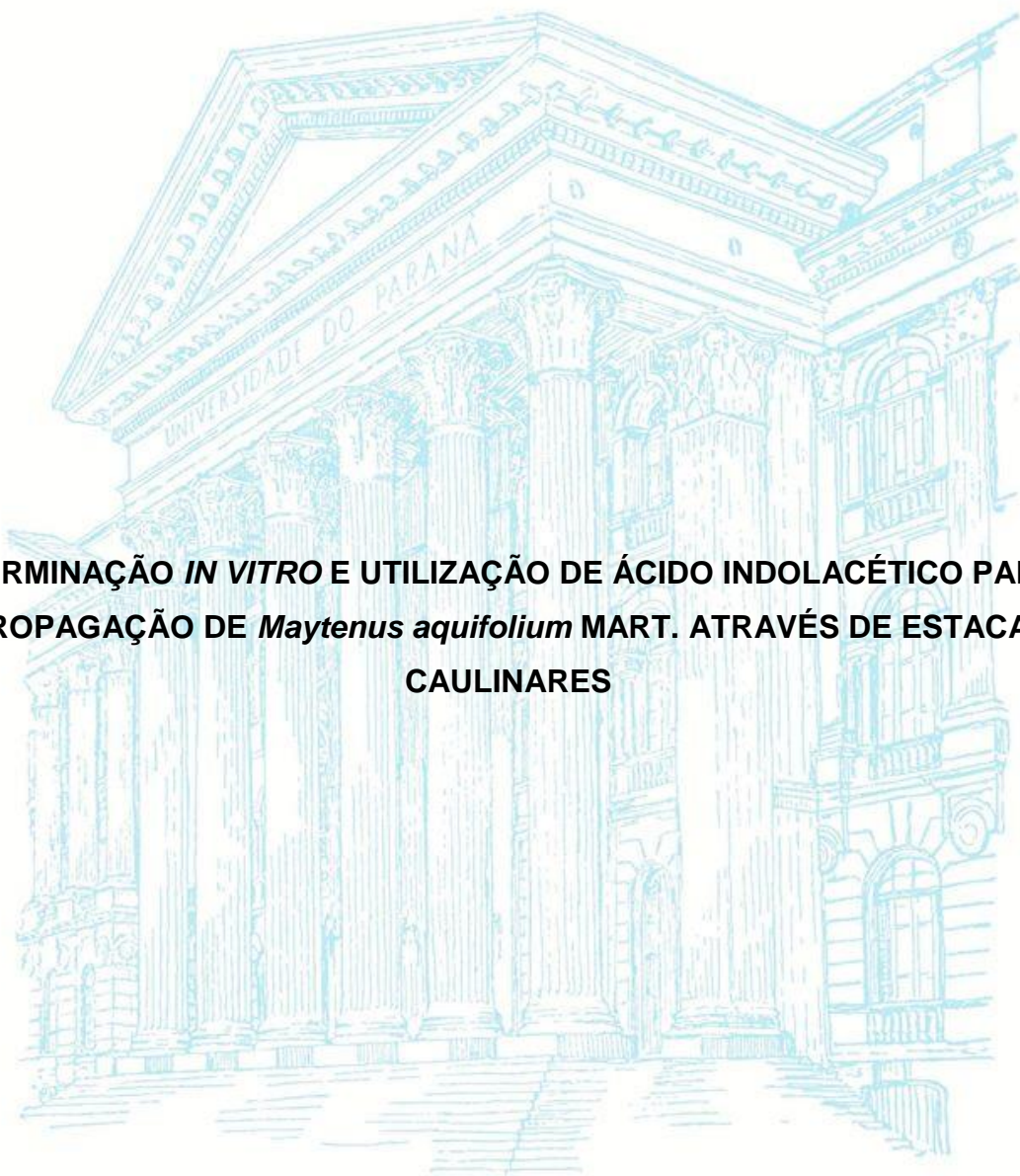


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KELLY HORING



**GERMINAÇÃO *IN VITRO* E UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO PARA
PROPAGAÇÃO DE *Maytenus aquifolium* MART. ATRAVÉS DE ESTACAS
CAULINARES**

PALOTINA

2016

KELLY HORING

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* E UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO PARA
PROPAGAÇÃO DE *Maytenus aquifolium* MART. ATRAVÉS DE ESTACAS
CAULINARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Agronomia da Universidade Federal do
Paraná como requisito à obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Suzana Stefanello
Coorientadora: Patricia da Costa Zonetti

PALOTINA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

KELLY HORING

**GERMINAÇÃO *IN VITRO* E UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO PARA
PROPAGAÇÃO DE *Maytenus aquifolium* MART. ATRAVÉS DE ESTACAS
CAULINARES**

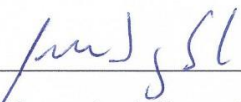
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da
Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo, pela seguinte banca examinadora:



Prof.^a Dra. Suzana Stefanello
Orientadora - Departamento de Biodiversidade da Universidade Federal do
Paraná, UFPR.



Prof.^a Dra. Patricia da Costa Zonetti
Coorientadora - Departamento de Ciências Agronômicas da Universidade
Federal do Paraná, UFPR.



Prof.^o, Dr. Alessandro Jefferson Sato
Departamento de Ciências Agronômicas da Universidade Federal do Paraná,
UFPR.

Palotina, 12 de dezembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente em minha vida, me abençoando e me guiando em todos os momentos.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, e a todos de alguma forma me ajudaram nessa longa jornada de vida acadêmica. Obrigada professores, técnicos e funcionários pelo suporte e aprendizado.

Aqui deixo minha eterna gratidão pela minha família e amigos. Pessoas muito especiais, que me auxiliaram nos momentos de dificuldade e que contribuíram para a realização de um grande sonho. Obrigada Ademar Ernesto Horing, Gilse Girardi Horing, Pedro Ernesto Horing, e a todos os amigos da graduação e da vida.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Suzana Stefanello e a minha Coorientadora Prof.^a Dra. Patricia da Costa Zonetti e ao meu prof. Dr. Alessandro Jefferson Sato e a todos os professores que estiveram presentes em minha graduação, gostaria de agradecer pelos ensinamentos, paciência, comprometimento e dedicação, pois sem vocês o meu sonho não se tornaria realidade.

Agradeço também aos integrantes do Programa de Extensão de Plantas Medicinais, por terem disponibilizado seus exemplares de espinheira-santa para a realização do meu experimento, meu muito obrigada.

Meu agradecimento em especial ao meu namorado Eduardo Lupatini Puttkammer, por toda a atenção e apoio em todos os momentos da minha vida e em especial pela realização deste trabalho.

RESUMO

Maytenus aquifolium Mart. (Celastraceae) é uma planta nativa do Brasil com propriedades terapêuticas, cujas folhas são utilizadas na prevenção e tratamento de gastrites e úlceras gástricas. A espécie é considerada de difícil enraizamento, o que dificulta o processo de propagação vegetativa. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinação e a assepsia de estacas para a propagação *in vitro*, bem como o enraizamento de estacas caulinares de *Maytenus aquifolium* submetidas a aplicação de Ácido indolacético (AIA) em condições *ex vitro*. Para o experimento via estaquia *ex vitro*, foram confeccionadas estacas herbáceas e lenhosas, com 12 cm de comprimento e base cortada em bisel, com presença e ausência do primeiro par de folhas, as quais foram imersas por 10 segundos em AIA nas seguintes concentrações: 0; 500; 1000; 2000; 3000 e 4000 mg L⁻¹. As estacas com ausência de folhas (lenhosas), foram acondicionadas em sacos plásticos contendo substrato comercial e as com presença de folhas (herbáceas) em copos plásticos contendo areia e vermiculita. O delineamento foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos distintos, com 10 repetições. Avaliou-se a porcentagem de estacas enraizadas, vivas com calos, vivas (sem raízes e sem calos) e mortas, após 153 dias. Para avaliar a possibilidade de propagação *in vitro*, foram utilizadas sementes obtidas de frutos avermelhados ainda fechados, que passaram pela assepsia e foram inoculados em meio de cultura MS com metade da concentração dos macronutrientes (MS/2) suplementado com diferentes concentrações de AIA (0, 0,5; 1 e 1,5 mg.L⁻¹), mantidas a 24 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas, sendo avaliado o percentual de germinação. Sementes obtidas de frutos abertos, que passaram pela secagem a temperatura ambiente por uma semana também foram inoculadas em meio de cultura MS/2 para acompanhamento da germinação. Diferentes combinações de substâncias para a assepsia de miniestacas com dois segmentos nodais também foram testadas após lavagem com água corrente e detergente. Em câmara de fluxo laminar as estacas foram submetidas a seis diferentes tratamentos de assepsia contendo combinações de álcool 70%, hipoclorito de sódio 2%, tetraciclina e dos fungicidas Derosal e Ridomil. Após a assepsia, as estacas foram inoculadas em frascos contendo meio de cultura MS/2. A unidade experimental constou de um frasco com 10 estacas e três repetições. Os frascos com as estacas foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 24 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas para acompanhamento do percentual de contaminação. No experimento via estaquia *ex vitro*, não houve enraizamento das estacas submetidas a nenhum dos tratamentos, tanto para as estacas herbáceas quanto para as lenhosas, sendo visualizada apenas a formação de calos, folhas e flores em poucas estacas. As combinações de compostos para a assepsia das estacas *in vitro* não foram eficientes e houve intensa proliferação de fungos visualizada a partir do terceiro dia, tornando inviável a propagação. Após 35 dias de semeadura *in vitro* ocorreu a germinação de 50% das sementes retiradas de frutos fechados inoculadas em meio de cultura MS/2.

Palavras-Chave: Auxina. Micropropagação. Estaquia. Planta medicinal.

ABSTRACT

Maytenus aquifolium Mart. (Celastraceae) is a plant native to Brazil with therapeutic properties, and its leaves are used in the prevention and treatment of gastritis and gastric ulcers. The species is considered of difficult rooting which hinders the process of vegetative propagation. The aim of this study was to evaluate the germination and the asepsis of cuttings for *in vitro* propagation, as well as the rooting of stem cuttings of *Maytenus aquifolium* submitted to the application of Indoleacetic acid (IAA) under *ex vitro* conditions. For the experiment via *ex vitro* cutting, herbaceous and woody cuttings with 12 cm in length and base cut in bevel were made, with presence and absence of the first pair of leaves, which were immersed for 10 seconds in IAA in the following concentrations: 0; 500; 1000; 2000; 3000 e 4000 mg L⁻¹. The cuttings with absence of leaves (woody) were packed in plastic bags containing commercial substrate and those with presence of leaves (herbaceous) were packed in plastic cups containing sand and vermiculite. The delimitation was a completely randomized with six distinct treatments, with 10 repetitions. The percentage of rooted cuttings, alive with calluses, alive (without roots and without calluses) and dead, after 153 days, was evaluated. To evaluate the possibility of *in vitro* propagation, seeds were obtained from reddish fruits still closed. They were submitted to asepsis and were inoculated in MS culture medium with half the macronutrients concentration (MS/2) supplemented with different concentrations of IAA (0, 0,5; 1 and 1.5 mg.L⁻¹), maintained at 24 ± 2° C and photoperiod of 16 hours, when the percentage of germination was evaluated. Seeds obtained from open fruits, which were dried at ambient temperature for one week, were also inoculated in MS/2 culture medium to monitoring of the germination. Different combinations of substances for the asepsis of mini-cuttings with two nodal segments were also tested after washing with running water and detergent. The cuttings were submitted to six different asepsis treatments in a laminar flow chamber containing combinations of 70% alcohol, 2% sodium hypochlorite, tetracycline and the fungicides Derosal and Ridomil. The cuttings were inoculated into flasks containing MS/2 culture medium, after the asepsis. The experimental unit consisted of a vial with 10 cuttings and 3 repetitions. The flasks with the cuttings were maintained in a room of growth with temperature of 24 ± 2° C and photoperiod of 16 hours to monitoring the percentage of contamination. For the experiment via *ex vitro* cutting, there was no rooting of the cuttings submitted to any of the treatments, either for herbaceous cuttings or for woody cuttings, and only the formation of calluses, leaves and flowers in a few cuttings was visualized. The combinations of compounds for the asepsis of the *in vitro* cuttings were not efficient and there was intense fungus proliferation visualized from the third day, making the propagation impracticable. Germination of 50% of the seeds taken from closed fruits inoculated in MS/2 culture medium occurred after 35 days of *in vitro* seeding.

Keywords: Auxin. Micropropagation. Cutting. Medicinal plant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 -	TRATAMENTOS EMPREGADOS NA ASSEPSIA DE ESTACAS DE <i>MAYTENUS AQUIFOLIUM</i>	12
TABELA 2 -	TRATAMENTOS EMPREGADOS NA ASSEPSIA DE ESTACAS DE <i>MAYTENUS AQUIFOLIUM</i>	13
FIGURA 1 -	ESTACAS DE ESPINHEIRA-SANTA COM PRESENÇA DE FLORES (A), CALO (B) E ESTACAS QUE NÃO ENRAIZARAM (C), APÓS 153 DIAS.....	16
TABELA 3 -	PERCENTUAL COMPARATIVO DE ESPINHEIRA-SANTA ENTRE OS TRATAMENTOS COM AIA	16
FIGURA 2 -	ESTACAS HERBÁCEAS DE ESPINHEIRA-SANTA COM FORMAÇÃO DE CALO NA PARTE SUPERIOR.....	18
FIGURA 3 -	ESTACAS DE ESPINHEIRA-SANTA MORTAS, APÓS 153 DIAS.....	18
FIGURA 4 -	CONTAMINAÇÃO COM FUNGOS NAS MINIESTACAS AOS PRIMEIROS 7 DIAS COM PRESENÇA DE FUNGOS, SEGUNDO OS TRATAMENTOS CORRESPONDENTES NA TABELA 1.....	20
FIGURA 5 -	PRESENÇA DE CONTAMINANTES NAS SEMENTES APÓS 7 DIAS DE IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO...	22
TABELA 4 -	PERCENTUAL DE CONTAMINANTES EM CADA TRATAMENTO.....	22
GRÁFICO 1 -	AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO A PARTIR DE 10 DIAS SOB EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE AIA (mg.L ⁻¹).....	23
GRÁFICO 2 -	PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO A PARTIR DE SEMENTES RETIRADAS DE FRUTOS FECHADOS AOS 35 DIAS.....	23
FIGURA 6 -	PRESENÇA DE CONTAMINANTES NAS SEMENTES APÓS 7 DIAS DE IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO.	24
GRÁFICO 3 -	COMPRIMENTO MÉDIO DE PARTE AÉREA (CM) APÓS 35 DIAS.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
3 METODOLOGIA	11
3.1 ESTAQUIA	11
3.1.1 Coleta das estacas	11
3.1.2 Preparação das estacas em laboratório	11
3.1.3 Acondicionamento das estacas herbáceas	11
3.1.4 Acondicionamento das estacas lenhosas	12
3.1.5 Variáveis analisadas	12
3.2 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE MINIESTACAS	12
3.2.1 Coleta das estacas para avaliação de assepsia	12
3.2.2 Experimento I	12
3.2.3 Experimento II	14
3.3 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE SEMENTES	15
3.3.1 Ensaio de germinação em <i>in vitro</i>	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 ESTAQUIA A PARTIR DE ESTACAS HERBÁCEAS	17
4.2 ESTAQUIA A PARTIR DE ESTACAS LENHOSAS	19
4.3 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE MINIESTACAS	20
4.4 GERMINAÇÃO DE SEMENTES EM <i>IN VITRO</i>	22
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Popularmente conhecida como espinheira-santa, *Maytenus aquifolium* Mart., pertencente à família Celastraceae ocorre principalmente na região Sul do Brasil. Apresenta pequeno porte, cresce aproximadamente 5 metros de altura (LORENZI; MATOS, 2008). Seus frutos são de coloração avermelhada e contém de uma a quatro sementes (MARIOT *et al.*, 2005).

A espinheira-santa possui reconhecida ação terapêutica no tratamento de problemas estomacais, tais como gastrites e úlceras (CORRÊA, 1984; MARTINS *et al.*, 1994; LORENZI; MATOS, 2008). O Ministério da Saúde inclui a espécie na lista de medicamentos fitoterápicos distribuídos para a população através do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2007).

A propagação da espinheira-santa pode ocorrer sexuadamente, via sementes ou assexuadamente, por rebentos das raízes, micropropagação ou estacas caulinares. A propagação via sementes apresenta grande variabilidade quanto a teor de metabólitos e a morfologia, sendo assim não existe garantia de uniformidade do material propagado (LIMA *et al.*, 2009). A emergência das sementes não é uniforme, varia de 23 dias a seis meses (SILVA; FONSECA; SILVA, 2014). A espécie possui difícil enraizamento (ALVES, 2015), por isto estudos que visem elucidar pontos sobre a propagação vegetativa através de estacas caulinares *ex vitro* ou *in vitro* são importantes para a produção de material homogêneo em quantidade e com qualidade.

A propagação vegetativa é uma técnica cada vez mais utilizada principalmente por sua eficiência em manter os ganhos genéticos obtidos pelos programas de melhoramento. Esta técnica consiste em multiplicar partes de plantas, e gerar indivíduos idênticos a planta-mãe. A estaquia ou multiplicação por estacas é uma técnica de propagação vegetativa que consiste em promover o enraizamento de partes da planta (ramos, raízes e folhas) (FERRARI, 2004). Diferentes fatores podem influenciar na propagação de plantas através de estacas caulinares: o tipo de estaca, a época de coleta das mesmas, o tratamento com auxinas dentre outros.

As auxinas são hormônios vegetais que promovem o enraizamento, sendo seu principal efeito a iniciação dos primórdios radiciais (LIMA *et al.*, 2009). Quando a auxina é aplicada em segmentos do caule, o seu acúmulo causa uma dilatação ou calo, com muitas células formando novos centros meristemáticos ou ativando meristemas já existentes que induz a formação de raízes.

Lima *et al.* (2008) constataram que estacas semilenhosas e herbáceas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) não responderam a aplicação da auxina ANA (Ácido naftaleno acético) e AIB (Ácido indolbutírico). Recentemente, Alves (2015) relatou que não há diferença quanto ao tipo de estaca para a propagação vegetativa de espinheira-santa e que o longo tempo de imersão em altas concentrações de auxina AIB foi prejudicial e tóxico as mesmas.

A utilização de outras auxinas na propagação da espinheira-santa podem ser uma alternativa na produção de mudas a partir de estacas. O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina sintetizada naturalmente pelas plantas, capaz de atuar na expansão e no alongamento celular, auxiliando também na divisão celular em culturas de tecidos (KERBAUY, 2008). A micropropagação também chamada de cultura *in vitro* possibilita a propagação de plantas em ambientes controlados de nutrição, assepsia e fatores ambientais como luz, temperatura, CO₂ e O₂. É uma prática viável para propagação clonal de diversas espécies, no entanto, uma dificuldade para o estabelecimento do cultivo de espécies lenhosas *in vitro* é obter tecidos livres de contaminação provocadas por bactérias e fungos e ainda a oxidação provocada por compostos fenólicos. A prática de desinfestação dos segmentos nodais é primeira etapa a ser realizada para o sucesso do estabelecimento *in vitro* (MALYSZ *et al.*, 2011).

A obtenção de explantes livres de contaminações é uma das etapas críticas em um protocolo de micropropagação. Para isso, os explantes são expostos a diferentes agentes antimicrobianos em tempos variáveis para eliminar os microrganismos. A presença de fungos e bactérias compromete a composição química no meio de cultura, tanto por liberação de compostos pelos microrganismos quanto pelo consumo de nutrientes do meio de cultura. Substâncias comumente utilizadas no processo de desinfestação são o hipoclorito de sódio e o etanol, além de detergentes e antibióticos que aumentam a eficácia da assepsia (SOUZA *et al.*, 2014), bem como o emprego de fungicidas (CORDEIRO *et al.*, 2014).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a germinação de sementes e o processo de assepsia de estacas para a propagação *in vitro*, bem como o enraizamento de estacas caulinares de *Maytenus aquifolium* submetidas a aplicação de ácido indolacético (AIA) em condições *ex vitro*.

3 METODOLOGIA

3.1 ESTAQUIA

3.1.1 Coleta das estacas

As estacas foram coletadas de matrizes presentes em Palotina (PR), (Latitude: 24° 17' 02" e Longitude: 53° 50' 24", com uma altitude de 333 m). Foi observado o estado fisiológico em que a planta matriz encontrava-se, sendo realizada a coleta no mês de junho de 2016. Foram selecionados ramos herbáceos e lenhosos e logo após a coleta, as estacas permaneceram em ambiente fresco e sombreado, para evitar a desidratação, sendo que no mesmo dia elas foram seccionadas e utilizadas na instalação do experimento de estaquia.

3.1.2 Preparação das estacas em Laboratório

O seccionamento das estacas herbáceas foi em forma de bisel na base e reto no ápice, de modo que cada estaca tivesse entre 10 e 12 cm de comprimento, mantendo-se duas folhas superiores mediante o corte da metade das mesmas. O mesmo procedimento foi realizado com as estacas lenhosas sem a presença de folhas na parte superior das estacas.

A base das estacas herbáceas e lenhosas foi imersa por 10 segundos em solução de AIA nas concentrações: 0, 500, 1000, 2000, 3000 e 4000 mg L⁻¹. O AIA (C₁₀H₉NO₂) foi diluído com o auxílio de álcool etílico (C₂H₆O) e feita a adição de água destilada até atingir 1 litro. Em seguida, foi realizada a diluição até as concentrações desejadas.

3.1.3 Acondicionamento das estacas herbáceas

As estacas herbáceas foram distribuídas em copos descartáveis de 300 mL, contendo areia e vermiculita, perfurados ao fundo. O material foi mantido em casa de vegetação na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina com irrigação por 15 minutos ao dia.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 10 estacas para cada tratamento, totalizando 60 estacas contendo o primeiro par de folhas e 60 estacas sem presença de folhas. O experimento permaneceu na casa de vegetação para acompanhamento por 153 dias para posterior avaliação.

3.1.4 Acondicionamento das estacas lenhosas

As estacas lenhosas foram distribuídas em sacos para mudas nas dimensões de 9 x 16 cm, contendo substrato comercial HUMUSFÉRTIL e mantidas em casa de vegetação na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina com irrigação por 15 minutos ao dia.

3.1.5 Variáveis analisadas

Os parâmetros avaliados para ambos os tipos de estacas foram: percentual de estacas vivas (sem raízes e sem calos), vivas com calos e enraizadas.

3.2 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE MINIESTACAS

3.2.1 Coleta das estacas para avaliação de assepsia

As estacas caulinares com 20 cm (contendo a gema apical e segmentos nodais) foram coletadas de matrizes provenientes de Palotina, Paraná no mês de junho de 2016 e levadas para o Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal da UFPR, Setor Palotina e utilizadas para a instalação de experimentos de micropropagação. A coleta foi realizada no período da manhã, no mesmo dia da instalação dos experimentos e os ramos foram acondicionados em sacos plásticos para evitar possível desidratação.

3.2.2 Experimento I

Após a coleta, as estacas com as folhas foram submetidas à lavagem superficial com detergente líquido e água corrente, com auxílio de uma escova de dente de cerdas macias. Após a lavagem foi realizada a retirada das folhas e o

seccionamento das miniestacas mantendo a gema apical e os dois segmentos nodais seguintes. Em seguida, as estacas foram mantidas em câmara de fluxo laminar. As miniestacas foram submetidas a tratamentos de assepsia contendo diferentes combinações de álcool 70%, hipoclorito de sódio 2%, tetraciclina (antibiótico) e dos fungicidas Derosal e Ridomil conforme especificado na (TABELA 1). As miniestacas permaneceram sob agitação quando submetidas ao hipoclorito de sódio 2%. Em seguida, foi realizada a tríplice lavagem do material com água destilada e autoclavada.

TABELA 1 - TRATAMENTOS EMPREGADOS NA ASSEPSIA DE ESTACAS DE *MAYTENUS AQUIFOLIUM*

Tratamentos	Composição	Tempo (minutos)
1	Álcool (70%)	2
	Hipoclorito de sódio (2%)	20
2	Tetraciclina (500 mg)	20
	Derosal (0,07%)	20
	Álcool (70%)	2
	Hipoclorito de sódio (2%)	20
3	Tetraciclina (500 mg)	20
	Derosal (0,14%)	20
	Álcool (70%)	2
	Hipoclorito de sódio (2%)	20
4	Tetraciclina (500 mg)	20
	Ridomil Gold (0,07%)	20
	Álcool (70%)	2
	Hipoclorito de sódio (2%)	20
5	Tetraciclina (500 mg)	20
	Ridomil Gold (0,14%)	20
	Álcool (70%)	2
	Hipoclorito de sódio (2%)	20
6	Tetraciclina (500 mg)	20
	Ridomil (0,07%)+ Derosal (0,14%)	20
	Álcool (70%)	2
	Hipoclorito de sódio (2%)	20

FONTE: O autor (2016)

Após a assepsia, as miniestacas foram inoculadas em frascos (capacidade 500 mL), contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos de assepsia, contendo três repetições e tendo como unidade experimental um frasco com 10 estacas. Os frascos com as estacas foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

O acompanhamento para observação da contaminação e oxidação do explantes foi realizado diariamente por um período de 30 dias ou até o aparecimento de contaminação por fungos.

3.2.3 Experimento II

As estacas utilizadas neste experimento foram retiradas de uma planta matriz de espinheira-santa cultivada na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, na área experimental do programa de Extensão Plantas Medicinais. A planta foi pulverizada com o fungicida Derosal (0,3%) por duas vezes, em um intervalo de 15 dias antes da retirada das estacas.

Após realizada a coleta, estacas com as folhas foram submetidas à lavagem superficial com o auxílio do Tween 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆), onde foram adicionadas 2 gotas para um volume de 50 mL e realizado a lavagem com água corrente por 15 minutos. Após a lavagem foi realizada a retirada das folhas e o seccionamento das estacas para que as mesmas permanecessem com a gema apical e os dois segmentos nodais seguintes. Em seguida, as estacas foram utilizadas para a instalação do experimento de assepsia.

Em câmara de fluxo laminar as miniestacas foram submetidas a tratamentos de assepsia contendo diferentes combinações de álcool 70%, hipoclorito de sódio 2%, tetraciclina (antibiótico) e do fungicida Derosal, mediante agitação em todos os processos, conforme especificado na TABELA 2.

TABELA 2 - TRATAMENTOS EMPREGADOS NA ASSEPSIA DE ESTACAS DE *MAYTENUS AQUIFOLIUM*

Tratamentos	Composição	Tempo (minutos)
1	Tetraciclina (500 mg)	30
	Derosal (0,3%)	30
	Álcool (70%) + Tween (2 gotas)	3
	Hipoclorito de sódio (2%) + Tween (2 gotas)	30
2	Tetraciclina (500 mg)	30
	Derosal (0,3%)	30
	Álcool (70%) + Tween (2 gotas)	3
	Hipoclorito de sódio (4%) + Tween (2 gotas)	30

FONTE: O autor (2016)

Após a assepsia, as miniestacas foram inoculadas em frascos (capacidade 500 mL), contendo 50 mL de meio de cultura MS. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos de assepsia, contendo três repetições e tendo como unidade experimental um frasco com 10 estacas. Os frascos com as estacas foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 24 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas.

O acompanhamento para observação da contaminação e oxidação do explantes foi realizado diariamente por um período de 30 dias ou até o aparecimento de contaminação por fungos.

3.3 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE SEMENTES

3.3.1 Ensaio de germinação em *in vitro*

Os frutos de plantas matrizes cultivadas em Palotina foram coletados quando apresentavam coloração avermelhada e levados para o Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal da UFPR, Setor Palotina. Os mesmos passaram pelo processo de assepsia em câmara de fluxo laminar e suas sementes foram retiradas para instalação de ensaio de germinação. A assepsia dos frutos foi realizada com solução de álcool 70% por 7 minutos seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (2 a 2,5% de cloro ativo), acrescida de Tween 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆) (1 gota para 100 mL), durante 30 minutos. Logo após os frutos foram lavadas por cinco vezes em água destilada e autoclavada e mantidos imersos em água até a inoculação.

Parte dos frutos coletados permaneceu no laboratório, abrindo naturalmente e expondo o arilo. As sementes foram coletadas e permaneceram secando em temperatura ambiente por sete dias. As mesmas também foram utilizadas em ensaio de germinação e a assepsia foi similar aos frutos, modificando-se apenas o tempo em contato com o álcool que foi de 5 minutos e tempo de imersão no hipoclorito que foi de 15 minutos.

As sementes retiradas dos frutos foram inoculadas em frascos (capacidade 500 mL), contendo 50 mL de meio de cultura MS/2 suplementado com 0,5; 1 e 1,5 mg. L⁻¹ de AIA tendo como controle o meio de cultura sem suplementação com AIA, acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6,5 g.L⁻¹ de ágar, com pH foi ajustado para 5,8. O experimento foi inteiramente casualizado, contendo quatro tratamentos e oito repetições, sendo a unidade experimental um frasco com cinco sementes.

As sementes maduras foram inoculadas apenas em meio de cultura de cultura MS/2. A unidade experimental constou de um frasco com sete sementes e sete repetições.

O material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

Após 35 dias, foram avaliados o percentual de sementes germinadas e o comprimento da parte aérea (a partir da inserção dos cotilédones).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTAQUIA A PARTIR DE ESTACAS HERBÁCEAS

Verificou-se após 153 dias da implantação do experimento, que um percentual de 10% das estacas herbáceas que foram acondicionadas em recipientes contendo areia e vermiculita estavam vivas, com presença de folhas, flores e calos (FIGURA 1 e TABELA 3), sem, contudo ter sido observado o enraizamento das estacas submetidas a nenhum dos tratamentos.

FIGURA 1 – ESTACAS DE ESPINHEIRA-SANTA COM PRESENÇA DE FLORES (A), CALO (B) E ESTACAS QUE NÃO ENRAIZARAM (C), APÓS 153 DIAS



FONTE: O Autor (2016)

TABELA 3 – PERCENTUAL COMPARATIVO DE ESPINHEIRA-SANTA ENTRE OS TRATAMENTOS COM AIA

AIA mgL ⁻¹	% Estacas com Raízes	% Estacas com Calos	% Estacas vivas com 1 par de folhas
0	0	0	10
500	0	10	0
1000	0	10	0
2000	0	10	0
3000	0	10	20
4000	0	0	10

FONTE: O autor (2016)

A capacidade das estacas para emitir raízes ocorre em função de fatores endógenos e das condições ambientais fornecidas. Podem estar associadas à interação de origem fisiológica, como fatores internos até fatores externos da planta matriz e ou das estacas, o tipo de estaca (nível de lignificação), aplicação de reguladores vegetais (toxidez), época do ano, idade e potencial genético da planta

matriz, ausência de co-fatores de enraizamento, excesso de sintetização e desequilíbrio de hormônios (KERBAUY, 2008).

A propagação por estacas com um par de folhas, proporcionou uma maior percentagem de sobrevivência das mesmas. Pacheco e Franco (2008) relataram que a presença de folhas em estacas herbáceas influencia na quantidade de estacas sobreviventes, devido as folhas serem locais de síntese de auxina e carboidratos espera-se que a presença das folhas favoreça a sobrevivência e a formação de raízes que estão relacionadas à síntese de compostos fenólicos pela parte aérea.

Quando a auxina é aplicada em segmentos do caule, ocorre o transporte polar causando acúmulo na porção basal podendo levar a formação de um calo, de onde podem se originar raízes, embora a formação de calos não seja um pré-requisito para a formação de raízes (HARTMANN *et al.*, 2002). No presente trabalho, os calos formados nas estacas se encontraram na parte superior das mesmas (FIGURA 2). Segundo Hartmann (2002), o calo consiste em uma massa irregular de células parenquimatosas, que está presente na base da estaca quando a mesma se encontra em condições ambientais favoráveis para enraizamento e as primeiras raízes surgiriam dos calos, sendo a suposição que a formação do calo é essencial para o enraizamento. É possível inferir que a retirada das folhas de *M. aquifolium* possa ter induzido a proliferação de células na região das gemas axilares e posteriormente calos nas estacas.

FIGURA 2 – ESTACAS HERBÁCEAS DE ESPINHEIRA-SANTA COM FORMAÇÃO DE CALO NA PARTE SUPERIOR



FONTE: O autor (2016)

4.2 ESTAQUIA A PARTIR DE ESTACAS LENHOSAS

Após 153 dias de implantação do experimento as estacas lenhosas que se encontravam em meio contendo substrato comercial encontravam mortas (FIGURA 3), sem enraizamento para nenhum dos tratamentos, sendo que as estacas permaneceram vivas por aproximadamente 90 dias.

FIGURA 3 – ESTACAS DE ESPINHEIRA-SANTA MORTAS, APÓS 153 DIAS



FONTE: O Autor (2016)

Um dos fatores que mais interfere no processo de enraizamento é a idade do material a ser propagado. Quando as estacas são provenientes de plantas matrizes adultas fornecem material com maior dificuldade de enraizamento (HARTMANN *et al.*, 2002) Ferriani *et al.* (2008), demonstraram em sua pesquisa realizada com estacas de *Piptocarpha angustifolia* Dusén ex Malme a indicação da influência da anatomia do caule das estacas, com o enraizamento, devido a maturidade de tecidos mais velhos

especialmente em estacas de maior diâmetro, associado a presença de um anel esclerenquimatoso e ao aumento de substâncias inibidoras durante a dormência.

As estacas lenhosas utilizadas neste experimento foram coletadas no inverno. Segundo Lima (2008), no outono e inverno as matrizes de espinheira-santa não apresentam crescimento vegetativo ativo; sendo assim a coleta de ramos nestas estações resultou em estacas com tecidos lignificados, inadequados para a formação de raízes adventícias. A época do ano é relacionada com a presença de lenho, afetando a formação de raízes, principalmente em espécies de difícil enraizamento (DUTRA; KERSTEN; FACHINELLO, 2002). Lima *et al.* (2009) sugerem como alternativa a utilização de técnicas de rejuvenescimento com a produção de miniestacas. A época do ano ainda indica a presença de amido nas células do córtex, nas células do raio do xilema e nas células da medula, como descrito por Fachinello, Hoffmann e Nachtigal (2005), que demonstra que ramos mais lignificados (outono/inverno) mostram tendência a apresentar altos teores de carboidratos.

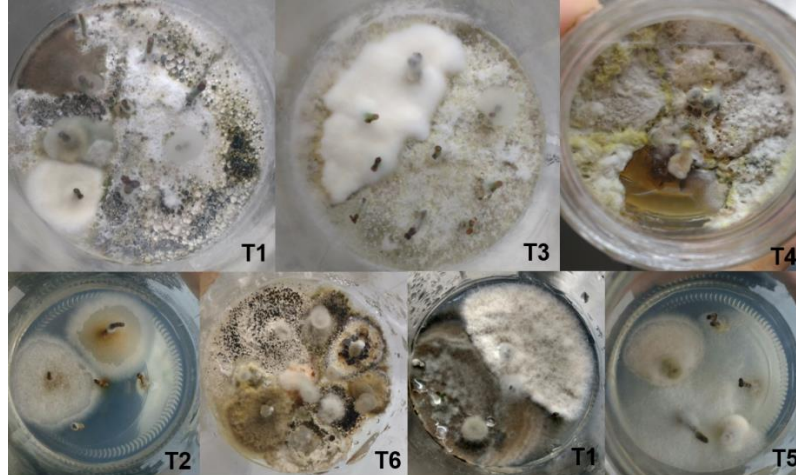
Os fatores hormonais endógenos também podem ter contribuído para que não ocorresse o enraizamento das estacas neste estudo. Hartmann *et al.* (2002), relataram que a formação de raízes em estacas, tem sua variação controlada por genes de forma direta ou indireta pela planta-matriz. Além disso, segundo Hartmann *et al.* (2002), estacas de espécies com altos níveis endógenos de citocininas têm mais dificuldades em enraizar do que aquelas com baixos níveis bem como, a inibição do processo de enraizamento pode ocorrer da estimulação do crescimento vegetativo a partir da síntese de giberelinas, o que compete com a formação de raízes.

Além da época de coleta, o tempo de imersão das estacas e a concentração da auxina utilizadas no presente trabalho podem ser ter interferido nos resultados. Alves (2015) em seu trabalho relatou que estacas apicais de *Maytenus aquifolium* Mart. e com características semilenhosas morreram quando submetidas ao tratamento (24 horas) com a concentração de AIB a 250, 500, 750, 1000 mg L⁻¹, indicando fitotoxicidade. De modo similar, em estudos de estaquia para porta-enxerto em videira Machado *et al.* (2005), relataram alto índice de mortalidade em estacas tratadas com 3.000 mg L⁻¹ em imersão rápida (10 segundos).

4.3 MICROPROPAGAÇÃO A PARTIR DE MINIESTACAS

As combinações de compostos para a assepsia das miniestacas *in vitro* não foram eficientes e houve intensa proliferação de fungos visualizada a partir do terceiro dia de implantação dos experimentos de micropropagação (FIGURA 4).

FIGURA 4 – CONTAMINAÇÃO COM FUNGOS NAS MINIESTACAS AOS PRIMEIROS 7 DIAS COM PRESENÇA DE FUNGOS, SEGUNDO OS TRATAMENTOS CORRESPONDENTES NA TABELA 1



FONTE: O autor (2016)

A incidência de contaminações pode estar relacionada com o protocolo de assepsia, bem como a falta de tratamento prévio das plantas doadoras das estacas em ambiente controlado, relatado em alguns trabalhos como o de Lattuada (2010), que utilizou plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação, submetidas a diferentes tratamentos fitossanitários (fungicidas e bactericidas) para posteriormente coleta dos explantes de pitangueira.

Rios *et al.* (2008), em pesquisa com bananeira utilizaram no processo de assepsia o fungicida Derosal (0,6%) e fenol 10% em agitação (10 minutos), e posteriormente os explantes foram mergulhados em peróxido de hidrogênio (10 segundos) e no antibiótico Sulfato de Estreptomicina (20 minutos). Houve uma redução dos índices de contaminações creditadas pela associação do fenol e peróxido de hidrogênio, que em contrapartida afetou o desempenho das plântulas. O fenol, possui a capacidade de alterar a permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, levando a perdas de substâncias intracelulares vitais, e o peróxido de hidrogênio, oxidando componentes vitais da célula o que influenciou em menores índices de contaminações no estabelecimento *in vitro* (PELCZAR *et al.*, 1996).

Outro fator determinante na presença de contaminantes é a concentração dos fungicidas utilizados como citado por Rios *et al.* (2008), que utilizou 0,6% do fungicida

Derosal em comparação com o presente trabalho que a máxima concentração utilizada foi de 0,3%.

O local em que a planta se encontra e os produtos aplicados bem como, o tempo e repetição de aplicação são fatores a se considerar. Lattuada (2010), utilizou matrizes de pitangueira mantidas em casa de vegetação, submetidas a pré-tratamentos com fungicida (Benomil 2g/L); bactericida (Tetraciclina 60 mg) e a associação do fungicida (Benomil 2g/L) mais bactericida (Tetraciclina 60 mg) antes da assepsia álcool 70%, hipoclorito de sódio 2% e tween 20. O referido autor relata que não houve manifestação de fungos no material vegetal, porém houve oxidação nos tratamentos com bactericida e a associação de bactericida e fungicida afetando até mesmo o meio de cultura.

Associado ao estudo de Lattuada (2010), o cultivo da espinheira-santa em casa de vegetação para a coleta de miniestacas, bem como os tratamentos com os específicos fitorreguladores ponderando oxidação (viabilidade) e contaminação das estacas e meio de cultivo são fatores a serem analisados e levados a continuidade de estudos aprofundados, além da propagação de plantas via sementes para a obtenção de miniestacas para acompanhamento da sua capacidade de enraizamento.

4.4 GERMINAÇÃO DE SEMENTES EM *IN VITRO*

O percentual médio de contaminação dos frutos fechados após sete dias de cultivo ficou em 21,3% (FIGURA 5 e TABELA 4).

FIGURA 5 – PRESENÇA DE CONTAMINANTES NAS SEMENTES APÓS 7 DIAS DE IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO



FONTE: O Autor (2016)

TABELA 4 – PERCENTUAL DE CONTAMINANTES EM CADA TRATAMENTO

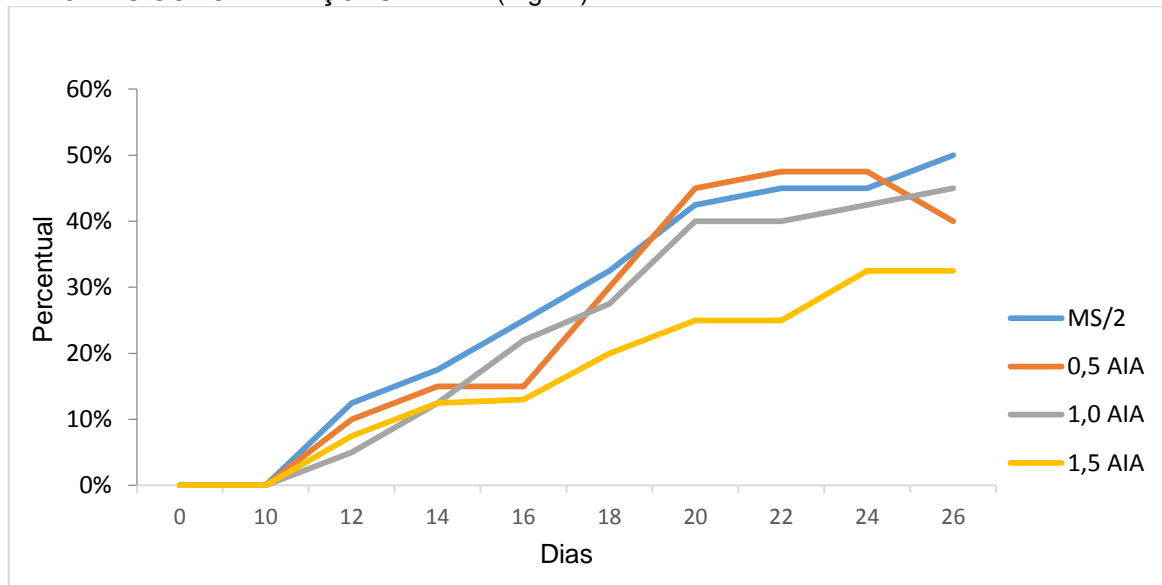
Tratamento	Percentual de contaminação
MS/2	37,7
0,5 mg.L ⁻¹	12,5
1,0 mg.L ⁻¹	12,5
1,5 mg.L ⁻¹	25,0
Média	21,3

FONTE: O Autor (2016)

A presença de contaminantes no meio de cultura está correlacionada com o tempo de imersão das sementes e a concentração do hipoclorito de sódio. Nascimento; Franco e Frassetto (2007), relataram em seu trabalho com sementes de angico, que a concentração 2,5 % de hipoclorito de sódio durante um período de 30 minutos proporcionou menores taxas de contaminação fúngica e/ou bacteriana e permitiu uma maior porcentagem de germinação.

Após o décimo dia de instalação do experimento, pode-se observar o início de germinação das sementes, considerando-se germinada a semente que apresentou protrusão da radícula. As avaliações foram realizadas a cada dois dias como apresentado no GRÁFICO 1.

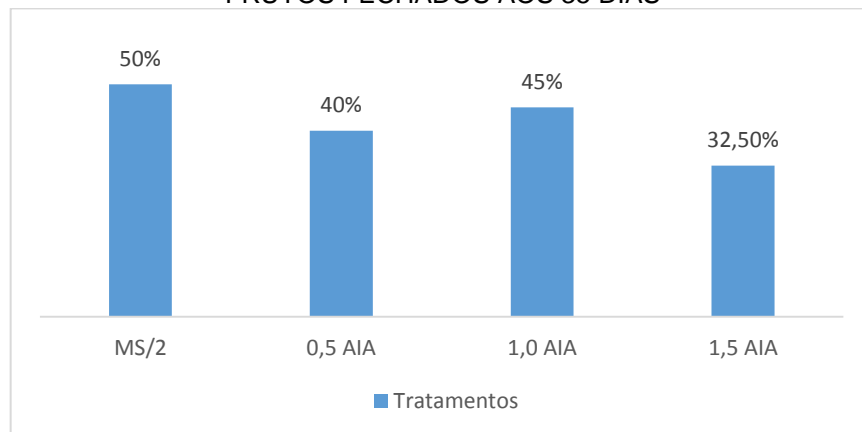
GRÁFICO 1 – AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO A PARTIR DE 10 DIAS SOB EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE AIA (mg.L^{-1})



FONTE: O Autor (2016)

Após 35 dias de cultivo, para cada tratamento pode-se observar uma variação no percentual de germinação sendo que os maiores valores médios foram obtidos em meio de cultura MS/2 (50%) e os menores em meio de cultura suplementado com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA (32,5%) com demonstrado no GRÁFICO 2. O aspecto geral das plântulas pode ser visualizado na FIGURA 6.

GRÁFICO 2 – PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO A PARTIR DE SEMENTES RETIRADAS DE FRUTOS FECHADOS AOS 35 DIAS



FONTE: O Autor (2016)

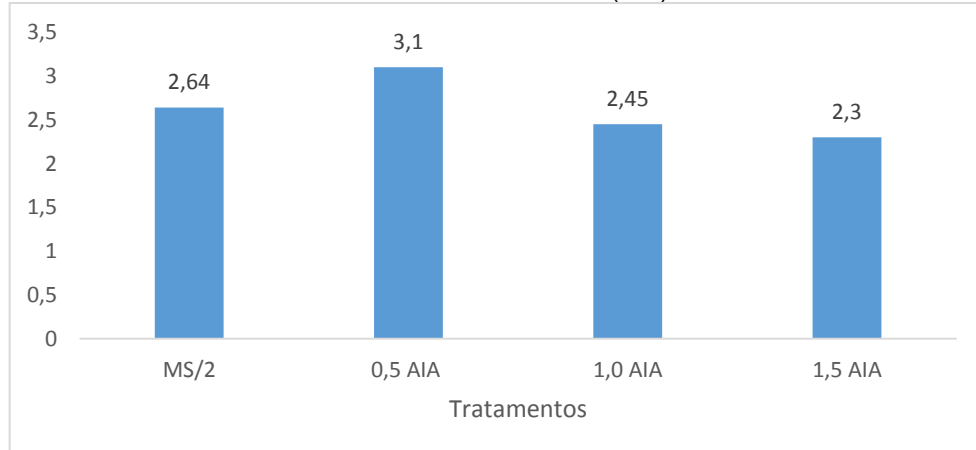
FIGURA 6 – GERMINAÇÃO DAS SEMENTES EM MEIO DE CULTURA MS/2 APÓS 35 DIAS, DE CULTIVO *IN VITRO*



FONTE: O Autor (2016)

Foi realizada a mensuração da altura da parte aérea das plântulas obtidas após a germinação e maior valor médio foi alcançado pelas plantas cultivadas em meio de cultura com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 – COMPRIMENTO MÉDIO DA PARTE AÉREA (CM) APÓS 35 DIAS



FONTE: O Autor (2016)

O início da germinação *in vitro* das sementes que foram coletadas e permaneceram secando em temperatura ambiente por sete dias ocorreu aos 27 dias após a sementeira e após 35 dias em meio de cultura MS/2 42,8% delas germinaram sem presença de contaminantes, indicando eficiência na assepsia das mesmas. Os resultados indicam que houve diminuição na taxa de germinação das sementes comparando-se com as sementes retiradas dos frutos maduros, porém fechados, mas não é possível afirmar se foi por perda de viabilidade ou pelo tratamento de assepsia das sementes onde se usou 5 minutos de imersão em álcool e quinze minutos em

solução pura de hipoclorito comercial (2 a 2,5% de cloro ativo). Kowalski *et al.* (2008), em seu estudo com espinheira-santa avaliaram o ponto de colheita dos frutos onde realizaram a coleta de frutos abertos (retirada do arilo e secagem das sementes por dois dias a sombra), com arilo e sementes expostas, bem como frutos fechados (secagem por 8 dias, até abertura dos mesmos). Os autores concluíram que o estágio de coleta dos frutos não influenciou na sobrevivência e porcentagem de germinação, sendo assim é possível a retirada das sementes de frutos abertos ou próximos da abertura.

Não foram encontrados estudos comparativos que avaliassem o efeito que a incorporação do AIA no meio de cultura apresenta sobre a germinação *in vitro*, contudo este trabalho evidenciou a viabilidade da germinação *in vitro* da espécie alcançando-se aos 35 dias, 50% de sementes germinadas (não foi avaliada a quantidade de plântulas estabelecidas) para posterior utilização em trabalhos futuros dos segmentos do caule, os quais serão fonte para a retirada de estacas e instalação de experimentos de enraizamento. A concentração de AIA utilizada na germinação poderá apresentar efeito no enraizamento de minestacas quando as mesmas forem seccionadas e transferidas para novo meio de cultura.

Os resultados obtidos com o ensaio de germinação permitem ainda fazer uma estimativa da quantidade de sementes necessárias para originar plântulas que servirão como matrizes *in vitro* para a micropropagação e viabilizar a produção de mudas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições que foram realizados os experimentos com espinheira-santa (*Maytenus aquifolium* Mart.), é possível concluir que:

1. Não ocorreu o enraizamento das estacas herbáceas e lenhosas coletadas no inverno, embora um pequeno percentual das herbáceas tenham permanecido vivas.

2. No cultivo *in vitro* de estacas, as substâncias utilizadas na assepsia não foram eficientes na eliminação da contaminação de estacas coletadas no campo, sugerindo a continuidade do trabalho com pré-tratamentos das plantas matrizes.

3. O percentual de germinação *in vitro* não foi elevado, contudo forneceu informações sobre a eficiência da assepsia e que permitiram estimar a quantidade de sementes necessárias para originar plântulas que servirão como matrizes *in vitro* para a micropropagação a partir de miniestacas e viabilização da produção de mudas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. F. **Tecnologias para produção de mudas de espinheira-santa: propagação vegetativa por estacas caulinares**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Horticultura)) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, Botucatu, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.237, de 24 de dezembro de 2007. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. **Diário Oficial da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 dez, 2007. Seção1, p.16. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm2007/prt3237_24_12_2007_comp.htm>. Acessado em: 14 nov. 2016.
- CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. Cultura de tecidos O que é isso?: Cultura de tecidos vegetais - uma ferramenta fundamental no estudo da biologia moderna de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 19, p.16-21, mar. 2001.
- CORDEIRO, G. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 42, n. 103, p. 337-344, set. 2014.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.
- DUTRA, L. F.; KERSTEN, E.; FACHINELLO, J. C. Época de coleta, ácido indolbutírico e triptofano no enraizamento de estacas de pessegueiro. **Revista Scientia Agrícola**, Pelotas, v. 59, n. 2, p. 327-333, abr/jun. 2002.
- FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2005. 221 p.
- FACHINELLO, J. C.; HOFFMAN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPEL, 1995. 178p.
- FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 22 p.
- FERRIANI, A. P.; MAYER, J. L. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; BONA, C.; KOEHLER, H. S.; DESCHAMPS, C.; CARPANEZZI, A. A.; OLIVEIRA, M. C. Estaquia e anatomia de vassourão-branco. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n. 2, p. 159-166, 2008.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. Ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

JUNIOR, P. C. P. F.; PEREIRA, J. E. S. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith – Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, jan.-março., 2012.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal** - Segunda edição expandida, revisada e atualizada. 2a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2008.

KOWALSKI, A. P. J.; SIGNOR D.; MACHADO, E. M.; BIASI L. A.; LIMA, D. M. Influência da qualidade da semente e do tipo de substrato na formação de mudas de espinheira-santa. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.1, p. 15-20, 2008.

LATTUADA, D. S. **Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LIMA, D. M. **Propagação vegetativa de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek)**. 182 f. Tese (Doutorado em ciências) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LIMA, D. M.; TANNO, G. N.; PURCINO, M.; BIASI, L. A.; RIBAS, K. C. Z.; ZANETTE, F. Enraizamento de miniestacas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 617-623, mar./abr., 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MACHADO, M. P.; MAYER, J. J. S.; RITTER, M.; BIASI, L. A. Ácido indolbutírico no enraizamento de estacas semilenhosas do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 476-479, 2005.

MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J. M. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Perspectiva**, Erechim. v.35, n. 131, p. 69-77, setembro/2011.

MARIOT, M.P.; BARBIERI, R. L.; SINIGAGLIA, C.; BENTO, L.H.; RIBEIRO, M.V. Presença do arilo na produção de mudas de *Maytenus ilicifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.468-470, 2005.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 220p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, [Rockville], v.15, p. 473-479, 1962.

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141 – 143, jul. 2007.

PACHECO, J. P.; FRANCO, E. T. H. Substratos e estacas com e sem folhas no enraizamento de *Luehea divaricata* Mart.. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.7, p. 1900-1906, out, 2008.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo. 1996, p. 210-228.

RIOS, S. A.; NIETSCHE, S.; PEREIRA, M. C. T.; XAVIER, A. A.; FERNANDES, T. P.; DIAS, M. M.; LIMA, C.; SANTOS, T. M. Protocolo de assepsia e comprimento de explantes de bananeira 'Prata anã' sobre a produção de mudas por micropropagação. **Revista Unimontes Científica**, Montes Claros, v.10, n.1/2, p. 47-52, jan./dez. 2008.

SILVA, A. F.; FONSECA, M. C. M.; SILVA, P. R. P. **Cultivo de plantas medicinais e usos terapêuticos**. EPAMIG. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.35, n.283, p.53-59, 2014.

SOUZA, A. V. V.; SANTOS, M. C.; SOUZA, M. D.; LARANJEIRA, L. R. **Protocolos de assepsia para o estabelecimento *in vitro* de espécies medicinais nativas da Caatinga**. Petrolina, PE: EMBRAPA, 2014. Comunicado Técnico.