (2005) também observaram

a tendência de aumento no número médio de brotos de peroba-rosa, proporcional ao aumento na concentração de BAP utilizada. Cordeiro et al. (2004) observaram tendência de aumento linear no número de brotos produzidos por explante de paricá (*Schizolobium amazonicum*) à medida que aumentou a concentração de BAP.

O comportamento dos explantes nos subcultivos 1, 2 e 3 foram semelhantes entre si pelo teste de Identidade de Modelo (LEITE; OLIVEIRA, 2002) e o resultado da análise de regressão linear foi significativa a 5% de probabilidade (Figura 1). Resultados contrários foram observados por Ribas et al. (2005), em que o número de brotos de peroba-rosa aumentou com o número de subcultivos realizados.

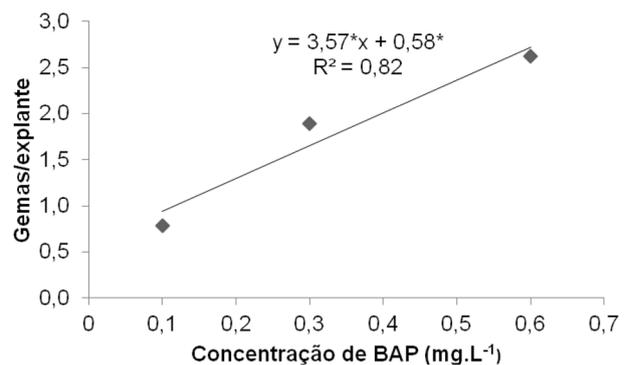


Figura 1. Número médio de gemas por explante de vinhático em função das concentrações de BAP para os subcultivos 1, 2 e 3.

Figure 1. Mean number of vinhático buds per explant combined with BAP concentrations of subcultures 1, 2 and 3.

O número médio de gemas por explante do cultivo inicial e dos subcultivos 1, 2 e 3 foram 5,62; 1,79; 1,43 e 2,09 respectivamente. No geral, a multiplicação ocorrida no cultivo inicial foi visivelmente superior em quantidade e qualidade de gemas axilares emitidas em relação

aos subcultivos subseqüentes (Figura 2), o que pode estar relacionado à maior juvenildade dos explantes nesse subcultivo, já que esses foram retirados de plântulas recém germinadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Soares *et al.* (2011), trabalhando com material vegetal juvenil de mangabeira (*Hancornia speciosa*), onde a taxa de multiplicação no cultivo inicial foi bastante superior aos três subcultivos subseqüentes.

Alongamento de gemas axilares

Experimento 1: Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos para a altura média do maior broto de vinhático aos 60 e aos 90 dias (Figura 3). No

geral, as combinações de BAP e ANA utilizadas não foram eficientes no alongamento de gemas axilares de vinhático, uma vez que a altura média dos brotos observada no experimento foi de 0,55 cm aos 60 dias e de 0,69 cm aos 90 dias. Esta altura foi considerada inadequada para realizar as etapas seguintes da micropropagação, que são o enraizamento dos brotos alongados e posteriormente a aclimação das plantas. Brotos com pequeno comprimento poderão apresentar baixo percentual de enraizamento se estes forem diretamente cultivados em meios de enraizamento, ou irão originar mudas de baixa qualidade para a fase de aclimação (ROCHA *et al.*, 2009; SILVA, 2004).

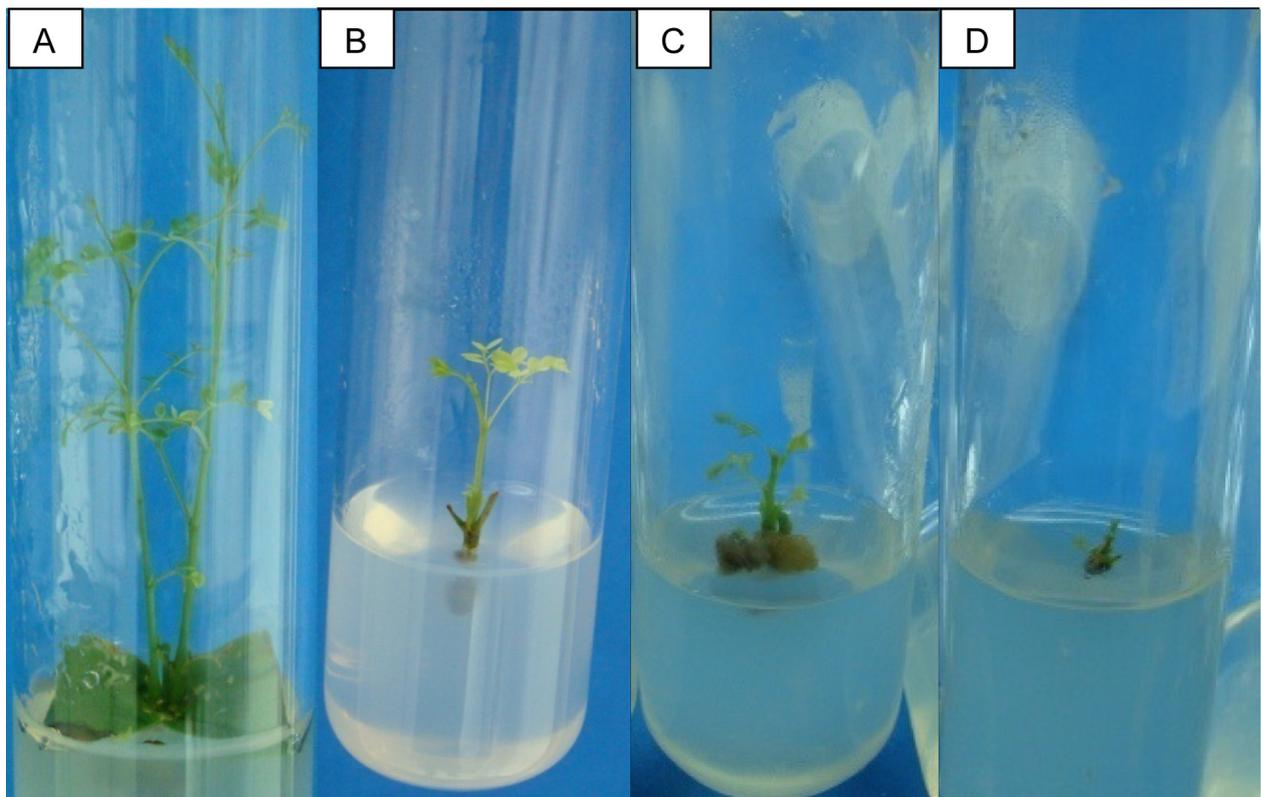


Figura 2. Multiplicação de explantes de vinhático em meio WPM suplementado com 0,1mg.L⁻¹ de BAP e 0,01 mg.L⁻¹ de ANA. A) segmento cotiledonar e B) segmento nodal, aos 30 dias no cultivo inicial; C) segmento cotiledonar e D) segmento nodal, ambos do subcultivo 3 e com 40 dias.

Figure 2. Multiplication of vinhático explants in WPM medium supplemented with 0,1mg.L⁻¹ BAP and 0,01 mg.L⁻¹ ANA. A) cotyledon segment and B) nodal segment, after 30 days of initial culture; C) cotyledon segment and D) nodal segment, both of subculture 3 and 40 days old.

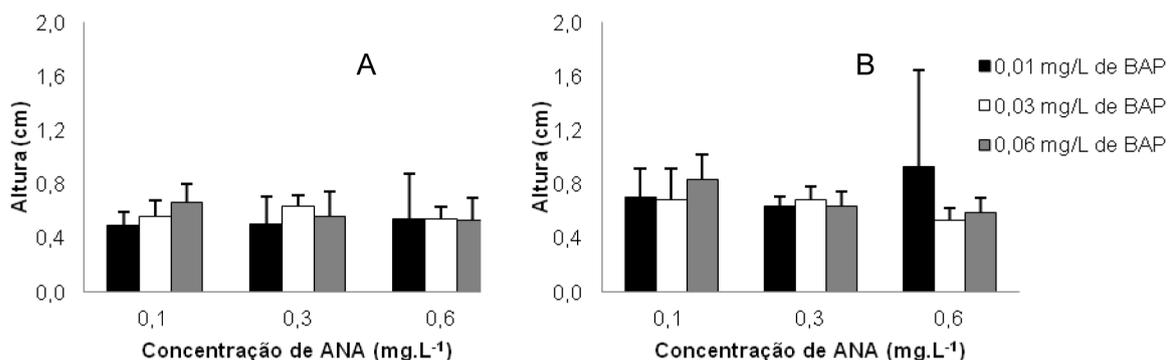


Figura 3. Altura média (cm) de brotos de vinhático em função das concentrações de ANA e BAP aos 60 (A) e aos 90 dias (B).

Figure 3. Average height (cm) of vinhático buds in different on the ANA and BAP concentrations at 60 and 90 days.

Experimento 2: Não foram observadas diferenças significativas para a altura média do maior broto aos 60 dias de alongamento em função das concentrações de ácido giberélico (GA_3). Novamente, o alongamento de gemas axilares de vinhático não foi alcançado de forma satisfatória, uma vez que a altura média dos brotos foi de 0,64 cm (Figura 4). Outros autores também não observaram efeito do GA_3 no alongamento *in vitro* em suas espécies de estudo, como Silva et al. (2011), trabalhando com *Solanum tuberosum*, e Villa et al. (2008), com amora-preta (*Rubus* spp.). Resultados diferentes a estes estudos foram encontrados por Rocha et al. (2009), onde se observou uma tendência linear crescente para o comprimento médio dos brotos de porta-enxertos de pessegueiro (*Prunus cerasifera*) com o aumento da concentração de GA_3 (0,0; 5,0; 10 e 15 mg.L⁻¹) sendo o maior comprimento (1,26 cm) obtido com 15 mg.L⁻¹ de GA_3 .

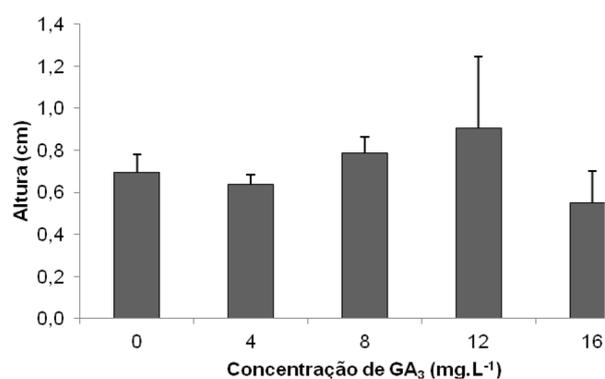


Figura 4. Altura média (cm) de brotos de vinhático em função das concentrações de GA_3 aos 60 e aos 90 dias.

Figure 4. Mean height (cm) of vine buds with different GA_3 concentrations at 60 and 90 days.

Em vista dos resultados não terem sido satisfatórios durante a fase de alongamento de brotos de vinhático, novas concentrações e reguladores de crescimento devem ser testados, a fim de dar continuidade ao processo da micropropagação da espécie.

CONCLUSÕES

- ✓ Explantes obtidos de segmentos cotiledonares de vinhático são indicados para a emissão de gemas axilares;
- ✓ Os melhores resultados para a multiplicação foram obtidos utilizando-se a concentração 0,6 mg.L⁻¹ de BAP adicionada ao meio de cultura;
- ✓ A proliferação de gemas axilares de vinhático diminuiu à medida que se aumentaram o nú-

mero de subcultivos, utilizando-se como material vegetal, plântulas recém germinadas;

- ✓ As combinações ANA e BAP e as concentrações de GA_3 adicionadas ao meio de cultura utilizadas nesse trabalho não promoveram o alongamento de brotos de vinhático.

AGRADECIMENTOS

Ao PROCAD/CAPES, FAPEMIG, IEF, SECTES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, L.L.; TOLENTINO, G.S.; SANTOS, M.R.; VELOSO, M.D.M; NUNES, Y.R.F. Germinação de Sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae) sob Influência do Tempo de Armazenamento. Nota Científica. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.258-260, 2007.

CARVALHO, P.E.R. *Espécies Arbóreas Brasileiras*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008. v.3, 627p.

CORDEIRO, I.M.C.C.C.; LAMEIRA, O.A; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F.Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). Nota Técnica. *Cerne*, Lavras, v.10, n.1, p.118-124, 2004.

COSTA, G.M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.5, p.1090-1096, 2010.

FERNANDES, T.T.; SANTOS, A.T.F.; PIMENTA, F.C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Revista de Patologia Tropical*, Goania, v.34, n.2, p.113-122, 2005.

FERRI, M.G.; MENEZES, N.L.; MONTEIRO, W.R. *Glossário ilustrado de botânica*. São Paulo: Nobel, 1981. 198p.

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 – CNPH, 1998. v.1, p.183–260.

LEITE, H.G; OLIVEIRA, F.H.T. Statistical procedure to test the identity of analytical methods. *Communication Soil Science Plant Analytical*, New York, v.33, v.1, p.7-8, 2002.

- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1981.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v.1, 384p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, A. J. B.; CARVALHO, V.M.; FERREIRA, A.; SATO, F.Y.; MACHADO, M.F.P.S. *In vitro* multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.4, p.421-425, 2003.
- RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (paroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.4, p.517-524, 2005.
- ROCHA, P.S.G.; SCHUCH, M.W.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Biosciense Journal**, Uberlândia, v.25, n.1, p.69-74, 2009.
- ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira “Santa Rosa”: efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.365-367, 2003.
- SANTOS, T.O.; MORAIS, T.G.O.; MATOS, V.P. Escarificação Mecânica em Sementes de Chichá (*Sterculia foetida* L.). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.1, p.1-6, 2004.
- SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.P.C; MARTINOTTO, C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Micropropagação de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2, p.293-296, 2006.
- SILVA, E.S.B. **Propagação *in vitro* de *Prunus* spp.** 2004, 115p. Tese (Doutorado em Fruticultura de clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.
- SILVA, E.C.; PINTO, C.A.; SOUZA-DIAS, J.A.C; ARAÚJO, T.H. Uso de reguladores de crescimento em brotos destacados de batata-semente. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.29, n.4, p.504-509, 2011.
- SOARES, F.P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; NERY, F.C.; VARGAS, D.P.; SILVA, D.R.G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Labras, v.35, n.1, p.152-157, 2011.
- STATSOFT. **Statistica (data analysis software system)**. Version 10. 2010. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F.A.; PIO, L.A.S.; ASSIS, G.A. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: Efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, Brasília, v.32, n.6, p.1754-1759, 2008.

Recebido em 03/02/2012

Aceito para publicação em 25/09/2012

