



MAYARA CAROLINE CARVALHO PINTO

**CARACTERIZAÇÃO DE SEMENTES E
MICROPROPAGAÇÃO DE GUAPEVA [*Pouteria
torta* (Mart) Radek]**

LAVRAS - MG

2016

MAYARA CAROLINE CARVALHO PINTO

**CARACTERIZAÇÃO DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE
GUAPEVA [*Pouteria torta* (Mart) Radlk]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. PhD. Renato Paiva

Orientador

Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva

Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery

Coorientadores

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pinto, Mayara Caroline Carvalho.

Caracterização de sementes e micropropagação de guapeva
[*Pouteria torta* (Mart) Radlk] / Mayara Caroline Carvalho Pinto. –
Lavras : UFLA, 2016.

65 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Cerrado. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Planta medicinal. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MAYARA CAROLINE CARVALHO PINTO

**CARACTERIZAÇÃO DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE
GUAPEVA [*Pouteria torta* (Mart) Radlk]**

**SEEDS CHARACTERISTICS AND MICROPROPAGATION OF
GUAPEVA [*Pouteria torta* (Mart) Radek]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 16 de Junho de 2016.

Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery UFSJ

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho EMBRAPA

Prof. PhD. Renato Paiva
Orientador

Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva
Coorientador

LAVRAS-MG

2016

Ao meu namorado, Luiz, que sempre me apoiou e me ajudou, durante os dois anos de mestrado, nunca medindo esforços, sempre com muita paciência e dedicação.

Aos meus pais, Euza e Marcos, e à minha irmã, Gabriela, por estarem comigo em todos os momentos, proporcionando-me todo o amparo e sempre me incentivando.

Aos meus familiares, pela torcida constante.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Renato Paiva pela orientação e oportunidade a mim concedida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal/Agronomia, pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Luciano Coutinho Silva e à professora Dra. Fernanda Carlota Nery, pela coorientação, paciência e dedicação.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Renato Paiva, PhD; Profa. Dra. Fernanda Carlota Nery e Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho.

Aos funcionários técnico-administrativos do Setor de Fisiologia Vegetal, pela disponibilidade e simpatia constante.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela preciosa ajuda e ensinamentos.

Muito obrigada.

RESUMO

Pouteria torta (Mart) Radlk é uma frutífera do Cerrado, bioma ameaçado de extinção, com grande valor medicinal. Suas sementes são recalcitrantes, não podendo ser armazenadas, além disso, estudos para entender sua propagação *in vitro* e *ex vitro* são escassos. Com base no exposto, objetivou-se realizar a caracterização de suas sementes, assim como estabelecer um protocolo para a micropropagação da espécie. Para a caracterização das sementes, foram avaliados o teor de água, o peso de mil sementes, as características morfológicas e químicas, assim como a determinação da curva de embebição destas sementes. Para o estabelecimento *in vitro* a partir de sementes, o efeito da presença e ausência de luz foi avaliado, assim como o índice de velocidade de germinação (IVG). Na multiplicação *in vitro*, foi avaliado o efeito da adição da 6-benzilaminopurina (BAP), benziladenina (BA), thiadizuron (TDZ) (0; 0,25; 1; 4 e 16 μM) e, também, o uso de zeatina (0; 2,3; 4,6; 9,2; 18,4 e 36,8 μM) e floroglucinol (0, 80, 396 e 792 μM), separadamente, adicionados ao meio de cultura WPM. Para a rizogênese *in vitro*, foi verificado o efeito do ácido naftaloacético (ANA) e do ácido indolbutírico (AIB) (0, 1, 5 e 10 μM) e, para o enraizamento *ex vitro*, foi utilizado AIB (500, 1000 e 1500 μM). Os explantes, enraizados *in vitro* e *ex vitro* foram aclimatizados em tubetes contento Trosprato[®]. Os resultados demonstraram que as sementes apresentam 38,4% de teor de água, demonstrando comportamento recalcitrante. Determinou-se que mil sementes pesam 2,4kg, aproximadamente, apresentando amido como principal fonte de reserva. A área das sementes é de 2,5 cm², com diâmetro de 2,5 x 1,3 cm, aproximadamente. Durante a curva de embebição, a germinação iniciou-se, em torno do 22º dia, sem apresentar dormência física das sementes. A germinação *in vitro* iniciou no 9º dia. Os embriões apresentaram germinação independente da presença de luz, entretanto, evidenciou-se que a luz propicia um maior IVG. O uso de BAP, BA e TDZ induziu a formação de calo na base dos explantes, principalmente, na concentração de 1 μM . Todos os compostos utilizados na multiplicação *in vitro* induziram a formação, em média, de uma brotação por explante. Não houve formação de raiz em explantes enraizados *ex vitro*, com conseqüente morte dos explantes. O uso de 5 e 10 μM de AIB promoveu um maior enraizamento *in vitro*, e o AIB destacou-se para formação de um maior número de raiz por explante. Houve 90% de sucesso na aclimatização destes explantes.

Palavras-chave: Cerrado. Cultivo *in vitro*. Planta medicinal. Guapeva.

ABSTRACT

Pouteria torta (Mart) Radlk is a fruit plant of great medicinal value from the Cerrado biome. Its seeds are recalcitrant and cannot be stored. There are little studies regarding its *in vitro* and *ex vitro* propagation. Based on this, we aimed at characterizing their seeds and establish a protocol for the micropropagation of the species. To characterize the seeds, we evaluated water content, weight of one thousand seeds, morphological and chemical characteristics, and determined the imbibition curve. For the *in vitro* establishment, we evaluated the effect of the presence and absence of light and the germination speed index (GSI). For *in vitro* multiplication, we evaluated the effect of adding 6-benzylaminopurine (BAP), benzyladenine (BA) and thidiazuron (TDZ) (0, 0.25, 1, 4 and 16 μM). We also evaluated, separately, the use of zeatin (0, 2.3, 4.6, 9.2, 18.4 and 36.8 μM) and phloroglucinol (0, 80, 396 and 792 μM), added to the WPM culture medium. For *in vitro* root formation, we verified the effect of naphthaleneacetic acid (NAA) and indolbutyric acid (IBA) (0, 1, 5 and 10 μM). For *ex vitro* rooting, we used IBA (500, 100 and 1500 μM). The explants, rooted *in vitro* and *ex vitro*, were acclimatized in tubes containing Trosprato[®]. The results showed that the seeds presented 38.4% water content, showing recalcitrant behavior. We determined that one thousand seeds weighed, approximately, 2.4 Kg presenting starch as main source of reserve. Seed area was of 2.5 cm^2 , with, approximately, 2.5 x 1.3 cm diameter. Germination began around day 22, with no physical dormancy of the seeds. *In vitro* germination began at day 9. Embryo germination did not depend on the presence of light. However, we verified that light promotes higher GSI. The use of BAP, BA and TDZ induced callus formation of, approximately, one shoot per explant. There was no root formation in explants rooted *ex vitro*, with consequent death of the explants. The use of 5 and 10 μM IBA promoted higher *in vitro* rooting, and IBA was prominent in the formation of a higher number of roots per explant. The acclimatization of the explants was 90% successful.

Keywords: Cerrado. *In vitro* culture. Medicinal plant. Guapeva.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Árvore de *Pouteria torta* localizada no Município de Conceição do Pará-MG (A). Frutos inteiros de *Pouteria torta* (B) e seccionados (C). Barra=2m (A). Barra=1cm (B e C). 18
- Figura 2 - Raios X das sementes não acusando nenhum dano mecânico e mostrando que as sementes estão todas intactas. Barra= 1 cm.38
- Figura 3 - Incremento de matéria fresca referente à curva de embebição de sementes de *P. torta* com e sem o tegumento.40
- Figura 4 - Germinação *in vitro* de *P. torta*. Semente com tegumento antes da inoculação (A). Embrião após três dias de inoculação (B). Embrião após sete dias de inoculação (C). Embrião após nove dias de inoculação (D). Embrião após 15 dias de inoculação (E). Embrião com 25 dias após a inoculação (F). Explante com 40 dias *in vitro* (G). Barra= 1 cm.41
- Figura 5 - Índice de velocidade de germinação (IVG) de embriões de *P. torta* germinadas na presença e ausência de luz, *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Skott Knott ($p<0,05$).42
- Figura 6 - Formação de calo na base de explantes de *P. Torta* (A). Formação de calo nas diferentes concentrações de BAP, BA e TDZ (B). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, de acordo com o teste de Skott Knott ($p<0,05$). Barra= 1cm.45
- Figura 7 - Explantes de *P. torta* submetidos ao alongamento com GA₃. Da esquerda para a direita cada tubo representa os tratamentos: 0; 0,25; 1,0; 4,0 e 16 µM de GA₃. Barra= 1 cm.47

- Figura 8 - Corte transversal da porção verde (PV) do caule de *P. torta*, com ausência de lignina (A). Corte transversal da porção marrom (PM) do caule de *P. torta* (B). Barra = 100 μ m (A e B). Explante de *P. torta* após 45 dias da germinação *in vitro* (C). As setas indicam as regiões onde o caule foi seccionado. Barra= 1cm. (PM) Parênquima medular (PC) Parênquima (FV) Feixe Vascular (Ep) Epiderme....48
- Figura 9 - Média do número de raízes formadas ao utilizar-se AIB e ANA em explantes de *P. torta*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Skott Knott ($p < 0,05$).50
- Figura 10 - (A) Explante de *P. torta* enraizado *in vitro*. (B) Explantes enraizados *in vitro* após a aclimatização, com aproximadamente 3 meses. (C) Morte de todos os explantes enraizados *ex vitro* após 30 dias na casa de vegetação. Barras= 1 cm.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização química de sementes de <i>Pouteria torta</i>	36
Tabela 2 - Análises das características morfológicas de sementes de <i>P. torta</i> , mostrando os valores médios para área, circularidade, diâmetro e perímetro.....	39
Tabela 3 - Germinação <i>in vitro</i> de embriões de <i>P. torta</i> sob presença e ausência de luz, após 30 dias.....	42
Tabela 4 - Efeito da Zeatina na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>P. torta</i>	43
Tabela 5 - Efeito do floroglucinol na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>P. torta</i>	43
Tabela 6 - Efeito de diferentes citocininas em diferentes concentrações na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>P. torta</i>	44
Tabela 7 - Efeito de diferentes concentrações de GA ₃ o alongamento de explantos de <i>P. torta</i>	46
Tabela 8 - Enraizamento, <i>in vitro</i> , de <i>P. torta</i>	50
Tabela 9 - Média do tamanho de raiz de <i>P. torta</i>	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk	17
2.2	Caracterização de sementes	19
2.3	Micropropagação.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Caracterização de sementes	27
3.1.1	Peso de mil sementes e teor de água.....	27
3.1.2	Caracterização bioquímica	28
3.1.3	Curva de embebição	28
3.1.4	Análises morfológicas	29
3.2	Micropropagação	29
3.2.1	Germinação <i>in vitro</i>	30
3.2.2	Multiplicação.....	31
3.2.3	Alongamento	31
3.2.4	Rizogênese e aclimatização	32
3.3	Delineamento experimental e análise estatística.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro apresenta flora bastante diversa e é classificado como a Savana com a maior riqueza de flora do mundo, apresentando mais de 7.000 espécies, além de possuir um alto grau de endemismo. Apesar da taxa de desmatamento do Cerrado ser superior à da Amazônia, apenas 2,2 % da sua área é protegida legalmente e estima-se que cerca de 20% das espécies ameaçadas ou endêmicas não estão presentes nas suas reservas (KLINK; MACHADO, 2005; MOURA et al., 2013).

De acordo com dados do Ministério do Meio Ambiente (2016), o Cerrado está ameaçado de extinção, principalmente, em decorrência da expansão agrícola, queimadas e crescimento das áreas urbanas, sendo considerado um *hotspots* mundial. O extrativismo predatório de plantas nativas vem ocasionando uma drástica redução de suas populações naturais. Este fato pode trazer consequências para as gerações futuras, que poderão não usufruir dos recursos naturais oferecidos por esse bioma, dentre esses, os recursos terapêuticos proporcionados pelas plantas medicinais (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

Dentre as espécies pertencentes a este bioma, encontram-se representantes do gênero *Pouteria*. Estudos têm revelado que, além do potencial frutífero, há um grande potencial medicinal relacionado às espécies deste gênero (FUENTEALBA et al., 2016; MALTA et al., 2013; SANTOS et al., 2015). Dentre as espécies do gênero *Pouteria* encontra-se *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.

Pouteria torta é pertencente à família Sapotaceae, nativa do Cerrado e é conhecida, popularmente, como guapeva. Sua madeira é classificada como moderadamente pesada, dura, difícil de serrar, apresentando longa durabilidade quando protegida da umidade. É utilizada para construção civil, carpintaria e marcenaria. Seu fruto é utilizado tanto pela fauna como para consumo humano,

sendo bastante utilizado em plantios de recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente (LORENZI, 1992; SÃO PAULO, 2001).

Popularmente a espécie é utilizada com antidiarreico, apresentando, também, eficácia na ação antimicrobiana (ELIAS et al., 2013). Entretanto, há, ainda, estudos que ressaltam suas propriedades medicinais. Uma delas é seu efeito antitumorgênico, podendo ocasionar a apoptose de algumas células cancerígenas, como o tumor de mama em ratos (SOUZA et al., 2012). Além disso, indícios quanto ao seu potencial no tratamento de diabetes *mellitus* já foi reportado (SILVA et al., 2009).

De uma maneira geral, há poucas informações disponíveis sobre o comportamento das espécies nativas, o que dificulta o estabelecimento de técnicas que permitam a conservação e exploração dessas espécies. Além disso, muitas delas apresentam problemas de germinabilidade, dificultando seu estabelecimento em campo quando se visa tanto à exploração econômica, quanto a conservação. Sendo assim, estudos relacionados às sementes, como germinação, composição química, análises morfológicas, dentre outros, são muitos importantes, pois podem colaborar para uma melhor compreensão do comportamento das espécies, assim como permitem desenvolver métodos de propagação (SILVA et al., 2014; TIAN, et al., 2010). Informações geradas com base nestes estudos, também, podem auxiliar na execução de outras técnicas, como as utilizadas pela cultura de tecidos.

Uma das técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação, possibilita conservar espécies ameaçadas, propagar espécies que apresentem dificuldades para germinar, fazer produção de mudas em larga escala e, ainda, incluir espécies em bancos de germoplasmas (PINHAL et al., 2011). O cultivo *in vitro* oferece vantagens em relação à propagação vegetativa convencional em termos de qualidade e quantidade do material. Principalmente quando há uma oferta

limitada deste ou quando a propagação vegetativa convencional é ineficiente (LOBERANT; ALTMAN, 2010).

Entretanto, há uma grande variação no comportamento de espécies lenhosas cultivadas *in vitro*, necessitando uma adaptação da técnica para cada espécie. E, durante este processo, pode haver alterações morfológicas e anatômicas nas plantas, podendo interferir no sucesso da técnica (RODRIGUES; MELO; ALOUFA, 2006). Baseado no exposto, objetivou-se analisar características morfofisiológicas de sementes de *Pouteria torta* e estabelecer um protocolo para sua propagação *in vitro*.

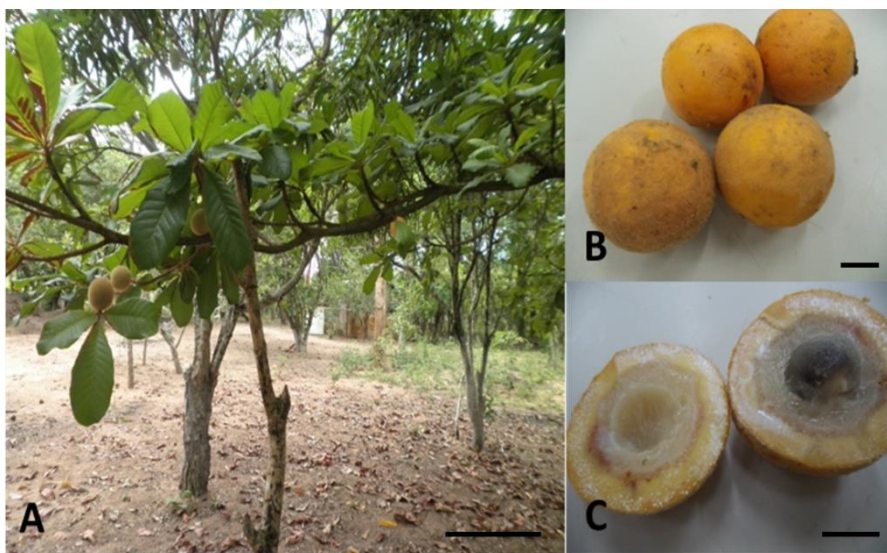
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Pouteria torta* (Mart.) Radlk

A família Sapotaceae é constituída de 58 gêneros e 1.250 espécies, localizadas nas regiões tropicais e subtropicais do globo (GOVAERTS; FRODIN; PENNINGTON et al., 2001; PENNINGTON, 1991; SWENSON; BARTISH; MUNZINGER, 2007; SWENSON; MUNZINGER; BARTISH, 2007). No Brasil, são encontrados 10 gêneros e 231 espécies desta família (CARNEIRO et al., 2013), dentre eles destaca-se o gênero *Pouteria*, um dos mais diversos no país, com cerca de 121 espécies já catalogadas (ALVES-ARAÚJO, SWENSON; ALVES, 2014). Dentre essas espécies encontra-se *Pouteria torta* (Mart.) Radlk.

Pouteria torta é uma árvore típica do Cerrado brasileiro (FIGURA 1), podendo, também, ser encontrada em regiões da Amazônia (ALVES-ARAÚJO, SWENSON; ALVES, 2014; PERFEITO et al., 2005). Popularmente, é conhecida por diversos nomes como grão-de-onça, abiurana, abiurana-camazal, grão-de-galo, cabo-de-machado, jabeba, abiu-do-Cerrado, abiu-do-mato, abiu-piloso, acá, bacupari, bacupari-de-árvore, curriola, parada, guape, guapeba, guapeva, guapeva-grande e mocotó-de-ema (BRASIL, 2015).

Figura 1- Árvore de *Pouteria torta* localizada no Município de Conceição do Pará-MG (A). Frutos inteiros de *Pouteria torta* (B) e seccionados (C). Barra=2m (A). Barra=1cm (B e C).



Suas folhas possuem cerca de 6-19 x 5-12,5 cm, são arrançadas de forma espiralada, com pecíolos de 1-3 cm de comprimento, ligeiramente canalizados e púberes (raramente glabra). Possui tricomas ferruginosos e lenticelas ausentes. Quanto às flores, possuem de 1 a 3 por fascículo, são bissexuais, com pedicelo de 0,1 cm de comprimento. Suas sépalas têm comprimento que variam de 5 a 15 mm, podendo ser de ovaladas a elípticas. Sua floração ocorre em diferentes momentos, dependendo da localização geográfica. Os frutos são do tipo bagoide, com coloração variando do amarelo ao alaranjado, medindo cerca de 3 a 8 cm de comprimento e 2 a 5 cm de diâmetro, apresentando, externamente, uma forragem de finos pelos. Normalmente é encontrada uma semente localizada, na porção central do fruto, apresentando comportamento recalcitrante. Sua polpa é esbranquiçada e comestível, podendo ser utilizada em bebidas, doces e geleias (FIGURA 1). É considerada heliófita, não tolerando baixas temperaturas. A árvore já adulta pode alcançar até 30 m de altura, podendo ser classificada como

arvoreta ou árvore semidecídua (ALVES-ARAÚJO; SWENSON; ALVES, 2014; BRASIL, 2015; GAMA; BARBOSA; OLIVEIRA, 2011).

Sua madeira é utilizada para construção civil, carpintaria e marcenaria. Seu fruto é consumido tanto pela fauna quanto por humanos. A espécie é bastante utilizada em plantios de recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente (ELIAS et al., 2013; LORENZI, 1992; SÃO PAULO, 2001; SILVA, SIMEONI; SILVEIRA, 2009). Estudos, também, mostram que a espécie apresenta atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2000; SILVA; SIMEONI; SILVEIRA, 2009), inseticida e antifúngica (BOLETI et al., 2007).

Extratos aquosos de suas folhas, fruto e casca do fruto exercem alta atividade inibitória de α -amilase e α -glicosidase, o que poderia auxiliar no tratamento de diabetes *mellitus* (SOUZA, et al., 2012). A espécie, também, apresenta atividade citotóxica contra epidermoide de boca e linhagens celulares de tumor de mama (ELIAS et al., 2013). Suas sementes possuem uma proteína denominada pouterina, que causa aglutinação de eritrócitos humanos, de ratos e coelhos (BOLETI et al., 2007). Além disso, induzem a apoptose de algumas células cancerígenas em mamíferos (BOLETI et al., 2008). Os extratos de folhas de *P. torta* apresentam compostos polifenólicos, tais como flavonoides e derivados de catequina que apresentam atividade antioxidante (ELIAS et al., 2013).

2.2 Caracterização de sementes

Apesar do valor medicinal, comercial e ecológico de *P. torta*, ainda, há poucas informações sobre a espécie, principalmente, em relação ao seu comportamento fisiológico. Não há nenhum relato na literatura que descreva o comportamento de suas sementes.

A grande dificuldade do estabelecimento de condições e técnicas de análises, para sementes florestais, deve-se, além da escassa informação sobre as

espécies nativas, à sua imensa variação morfológica. Análises como peso de mil sementes (que possibilita o conhecimento do número de sementes por quilo e o tamanho das sementes) e o teor de água possuem grande variação nas respostas obtidas, tanto entre espécies, como dentro da mesma espécie (BRASIL, 2009; FORTES et al., 2008).

A realização de estudos que forneçam informações sobre os aspectos biométricos destas sementes, como peso e dimensão, torna mais fácil a padronização, aperfeiçoamento e estabelecimento de métodos para análises e armazenamento (BRUNING; LÚCIO; MUNIZ, 2011). A fim de identificar alguns desses aspectos, tem-se utilizado o GroundEye[®], que é capaz de extrair diversas informações como dimensão, perímetro, área, ou seja, está envolvido na análise morfológica das sementes (ANDRADE, 2014).

Os principais fatores limitantes da germinação são temperatura, água, luz, substratos, gases, nutrientes, recipientes, inibidores bioquímicos, além da fauna e micro-organismos. Estes fatores influenciam a capacidade e velocidade na qual uma semente, após atingir maturidade fisiológica, pode germinar (FLORIANO, 2004). Alguns destes aspectos, como danos ocasionados pela fauna ou por micro-organismos e até mesmo a disponibilidade de nutrientes (levando à formação de sementes mal formadas), podem ser verificados por meio de raios x (KOBORI; CÍRCERO; MEDINA, 2012).

Durante o processo de embebição, as sementes passam por processos metabólicos que culminam na protrusão da radícula. Uma maneira de visualizar a absorção de água pelas sementes, durante a germinação, é elaborando uma curva de embebição. Este é considerado um procedimento técnico importante para auxiliar na identificação de dormência das sementes, assim como a viabilidade do lote (BRASIL, 2009).

As análises bioquímicas de sementes, também, têm grande importância para estudos sobre as espécies. Assim como os demais órgãos das plantas, as

sementes apresentam composição química variável, com basicamente dois grupos de componentes químicos: os materiais de reserva e os que ocorrem normalmente como constituintes em todas as estruturas do

embrião (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

As substâncias estruturais que constituem as sementes são os oligo e polissacarídeos das paredes celulares. Dentre as substâncias de reserva destacam-se as proteínas, lipídeos e carboidratos. As sementes podem ser classificadas, de acordo com o composto de reserva predominante, podendo ser designadas como amiláceas, oleaginosas ou proteicas. Estas reservas têm como funções básicas manter o embrião até a formação de uma plântula que apresente capacidade autotrófica (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Conhecer a composição química das sementes é de grande valia, principalmente, por influenciar no vigor e potencial de armazenamento (SOUZA et al., 2012). O conhecimento da morfologia e fisiologia das sementes pode auxiliar na produção de mudas, além de fornecer embasamento para o estudo de seu estabelecimento *in vitro* (OLIVEIRA; SCHLEDER; FAVERO, 2006).

Poucas informações sobre sementes de *P. torta* são encontradas na literatura. Verifica-se que suas sementes não toleram a dessecação, apresentando cerca de 54,3% de umidade (sem a remoção da mucilagem). A porcentagem de emergência varia de 34,3 a 100%, que se inicia entre 50 a 74 dias. Também é citada dormência física nas sementes, devido seu tegumento espesso (BRASIL, 2015; DORNELES, 2010).

2.3 Micropropagação

O Cerrado possui uma flora rica e de grande interesse comercial e medicinal, entretanto, muitas de suas espécies apresentam dificuldades para serem propagadas convencionalmente (ANDRADE, 2002). Através da cultura de tecidos é possível propagar espécies que apresentem dificuldades para

germinar, promovendo a produção de mudas em larga escala (PINHAL et al., 2011).

Esta técnica oferece vantagens, em relação à propagação vegetativa convencional, em termos de qualidade e quantidade do material, principalmente, quando há uma oferta limitada deste, quanto à disponibilidade de sementes, por exemplo, ou quando a propagação vegetativa convencional é ineficiente (LOBERANT; ALTMAN, 2010). Além disso, a técnica pode contribuir, para o melhoramento genético e possibilitar estudos de métodos de conservação, uma vez que viabiliza a inclusão e manutenção de espécies em bancos de germoplasma (KELLER et al., 2013).

Muitas espécies do Cerrado são estudadas, por meio da cultura de tecidos, seja visando à conservação, produção de fármacos ou produção de mudas em larga escala (LIMA; PEREIRA; SILVEIRA, 2015; MARTINS, et al., 2011; OUTUKI et al., 2015).

Dentre os reguladores de crescimento de plantas mais utilizados no cultivo *in vitro*, encontram-se os pertencentes à classe das citocininas, importantes para a superação da dominância apical, proliferação das gemas laterais e multiplicação *in vitro* (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010). Dentre estes, um dos mais citados na literatura é o 6-benzilaminopurina (BAP). Este regulador mostra-se bastante eficiente no processo de multiplicação, tanto na parte aérea como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (BAKSHI; TIWARI; RAZVI, 2015; HU; WANG, 1983; LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010). A zeatina, o thiadizuron (TDZ) e benziladenina (BA), também, são bastante citados na literatura (GOMES; FRANCESCHI; RIBAS, 2015; SILVA et al., 2014; SUGLA et al., 2007). Além do floriglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno) que, apesar de não ser uma citocinina, o composto, também, pode ser utilizado, para processos de multiplicação, promovendo a formação de brotos em cultura de tecidos (SILVA et al., 2014).

As giberelinas, outra classe hormonal, induz o alongamento celular em vegetais. O alongamento, às vezes, torna-se vantajoso, para obterem-se melhores respostas nas etapas de micropropagação, podendo incrementar o crescimento dos explantes. Neste caso, o ácido giberélico (GA_3) é um regulador de crescimento bastante utilizado na cultura de tecidos promovendo o alongamento e crescimento celular dos explantes (MUKHERJEE et al., 2009; RADEMACHER, 2000).

O enraizamento é uma etapa que pode dificultar o estabelecimento de um protocolo eficiente, apresentando grande importância, uma vez que as raízes estão relacionadas com a obtenção de água e nutrientes, além da própria sustentação da planta (SAINI et al., 2013). No cultivo *in vitro*, as auxinas são utilizadas em meio de cultivo, geralmente, para a indução de raízes adventícias. Pesquisas têm demonstrado que o ácido indolbutírico (AIB), além de ser uma auxina, pode ser ele próprio uma forma de armazenamento de ácido indol-3-acético (AIA), já que, por mecanismos de oxidação que ocorre nos peroxissomos, este composto pode ser convertido em AIA livre (BARTEL et al., 2001). Outro regulador bastante citado na literatura por induzir a rizogênese é o ácido naftaleno acético (ANA) (BAKSHI; TIWARI; RAZVI, 2015; MARTINS et al., 2013; MENDONÇA et al., 2015).

Uma alternativa, para diminuir as etapas da micropropagação, é o enraizamento *ex vitro* de plantas cultivadas *in vitro*, que é realizado juntamente com a aclimatização. Este procedimento é considerado vantajoso, uma vez que reduz os custos da produção (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

Não há estudos realizados com *P. torta* visando à micropropagação. Entretanto, são encontrados alguns trabalhos para espécies da mesma família, destacando os reguladores citados acima. *P. lucuma* O. Ktze, por exemplo, foi alongada utilizando GA_3 , houve multiplicação com o uso de zeatina e ANA, e o processo de rizogênese deu-se por meio da combinação de ANA e BA

(JORDAN; OYANEDEL, 1992). Para a mesma espécie, também, foram utilizados ANA, GA₃ e BA para promover o cultivo *in vitro* (PADILLA et al., 2006). Em um trabalho com *Madhuca latifolia* Macb., uma espécie da família Sapotaceae, o uso de cinetina propiciou a multiplicação das brotações (BANSAL; CHIBAR, 2000).

A última etapa da micropropagação é a aclimatização, sendo considerada uma etapa crítica, podendo comprometer todo o sistema de produção de mudas obtidas por essa técnica (SANTOS et al., 2013). Esta fase caracteriza-se pela passagem de uma planta da condição heterotrófica (*in vitro*) para a condição autotrófica (*ex vitro*). Nesta etapa, as plantas micropropagadas estão mais suscetíveis aos estresses ambientais, devido à formação de estômatos pouco funcionais, assim como pela cutícula pouco desenvolvida nas folhas (HOOKER et al., 1994).

O estudo da anatomia dos explantes, durante a micropropagação, também, é importante. Uma vez que pode auxiliar na compreensão de diversos processos que ocorrem *in vitro* e permitir a elucidação de possíveis insucessos em técnicas de micropropagação. A partir de testes histoquímicos em vegetais é possível a identificação de tecidos lignificados. A lignina é, relativamente, hidrofóbica e está ligada à hemicelulose para preencher os espaços entre as microfibrilas e/ou entre as fibras na parede celular da planta (CAO et al., 2016). É uma substância bastante encontrada em tecidos com crescimento secundário, um estágio de crescimento em que as células diminuem o potencial totipotente, apresentando, também, relação com mecanismos de defesa contra patógenos (RAI; BOUDDHA; ANSARI, 2016). Tal fato pode influenciar no desenvolvimento *in vitro*, dificultando ou até mesmo alterando as respostas aos reguladores de crescimento utilizados. Dentre as técnicas utilizadas, para testar a presença ou ausência de lignina, são utilizados corantes como azul de astra e safranina. A celulose possui afinidade com o azul de astra, a qual apenas é

incorporada nas fibras na ausência de lignina. Esta, por sua vez, reage com a safranina de modo independente da presença de celulose (LEMPP, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *Pouteria torta* maduros foram coletados, no município de Conceição do Pará – MG, em janeiro de 2015. Os frutos foram transportados em sacos plásticos para a cidade de Lavras-MG após a coleta. Os experimentos foram conduzidos, no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, localizado no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. A análise bioquímica das sementes foi realizada no Laboratório de Grão, Raízes e Tubérculos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Antes de todos os experimentos, as sementes foram beneficiadas, no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, com auxílio de uma peneira sob água corrente até a retirada total da mucilagem que as recobriam.

3.1 Caracterização de sementes

Para caracterizar as sementes de *P. torta* foram realizados experimentos a fim de determinar o teor de água das sementes, peso de mil sementes, características morfológicas e bioquímicas, assim como a elaboração da curva de embebição das sementes.

3.1.1 Peso de mil sementes e teor de água

O peso de mil sementes foi obtido pela pesagem de oito repetições, contendo 100 sementes cada, de acordo com protocolo estabelecido por Brasil (2009) encontrado nas Regras de Análises de Sementes (RAS). O número de sementes por quilo foi obtido a partir do peso de mil sementes, utilizando relação de proporção direta. A determinação do teor de água, também, seguiu o protocolo sugerido pela RAS (BRASIL, 2009), no qual três repetições, contendo cinco sementes cada, foram pesadas e secas em estufa regulada a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

3.1.2 Caracterização bioquímica

Visando à caracterização bioquímica das sementes, foram avaliados os teores de amido, açúcares solúveis redutores e não redutores, proteínas e fibras. As sementes foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 70°C, até atingir peso constante e, posteriormente, trituradas em moinho. Foram utilizadas três repetições para cada análise. Os lipídeos foram quantificados, via extrato etéreo, no qual a amostra foi extraída diretamente com éter etílico em extrator contínuo de Soxhlet (HORWITZ; LATIMER JUNIOR, 1990). A proteína bruta foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl (HORWITZ; LATIMER JUNIOR, 1990), aplicando-se o fator 6,25 para o cálculo do teor de proteína bruta. A quantidade de amido foi analisada, segundo a metodologia descrita por Somogy (1945), adaptada de Nelson (1944). Enquanto os açúcares solúveis, redutores e não redutores foram extraídos, utilizando o método Lane-Enyon (HORWITZ; LATIMER JUNIOR, 1990) e determinados pela técnica de Somogy (1945), adaptada de Nelson (1944).

3.1.3 Curva de embebição

A construção da curva de embebição foi realizada em sementes com e sem tegumento. As sementes foram divididas em três amostras de seis sementes cada e colocadas em rolo de papel Germtest[®] umedecido com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Anteriormente as sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo), por 10 minutos e tratadas em bactericida (Kasumin[®]), na concentração de 2mL L⁻¹, por 5 minutos. A primeira pesagem foi realizada com as sementes secas, anteriormente à desinfestação. As demais pesagens foram realizadas, a cada 30 minutos, durante as primeiras seis horas de embebição. Nas seis horas subsequentes, as pesagens foram realizadas de hora em hora. Em seguida, as sementes foram pesadas, a cada três horas, 24 horas, de 6 em 6 horas, por mais

24 horas e de 12 em 12 horas por mais 48 horas. Posteriormente a pesagem foi feita a cada 24 horas, até o 35º dia, quando 50% + 1 semente de todas as repetições germinaram. Durante todo o processo, as sementes foram mantidas em câmara de germinação, à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

A porcentagem de incremento sobre a massa fresca inicial foi calculada por meio da expressão (NERY et al., 2007):

$$\% \text{ de incremento sobre a massa fresca inicial (IMF)} = ((MF - MFI) / MFI) \times 100$$

Em que:

IMF = Incremento de massa fresca

MF = massa fresca

MFI = massa fresca inicial

3.1.4 Análises morfológicas

Características morfológicas das sementes, também, foram avaliadas. As sementes foram colocadas em uma bandeja de acrílico no GroundEye® dividida em três repetições com dez sementes cada. O software foi calibrado e a captura das imagens foi realizada nas duas faces das sementes por duas câmeras, proporcionando uma visão dupla do material estudado. Por meio dessas imagens, foi possível analisar aspectos geométricos da semente como área, diâmetro, afinamento, perímetro, circularidade e contorno.

3.2 Micropropagação

A fim de estabelecer um protocolo para micropropagação de *P. torta* foi estudada a sua germinação *in vitro*, alongamento e multiplicação das brotações, enraizamento e aclimatização dos explantes.

3.2.1 Germinação *in vitro*

Frutos maduros de *P. torta* foram despulpados e suas sementes tratadas com hipoclorito a 2,5% de cloro ativo por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram passadas na peneira, para auxiliar na retirada da mucilagem. Após a retirada da mucilagem, elas permaneceram por 30 minutos em bactericida (Kasumin[®]) e mais 30 minutos no fungicida (Derosol[®]), ambos na concentração de 2 mL L⁻¹, sendo colocadas na bancada para secar sobre papel filtro.

Na câmara de fluxo, as sementes tiveram seu tegumento retirado com a ajuda de uma prensa. Então, foram submersas em álcool 70% por cinco minutos, colocadas em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo por 20 minutos e lavadas com água destilada e autoclavada por três vezes. As sementes, então, foram submetidas a uma segunda assepsia, na qual foram submetidas ao bactericida e fungicida (2 mL L⁻¹), microfiltrados, por cinco minutos, respectivamente e, depois, lavadas com água destilada e autoclavada.

Ainda, na câmara de fluxo, as sementes foram inoculadas em meio WPM (Wood Plant Medium) de Loyd e McCown (1980) suplementado com 3% de sacarose e 0,7% de ágar, pH 5,8, autoclavado. Após a inoculação, foram mantidas, em sala de crescimento a 25° ± 2°C, sob as condições de presença e ausência de luz. Cada tratamento consistiu de três repetições, cada uma composta por 10 sementes.

A germinação foi avaliada, diariamente, a fim de verificar o índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962):

$$\text{Índice de velocidade de germinação (IVG)} = \sum (n_i / t_i)$$

Em que:

n_i = número de sementes que germinaram no tempo 'i';

t_i = tempo após instalação do teste;

$i = 1 \rightarrow 30$ dias.

Como critério para a germinação, foi considerada a protrusão radicular de 2,0 mm, sendo obtida, ao final dos 30 dias, a porcentagem de germinação.

3.2.2 Multiplicação

Para promover a multiplicação, segmentos caulinares de, aproximadamente, 2,0 cm, contendo duas gemas laterais e sem o ápice caulinar, foram inoculados, na câmara de fluxo, em meio WPM suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e diferentes citocininas (BAP, BA e TDZ) em diferentes concentrações (0; 0,25; 1; 4 e 16 μM) e autoclavado. O experimento consistiu de quatro repetições com três explantes cada. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Também foi avaliada a influência de zeatina (0; 2,3; 4,6; 9,2; 18,4 e 36,8 μM) e do floroglucinol (0; 80; 396 e 792 μM) na multiplicação *in vitro* de *Pouteria torta*. Estes compostos foram acrescentado em meio WPM, contendo 3% de sacarose e 0,7% de ágar, pH 5,8 e autoclavado. Ambos os experimentos consistiram de três repetições com sete sementes cada. Após a inoculação os explantes foram mantidos, em sala de crescimento a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, na luz branca. Após 30 dias, foram avaliados o número e tamanho das brotações, assim como o número de brotos com formação de calo na base.

3.2.3 Alongamento

Brotações, contendo o ápice caulinar e duas gemas laterais, provenientes da etapa de multiplicação com, aproximadamente, 2 cm foram inoculadas em meio WPM suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, pH 5,8, diferentes concentrações de GA_3 (0; 0,25; 1; 4 e 16 μM) e autoclavado. As brotações foram mantidas, em sala de crescimento a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A avaliação do tamanho de brotações e número

de folhas dos explantes foi realizada após 30 dias. Este experimento consistiu-se de quatro repetições, sendo cada repetição composta por quatro brotações.

Para verificar a presença de lignina no caule dos explantes cultivados *in vitro*, assim como verificar o estágio de desenvolvimento dos tecidos, foram realizadas secções transversais do caule, à mão livre, com lâmina cortante. Posteriormente, as secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 2%, por um minuto, lavadas em água destilada e coradas com solução de azul de astra e safranina. As secções foram montadas em lâminas e lamínulas com glicerina a 50% e analisadas em microscópio óptico.

3.2.4 Rizogênese e aclimatização

O processo de rizogênese *in vitro* foi realizado a partir de brotações com 2 cm de comprimento, contendo a gema apical e duas folhas. Estas foram inoculadas em meio WPM suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, pH 5,8, com diferentes auxinas (ANA e AIB), em diferentes concentrações (0; 1; 5; e 10 μM) e autoclavado. Os explantes foram mantidos na sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A avaliação da porcentagem de enraizamento, número e tamanho das raízes foi realizada após 30 dias. Foram utilizadas três repetições com sete explantes cada.

O enraizamento *ex vitro* foi realizado, utilizando-se as brotações, provenientes do cultivo *in vitro*, sem formação de raiz. Estas brotações tiveram suas bases lavadas com água corrente e cortadas com o auxílio de um bisturi e imersas por um minuto em soluções com altas concentrações de AIB (0, 500, 1.000 e 1.500 μM). Foram utilizadas cinco repetições com três explantes cada. A rizogênese *ex vitro* ocorreu juntamente com a aclimatização, já os explantes enraizados *in vitro* foram aclimatizados posteriormente.

Na aclimatização, os explantes foram colocados em tubetes com capacidade de 110 cm³ contendo o substrato comercial Tropstrato[®]. Os tubetes, contendo as brotações, foram cobertos por sacos plásticos transparentes e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas com 60 μmol m⁻² s⁻¹ de irradiância de fótons. A cada cinco dias foram realizados cortes de, aproximadamente, dois cm de diâmetro, em uma das extremidades do plástico, até sua total remoção. O experimento consistiu de quatro repetições contendo três explantes cada.

Após quatro semanas, quando os sacos plásticos foram totalmente retirados, as mudas foram transportadas para casa de vegetação, sob telado do tipo sombrite, permitindo a passagem de apenas 50% da radiação solar incidente. A avaliação da sobrevivência (%) foi realizada após 30 dias.

3.3 Delineamento experimental e análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott, utilizando-se o software R, por meio do pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2011a, 2011b). Para analisar os dados referentes ao número de raiz, necessitou-se utilizar transformação “1/Raiz dos dados” para que houvesse normalização.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *Pouteria torta* apresentaram teor de água de 38,4% aproximadamente. O elevado teor de água no qual são dispersas indica recalcitrância das sementes, ou seja, são sementes que não apresentam a fase de secagem pós-maturação, sendo dispersas com alto teor de água (>35%) (BRASIL, 2015; VAZ et al., 2016).

Outras sementes do gênero, também, são dispersas com elevado teor de água. Para sementes de *Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni, foram observados 47,25% de teor de água (COSTA et al., 2010). E estudos com *Pouteria guardineriana* Ralck demonstraram o comprometimento da viabilidade das sementes quando desidratadas aos níveis abaixo de 30% (CABRAL et al., 2013).

A recalcitrância de sementes pode ser compreendida, analisando a composição química, uma vez que os açúcares e lipídeos podem ajudar a explicar a capacidade de tolerância à dessecação. *P. torta* apresenta o conteúdo de açúcar não redutor maior do que o conteúdo de açúcar redutor (TABELA 1), contrariando a relação destes açúcares em sementes recalcitrantes. Isto porque o aumento do conteúdo de sacarose e rafinose, açúcares não redutores e diminuição de glicose e frutose, açúcares redutores, estão relacionados com o aumento da tolerância à dessecação, enquanto a situação inversa pode indicar a perda desta tolerância. A função dos carboidratos, neste caso, está ligada à proteção das membranas durante o processo de desidratação (BARBEDO; MENDES-JUNIOR, 1998; BUSINGE et al., 2013).

Tabela 1 - Caracterização química de sementes de *Pouteria torta*.

Substâncias	Média
Amido (g/100g)	37,99±4,15
Açúcar redutor (g/100g)	0,29±0,05
Açúcar não redutor (g/100g)	3,25±0,24
Açúcar total (g/100g)	3,74±0,32
Proteína (%)	6,76±0,07
Extrato etéreo (lipídeo) (%)	7,74±0,8
Fibra (%)	13,37±0,8
Cinzas (%)	1,66±0,07

Em trabalho realizado com *Inga vera* e *Eugenia uniflora*, espécies recalcitrantes, também, foram encontradas maiores quantidades de sacarose em relação ao conteúdo de açúcares redutores (MELLO et al., 2010). Isso demonstra que, apesar da sacarose estar envolvida na tolerância à dessecação, outros fatores como ácido abscísico, proteínas LEA, oligosacarídeos e aminoácidos, como a prolina, também, determinam a capacidade de tolerar a perda de água (BARBEDO; MENDES-JUNIOR, 1998; MELLO et al., 2010).

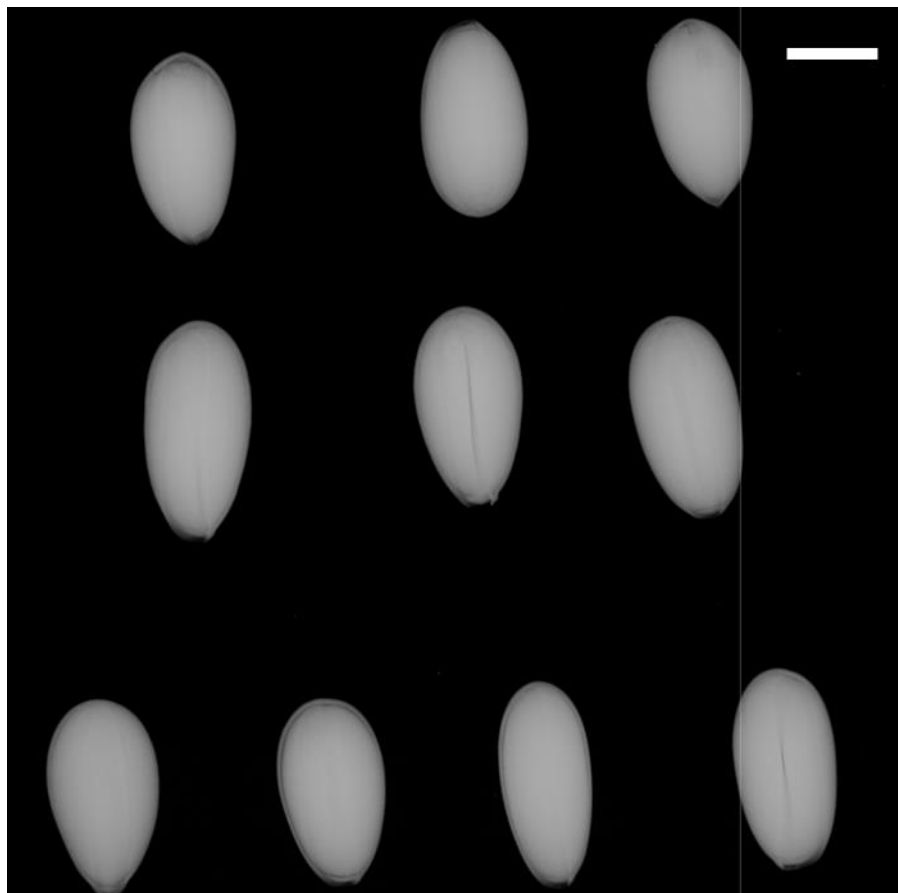
A quantidade de lipídeos encontrada nas sementes de *P. torta* (TABELA 1) representa quase o dobro daquela encontrada em sementes de *Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni, o qual corresponde a 4,62 % (COSTA et al., 2010). Porém, o valor de lipídeo em sementes de *P. torta*, ainda, é baixo quando comparado aos demais componentes da semente, sendo o amido sua principal forma de reserva (37,99%), sugerindo que as sementes sejam classificadas como amiláceas. Este fator pode estar envolvido na sensibilidade das sementes à perda de água, uma vez que a maior concentração de lipídeos, em relação aos demais componentes da semente, está envolvida na aquisição de tolerância à dessecação (MELLO et al., 2010). Em contrapartida, os valores encontrados em *P. torta* para lipídeos, fibras, proteínas e cinzas (TABELA 1) foram menores em relação

aos valores encontrados para *Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn (44,41 %, 25,69 %, 11,34 % e 3,87 %, respectivamente) (SOLÍS-FUENTES et al., 2015).

No lote estudado, foi constatado que o peso de mil sementes de *P. torta* foi de, aproximadamente, 2400 g (\pm 3,8), ou seja, aproximadamente, 417 sementes por quilo de *P. torta*, não havendo relatos anteriores para a espécie. O peso de mil sementes pode ser utilizado como indicativo para explicar a qualidade de diferentes lotes de sementes. Há muitos estudos que correlacionam o tamanho das sementes com seu percentual de germinação, inferindo que o maior tamanho, normalmente, é em razão de uma maior umidade e maior acúmulo de reserva, possibilitando uma melhor germinação do lote (BRUNING; LÚCIO; MUNIZ, 2011; FELLIPI et al., 2015; GASPAR; NAKAGAWA, 2002).

As imagens, provenientes de raios x, demonstraram que as sementes encontravam-se 100% intactas e sem nenhum dano mecânico, porém não foi possível visualizar o posicionamento dos embriões (FIGURA 2). Tais informações auxiliam a compreender a germinação, uma vez que sementes danificadas ou mal formadas podem alterar o resultado da germinação (AMARAL et al., 2011).

Figura 2 - Raios X das sementes não acusando nenhum dano mecânico e mostrando que as sementes estão todas intactas. Barra= 1 cm.



Também foram obtidas algumas características morfológicas da semente (TABELA 2), isto após a retirada da mucilagem que as recobrem.

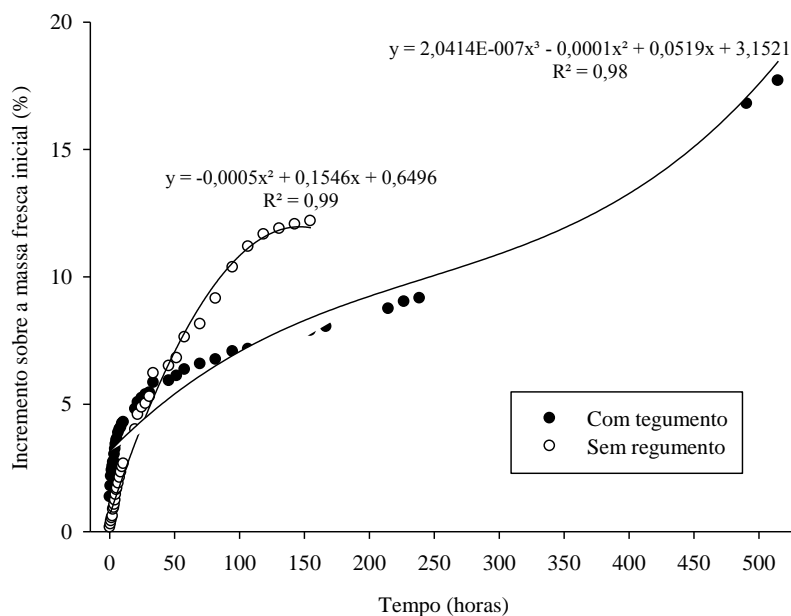
Tabela 2 - Análises das características morfológicas de sementes de *P. torta*, mostrando os valores médios para área, circularidade, diâmetro e perímetro.

Parâmetros	Média
Área (cm ²)	2,55±0,28
Circularidade	0,52±0,29
Diâmetro máximo (cm)	2,49±0,14
Diâmetro máximo lateral (cm)	1,31±0,09
Diâmetro mínimo (cm)	1,28±0,09
Perímetro (cm)	7,57±0,88

Há relatos de características quantitativas para sementes de outra espécie do gênero *Pouteria*, *P. pachycarpa* Pires, nos quais foi verificado comprimento variando de 2.3 - 3.5 cm e largura de 1,1 - 1.5 cm (CRUZ, 2005).

A curva de embebição foi realizada utilizando-se sementes com e sem tegumento (embriões- eixo embrionário e cotilédones) (FIGURA 3). Observou-se, pela figura 3, a distinção entre as três fases da germinação para sementes com tegumento. No entanto, para sementes sem tegumento, foi verificada apenas a embebição das sementes (Fase I) uma vez que observou-se oxidação e consequente deterioração destas sementes.

Figura 3 - Incremento de matéria fresca referente à curva de embebição de sementes de *P. torta* com e sem o tegumento.

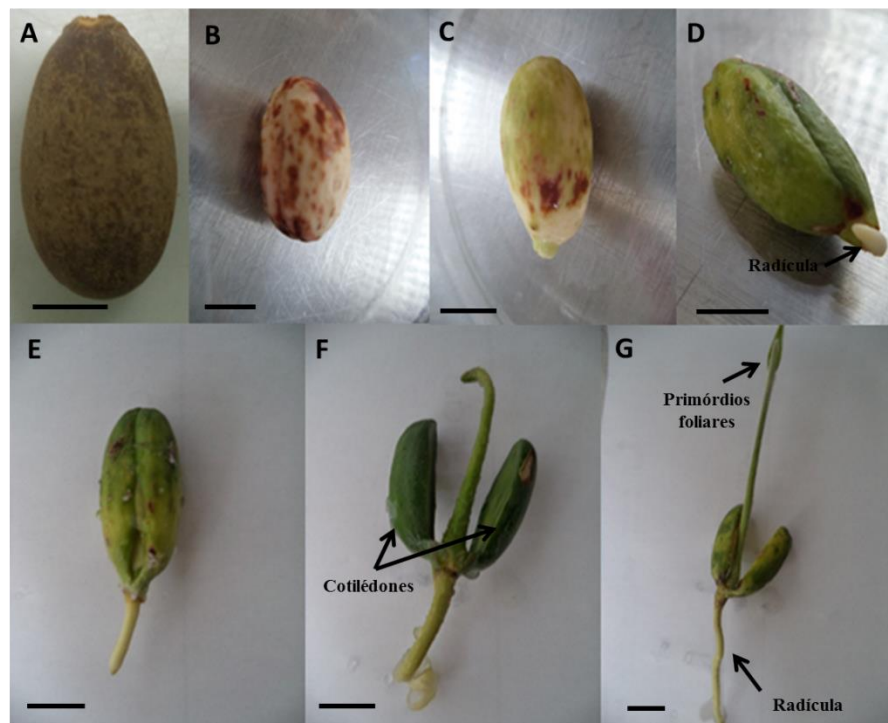


Segundo Bewley e Black (1994), a fase I é caracterizada por uma absorção de água crescente, sendo essa fase independente de dormência (com exceção da dormência física) ou viabilidade das sementes. A partir deste ponto, as sementes entraram na fase II, denominada estacionária, a qual foi observada somente para sementes de *P. torta* com tegumento. Esta fase, apesar de mostrar uma diminuição na absorção de água, permaneceu com absorção contínua. As sementes com o tegumento continuaram a germinação e entraram na fase III, onde se iniciou a protrusão radicular, a partir do 22º dia, acompanhando, novamente, o aumento da absorção de água (FIGURA 3B).

Para o guanandi, *Calophyllum brasiliense* Cambess., espécie que, também, apresenta sementes recalcitrantes, a remoção do tegumento apresentou diferença significativa na germinação. As sementes sem o tegumento

germinaram muito mais do que as sementes inteiras (72% e 23 %, respectivamente) (SILVA; VIEIRA; PANOBIANCO, 2014). Para *P. torta*, o tegumento não impediu a germinação, o que comprova que a espécie não possui dormência física. *Trichilia claussenii* C. DC., outra espécie com sementes recalcitrantes, também, não apresentou o padrão trifásico de germinação, necessitando, também, de mais de 24 horas para entrar na terceira fase de germinação (MAFRRA et al., 2011). Já, na germinação *in vitro* (FIGURA 4), que foi realizada por meio de embriões, a protrusão radicular começou no 9º dia.

Figura 4 - Germinação *in vitro* de *P. torta*. Semente com tegumento antes da inoculação (A). Embrião após três dias de inoculação (B). Embrião após sete dias de inoculação (C). Embrião após nove dias de inoculação (D). Embrião após 15 dias de inoculação (E). Embrião com 25 dias após a inoculação (F). Explante com 40 dias *in vitro* (G). Barra= 1 cm.

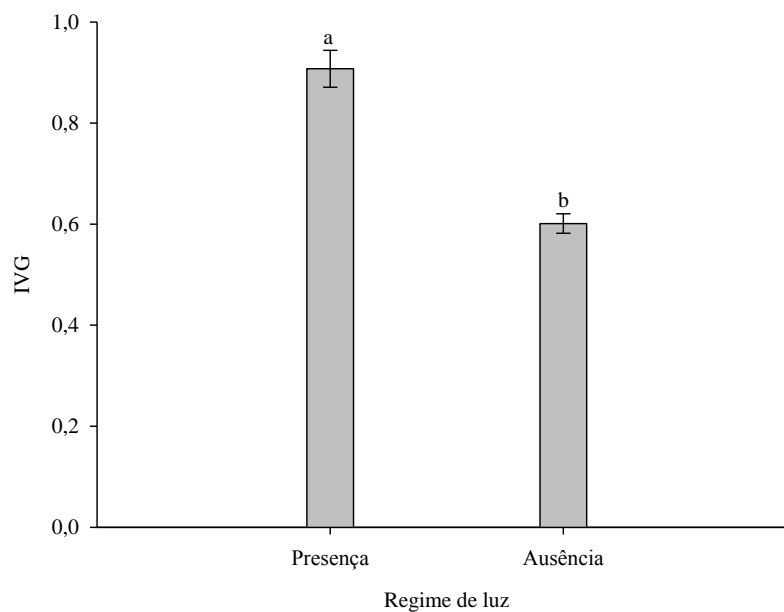


Não houve diferença significativa entre embriões germinados no escuro ou na luz, com uma média de 35% de germinação (TABELA 3). Entretanto, o índice de velocidade de germinação se apresentou maior para a germinação na luz (FIGURA 5).

Tabela 3 - Germinação *in vitro* de embriões de *P. torta* sob presença e ausência de luz, após 30 dias.

Luz	Germinação (%)
Presença	36,6 ± 4,9
Ausência	33,3 ± 4,8

Figura 5 - Índice de velocidade de germinação (IVG) de embriões de *P. torta* germinadas na presença e ausência de luz, *in vitro*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Skott Knott ($p < 0,05$).



Posteriormente à germinação, os explantes foram induzidos à multiplicação utilizando-se diferentes citocininas e floroglucinol. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, para o número de brotações, sendo regenerado apenas um novo broto por explante. Para o comprimento dos brotos, o uso de zeatina (TABELA 4) e de floroglucinol (TABELA 5) apresentou um tamanho médio de 0,5 cm. Ao utilizar BAP, TDZ e BA, os brotos cresceram, em média, 1 cm.

Tabela 4 - Efeito da Zeatina na multiplicação *in vitro* de *P. torta*.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de Broto	Tamanho dos brotos (cm)	Número de Folhas
0	0,7±0,59	0,2±0,2	2±1,8
0,5	0,7±0,59	0,3±0,3	2±1,6
1	1,1±0,35	0,5±0,3	3,3±1
2	0,6±0,61	0,2±0,3	1,9±2
4	0,8±0,86	0,3±0,3	2,1±2,2
8	0,7±0,77	0,2±0,2	1,8±1,9

Tabela 5 - Efeito do floroglucinol na multiplicação *in vitro* de *P. torta*.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de Broto (cm)	Tamanho dos brotos (cm)	Número de Folhas
0	0,7±0,59	0,2±0,2	2±1,8
10	0,71±0,2	0,2±0,23	1,2±1
50	0,85±0,6	0,4±0,07	2,4±1
100	0,85±0,2	0,3±0,3	1,4±0,4

Também não foi observada diferença significativa, em nenhum dos experimentos, para o número de folhas. O número médio, quando usado zeatina,

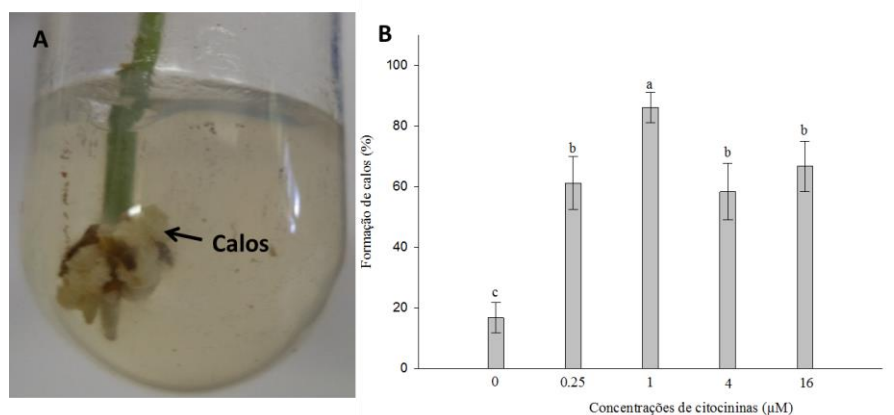
foi de 2,5 folhas. Para o floriglucinol, foram observadas 2 folhas, sendo verificado cerca de 4 folhas quando utilizado BAP, BA ou TDZ (TABELA 6).

Tabela 6 - Efeito de diferentes citocininas em diferentes concentrações na multiplicação *in vitro* de *P. torta*.

Regulador	Número de Broto	Tamanho dos brotos (cm)	Número de Folhas
BA	0,5±0,2	1,34±0,7	4,2±0,6
BAP	0,5±0,2	1,51±0,5	4,0±0,7
TDZ	1,0±0,1	1,28± 0,7	3,9±0,7

Por outro lado, para a variável formação de calos, houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de BAP, BA e TDZ. A ausência de regulador levou a uma menor formação de calo, enquanto a concentração de 1 μ M, para qualquer uma das citocininas utilizadas, promoveu uma maior formação de calos na base dos explantes (FIGURA 6). A porcentagem de explantes com formação de calo na base foi de 56%, 65% e 61% para BA, BAP e TDZ, respectivamente. Não foi observada formação de calo quando utilizados zeatina e floriglucinol.

Figura 6 - Formação de calo na base de explantes de *P. Torta* (A). Formação de calo nas diferentes concentrações de BAP, BA e TDZ (B). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, de acordo com o teste de Skott Knott ($p < 0,05$). Barra= 1cm.



Apesar dos reguladores utilizados para multiplicação e alongamento não terem sido efetivo nas variáveis analisadas, nos experimentos deste trabalho, durante a multiplicação de outra espécie do gênero *Pouteria*, diferenças significativas foram observadas. Para *Pouteria lucuma* O. Ktze, por exemplo, quando combinado o uso de diferentes classes de reguladores de crescimento (2,2 µM de BA, 0,5 µM de ANA e 1,4 µM de GA₃), houve um maior número de brotações, gema lateral e comprimento dos brotos (PADILLA et al., 2006).

Apesar dos reguladores vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas) terem a função de estimular respostas nos explantes, algumas respostas são espécies-dependentes, sendo notada, muitas vezes, variação dentro da própria espécie (SHEMER et al., 2015).

Estes reguladores podem influenciar os tecidos vegetais a regenerar-se seguindo três vias: a reparação dos tecidos, embriogênese somática ou organogênese. Mas, para a ativação destas vias, talvez, seja necessária a aquisição de uma competência, antes que os explantes respondam a um

tratamento. Apesar deste mecanismo, ainda, ser desconhecido, observa-se que mutantes de *Arabidopsis thaliana* com redução na metilação do DNA mostram alta capacidade de regeneração por organogênese direta. Já, em plantas selvagens, o gene WUSCHEL (WUS), que é essencial para formação da parte aérea, é altamente metilado. Neste caso, os explantes requerem uma pré-incubação em meio para calogênese, que possibilita as células próximas ao tecido vascular entrarem novamente no ciclo celular, retomando a capacidade de divisão quando transferidos para o meio com citocininas (SHEMER et al., 2015).

A dificuldade de multiplicação para explantes de *P. torta* pode estar envolvida na necessidade da aquisição de competência. Por este motivo, é interessante conduzir estudos que testem diferentes métodos para que a multiplicação seja mais eficaz.

Não houve diferença significativa, para nenhuma das variáveis analisadas com relação ao uso de GA₃ (TABELA 7), para o alongamento das brotações (FIGURA 7). O crescimento médio dos explantes foi de 0,5 cm, em 30 dias, com formação de, aproximadamente, 1,2 novas folhas.

Tabela 7 - Efeito de diferentes concentrações de GA₃ o alongamento de explantes de *P. torta*.

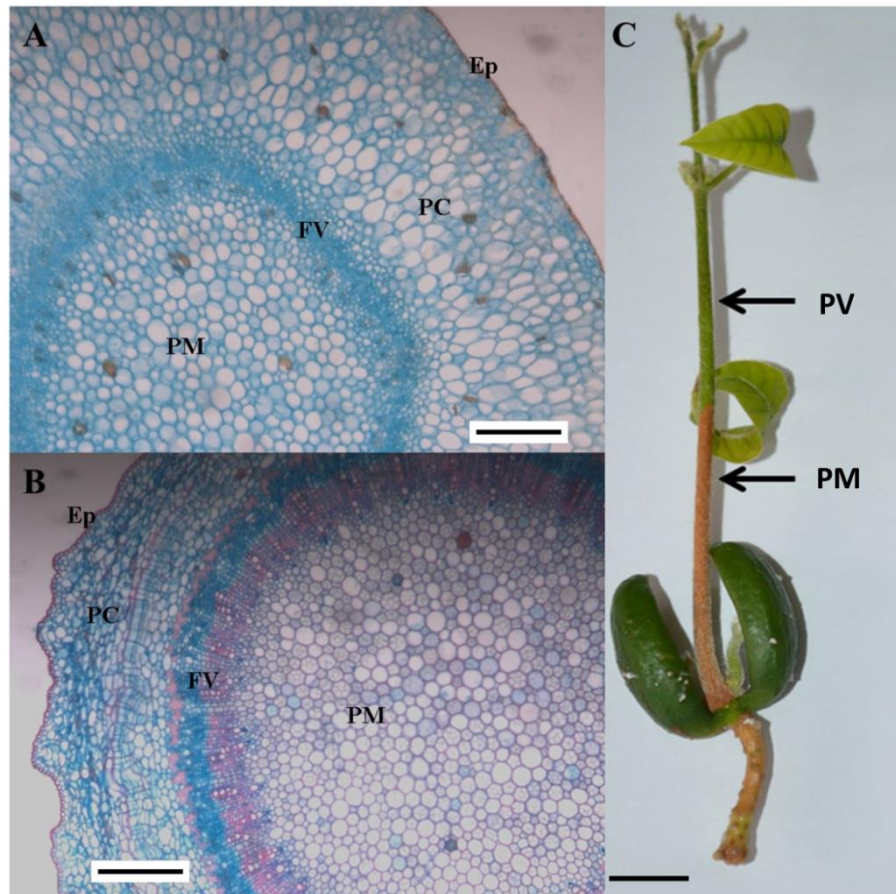
Concentração (μM)	Tamanho dos explantes (cm)	Número de Folhas
0	2,1±0,3	3,1±0,2
0,25	2,5±0,5	3,1±0,5
1	2,4±0,2	3,4±0,4
4	2,3±0,2	3,2±0,4
16	2,4±0,3	3,4±0,5

Figura 7 - Explantes de *P. torta* submetidos ao alongamento com GA₃. Da esquerda para a direita cada tubo representa os tratamentos: 0; 0,25; 1,0; 4,0 e 16 μM de GA₃. Barra= 1 cm.



Foi observada uma rápida lignificação dos tecidos do caule durante o cultivo *in vitro* de *P. torta*. Com apenas 45 dias após a inoculação dos embriões, foi possível verificar alguns explantes com um intenso processo de lignificação (FIGURA 8C). Apesar de não terem sido utilizados explantes lignificados nos experimentos, esta pré-disposição, para formação de tecidos secundários (FIGURA 8B), pode ter influenciado nas respostas não significativas observadas no presente trabalho.

Figura 8 - Corte transversal da porção verde (PV) do caule de *P. torta*, com ausência de lignina (A). Corte transversal da porção marrom (PM) do caule de *P. torta* (B). Barra = 100 μ m (A e B). Explante de *P. torta* após 45 dias da germinação *in vitro* (C). As setas indicam as regiões onde o caule foi seccionado. Barra= 1cm. (PM) Parênquima medular (PC) Parênquima (FV) Feixe Vascular (Ep) Epiderme.



O corte da região verde do explante (FIGURA 8A) revela crescimento primário, com feixe vascular pouco desenvolvido e sem deposição de substâncias como lignina (apenas a coloração azulada promovida pelo azul de astra). Já a porção marrom (FIGURA 8B) mostra organização dos tecidos, própria de crescimento secundário, com feixes vasculares melhor desenvolvidos

e regiões coradas pela safranina (em vermelho), indicando deposição de substâncias como lignina, suberina e cutina, por exemplo. Neste caso há uma maior proporção de tecidos lignificados.

Ao se utilizar reguladores de crescimento, estas substâncias poderão induzir a diferenciação, principalmente, em células do procâmbio (ALMEIDA et al., 2012). A formação da lignina está diretamente envolvida com a produção de compostos fenólicos, os quais, por meio de peroxidases, dão origem à lignina. Com a lignificação dos tecidos, o processo organogênico é concluído. Com a deposição de lignina nas células, as rediferenciações celulares são conduzidas por uma minoria de células competentes, havendo uma relação na diminuição de compostos fenólicos com a obtenção de respostas organogênicas desejadas (RAI; BOUDDHA; ANSARI, 2016).

É possível observar, na figura 8B, que as células do câmbio vascular apresentam deposição de lignina. Isto pode interferir na disponibilidade de células capazes de se rediferenciarem, por meio de estímulo de reguladores. Este processo de lignificação pode ter dificultado o contato dos reguladores de crescimento com as células competentes.

Para a rizogênese *in vitro*, houve diferença significativa, para porcentagem de enraizamentos, na interação entre tipos de auxinas (ANA e AIB) e suas diferentes concentrações. O melhor regulador foi o AIB e, dentre as concentrações utilizadas, destacaram-se as de 5 e 10 μM , nas quais foi observada uma maior formação de raízes em comparação aos explantes tratados com ANA (TABELA 8).

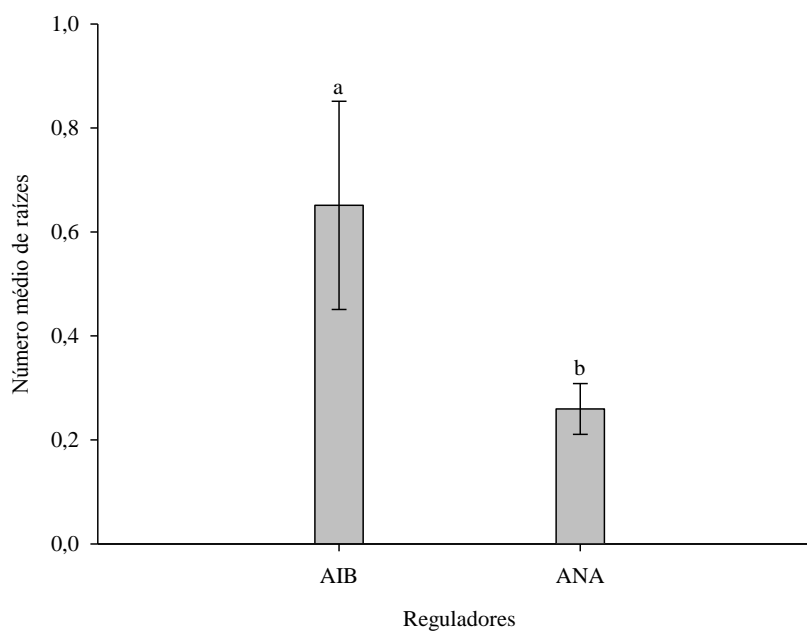
Tabela 8 - Enraizamento, *in vitro*, de *P. torta*.

Auxina	Concentração (μM)			
	0	1	5	10
AIB	20 \pm 0,10 Ba	20 \pm 0,04 Ba	45 \pm 0,15 Aa	65 \pm 0,04 Aa
ANA	20 \pm 0,01Aa	15 \pm 0,15 Aa	10 \pm 0,04 Ab	14 \pm 0,01 Ab

Letras maiúsculas diferentes diferem entre si na linha. Letras minúsculas diferentes diferem entre si nas colunas. Scott Knott ($p < 0,05$).

O número de raízes, também, apresentou diferença significativa para as diferentes auxinas, destacando o AIB para a indução do maior número de raízes (FIGURA 9). Porém, não houve diferença significativa entre os reguladores e concentrações estudadas.

Figura 9 - Média do número de raízes formadas ao utilizar-se AIB e ANA em explantes de *P. torta*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Skott Knott ($p < 0,05$).



Para o tamanho das raízes não houve diferença significativa (TABELA 8), com tamanho médio de 0,5 cm. Estes resultados corroboram com os encontrados para *Pouteria lucuma*, nos quais o AIB foi superior ao ANA quanto à porcentagem de enraizamento e o número de raízes, não apresentando diferenças entre as auxinas para o tamanho das raízes (PADILLA et al., 2006).

Tabela 9 - Média do tamanho de raiz de *P. torta*.

	Concentração (μM)			
	0	1	5	10
Tamanho raiz (cm)	0,17 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,4	0,7 \pm 0,1

Não foi obtido enraizamento *ex vitro* de nenhum explante, como consequência não houve sobrevivência de nenhum deles. Entretanto, foram observados cerca de 90% de sobrevivência dos explantes enraizados *in vitro* que foram aclimatizados (FIGURA 10).

Figura 10 - (A) Explante de *P. torta* enraizado *in vitro*. (B) Explantes enraizados *in vitro* após a aclimatização, com aproximadamente 3 meses. (C) Morte de todos os explantes enraizados *ex vitro* após 30 dias na casa de vegetação. Barras= 1 cm.



O cultivo *in vitro* oferece para o explante condições muito diferentes do ambiente externo, como baixa e constante luminosidade, temperatura controlada, alta umidade, ocasionando modificações anatômicas nos explantes, deixando-os menos adaptados às variações do ambiente externo. Por isso, a transição do meio *in vitro* para o ambiente *ex vitro* deve ocorrer de forma gradativa (PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001). Entretanto, explantes sem a presença de raiz para absorver água e nutrientes podem não conseguir se estabelecer fora do ambiente *in vitro*, assim como observado em *P. torta*.

Além da pré-disposição para lignificação, que pode ter interferido no contato do regulador com as células competentes, outros fatores podem ter influenciado o insucesso do enraizamento *ex vitro*. Dentre estes fatores destaca-se o tempo. Há explantes que necessitam de um maior tempo de imersão de suas bases, em soluções com auxinas, outros necessitam de um tempo maior, podendo este tempo variar de segundos a minutos (FERMINO-JUNIOR; RAPOSO; PEREIRA, 2011; PELIZZA et al., 2013), sendo necessário mais estudos visando ao enraizamento *ex vitro* para *P. torta*.

5 CONCLUSÕES

As características morfofisiológicas das sementes de *P. torta* demonstram que suas sementes são dispersas com 38,4% de teor de água, apresentando comportamento recalcitrante e tendo o amido como sua principal fonte de reserva. O peso de mil sementes é de, aproximadamente, 2.400g, com cerca de 417 sementes por quilo. Sua área corresponde a 2,55 cm², diâmetro máximo e mínimo com 2,49 cm e 1,28 cm, respectivamente, apresentando um perímetro de 7,57 cm. A germinação *ex vitro* da semente inicia-se por volta do 22º dia, não apresentando dormência física nas sementes.

Foi possível estabelecer um protocolo, para a micropropagação da espécie. A germinação *in vitro* de embriões inicia-se, em torno de 9 dias, quando inoculados em meio WPM, com maior velocidade de germinação na luz. A presença de BAP, TDZ ou BA, no meio de cultivo, induz a formação de calos na base de explantes, principalmente, na concentração de 1µM. Há uma maior porcentagem de formação e número de raiz quando utilizados 5 e 10 µM de AIB, sendo 90% do explantes enraizados *in vitro* aclimatizados com sucesso.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. et al. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: A histological study. **Plant Cell Report**, New York, v. 31, n. 3, p. 1495-1515, Aug. 2012.
- ALVES, T. M. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, May/June 2000.
- ALVES-ARAÚJO, A., SWENSON, U.; ALVES, M. A taxonomic survey of *Pouteria* (Sapotaceae) from the northern portion of the Atlantic Rainforest of Brazil. **Systematic Botany**, Laramie, v. 39, n. 3, p. 915-938, July 2014.
- AMARAL, J. B. et al. Teste de raios x para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 601-607, abr. 2011.
- ANDRADE, D. B. **Sistema de Análise de Sementes (SAS) na detecção de misturas varietais e de sementes esverdeadas em soja**. 2014. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. (Documentos, 58).
- BAKSHI, M.; TIWARI, C.; RAZVI, S. Conservation of an important montane bamboo *Thamnocalamus falconeri*, Hook.f.ex Munro through axillary bud proliferation. **The Journal of Forest Research**, Harbin, v. 26, n. 1, p. 179-185, Mar. 2015.
- BANSAL, Y. K.; CHIBBAR, T. Micropropagation of *Madhuca latifolia* Macb. through nodal culture. **Plant Biotechnology**, Nara, v. 17, n. 1, p. 17-20, Oct. 2000.
- BARBEDO, C. J.; MENDES-JUNIOR, J. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 12, n. 2, p. 145-164, jul. 1998.

BARTEL, B. et al. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: De novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 20, n. 3, p. 198-216, Nov. 2001.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994.

BOLETI, A. P. et al. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 7, p. 2653-2658, Mar. 2007.

BOLETI, A.P. A. et al. Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicon**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 1321-1330, June 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Alimentos regionais brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. [201-]. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

BRUNING, F. O; LÚCIO, A. D.; MUNIZ, M. F. B. Padrões para germinação, pureza, umidade e peso de mil sementes em análises de sementes de espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 193-202, abr./jun. 2011.

BUSINGEA, E. et al. The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 149, n. 2, p. 273-285, Oct. 2013.

CABRAL, J. R. S. et al. Physiological quality of guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk.) seeds during storage. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 6, n. 1, p. 127-133, Jan./Apr. 2013.

CAO, J. et al. Development of abamectin loaded lignocellulosic matrices for the controlled release of nematicide for crop protection. **Cellulose**, Dordrecht, v. 23, n. 1, p. 673-687, Feb. 2016.

CARNEIRO, C. E. et al. **Sapotaceae in Lista de espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB217>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 2000.

COSTA, T. S. A. et al. Composição de carotenoides em canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 903-906, set. 2010.

CRUZ, E. D. Quantitative characteristics of fruits and seeds of *Pouteria pachycarpa* Pires – Sapotaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 27, n. 2, p. 01-06, dez. 2005.

DORNELES, M. C. **Padrões de germinação dos diásporos e emergência das plântulas de espécies arbóreas do Cerrado, do Vale do Rio Araguari-MG**. 2010. 148 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ELIAS, S. T. et al. Cytotoxic effect of *Pouteria torta* leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, Mumbai, v. 9, n. 4, p. 601-606, Oct./Dec. 2013.

FELIPPI, M. et al. Fenologia reprodutiva e qualidade das sementes de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 12, p. 2137-2142, dez. 2015.

FERMINO-JÚNIOR, P. C. P; RAPOSO, A.; PEREIRA, J. E. S. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. **Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 79-86, jan./mar. 2011.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes**: Experimental Designs package R package version 1.1.1. 2011b. Disponível em: <<http://CRAN.Rproject.org/package=ExpDes>>. Acesso em: 11 jun. 2016.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da Universidade Federal de Ouro Preto**, Ouro Preto, v. 1, p. 1-9, nov. 2011a.

FLORIANO, E. P. **Germinação e dormência de sementes florestais**. Santa Rosa: ANORGS. 2004. (Caderno didático, n. 2).

FORTES, F. O. et al. Agrupamento em amostras de sementes de espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1615-1623, set. 2008.

FUENTEALBA, C. et al. Characterization of main primary and secondary metabolites and in vitro antioxidant and antihyperglycemic properties in the mesocarp of three biotypes of *Pouteria lucuma*. **Food Chemistry**, Oxford, v. 190, p. 403-411, Jan. 2016.

GAMA, L. U.; BARBOSA, A. A. A.; OLIVEIRA, P. E. A. M. Sistema sexual e biologia floral de *Pouteria ramiflora* e *P. torta* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 375-387, jul./set., 2011.

GASPAR, C. M.; NAKAGAWA, J. Influência do tamanho na germinação e no vigor de sementes de milheto (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 339-344, jan. 2002.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. (The background, v. 1).

GOMES, L. R. P.; FRANCESCHI, C. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasildium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 37, n. 2, p. 143-149, Apr./June, 2015.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; PENNINGTON, T. D. **World checklist and bibliography of Sapotaceae**. Kew: The Royal Botanical Garden, 2001.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de mato grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 5615-84, out./dez. 2003.

HOOKER, J. E. et al. The application of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagation systems: An opportunity to reduce chemical inputs. **Agricultural Science in Finland**, Jokioinen, v. 3, n. 3, p. 227-232, Jun. 1994.

HORWITZ, W.; LATIMER JUNIOR, G. W. (Ed.). **Official method of analysis**. 15th. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v. 1. p. 177-227.

JORDAN, M.; OYANEDEL, E. Regeneration of *Pouteria lucuma* (Sapotaceae) plants *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 31, n. 3, p. 249-252, Apr. 1992.

KELLER, E. R. J. et al. Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 913-926, Mar. 2013.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-155, jul. 2005.

KOBORI, N. N.; CICERO, S. M.; MEDINA, P. F. Teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 1 p. 125-133, 2012.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, mar./abr. 2010.

LEMPP, B. Avanços metodológicos da microscopia na avaliação de alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, p. 315-329, jun. 2007. Suplemento especial.

LIMA, M. R.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. S. *In vitro* multiplication from seeds and adult explants of two ornamental *Ruellia* (Acanthaceae) species of brazilian savanna (Cerrado). **Phyton**, Buenos Aires, v. 55, n. 2, p. 233-249, Dec. 2015.

LOBERANT, B.; ALTMAN, A. Micropropagation of plants. In: FLICKINGER, M. C. (Ed.). **Encyclopedia of industrial biotechnology**: bioprocess, bioseparation, and cell technology. New York: Wiley, 2010. p. 3499-3515.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 177-184, fev. 2002.

LONE, A, A. B. et al. Physical characterization of *Rhipsalis* (Cactaceae) fruits and seeds germination in different temperatures and light regimes. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 2, p. 367-373, Mar. 2016.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 1-2.

LOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MAFFRA, A. R. B. et al. Caracterização física e os efeitos da pré-embebição em água na germinação de sementes de *Trichilia claussenii* c. dc. (Meliaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 211-221, 2011.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, Mar. 1962.

MALTA, G. et al. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 417-425, Aug. 2013.

MARTINS, J. P. R. et al. Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 2, p. 138-146, abr./jun. 2013.

MARTINSI, L. M. et al. Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 3, p. 454-458, mar. 2011.

MAYER, A. C.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4. ed. Oxford: Pergamon, 1989.

MELLO, J. I. O. et al. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 4, p. 889-899, July/Aug. 2010.

MENDONÇA, D. et al. *In vitro* propagation of *Picconia azorica* (Tutin) Knobl. (Oleaceae) an Azorean endangered endemic plant species. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 37, n. 47, p. 1-10, Mar. 2015.

MOURA, N. F. et al. Variabilidade entre procedências e progênes de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 41, n. 97, p. 103-112, Mar. 2013.

MUKHERJEE, P. et al. Cryopreservation of Asian *Dioscorea bulbifera* L. and *D. alata* L. by vitrification: importance of plant growth regulators. **CryoLetters**, London, v. 30, n. 2, p. 100-111, Mar./Apr. 2009.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biologic Chemistry**, Bethesda, Md, v. 153, n. 2, p. 375-380, Feb. 1944.

NERY, F. C. et al. Efeito da temperatura e do tegumento na germinação de sementes de *Calophyllum brasiliense*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1872-1877, nov./dez., 2007.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (silva manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 1, p. 25-32, Jan./Fev. 2006.

OUTUKI, P. M. et al. A high performance liquid chromatography with ultraviolet method for *Eschweilera nana* leaves and their anti-inflammatory and antioxidant activities. **Pharmacogn Magazine**, Mumbai, v. 11, n. 43, p. 619-626, July/Sept. 2015.

PADILLA, I. M. G. et al. Micropropagation and effects of mycorrhiza and soil bacteria on acclimatization and development of lucumo (*Pouteria lucuma* R. and Pav.) var. La Molina. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Oxon, v. 42, n. 2, p. 193-196, Mar./Apr. 2006.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 234-239, ago. 2001.

PELIZZA, T. R. et al. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta 'xavante'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 333-337, mar. 2013.

PENNINGTON, T. D. **The genera of Sapotaceae**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1991.

PERFEITO, J.P. et al. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 3, p. 183-186, jul./set. 2005.

PINHAL, H. F. et al. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, jul. 2011.

RADEMACHER, W. Growth retardantes: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 501-31, June 2000.

RAI, E.; BOUDDHA, S.; ANSARI, S. A. Biochemical investigations during in vitro adventitious shoot regeneration in leaflet explants from nodal segments of a mature *Albizia procera* tree. **Journal of Forest Research**, [Amsterdam], v. 27, n. 3, p. 699-705, June 2016.

RODRIGUES, M. M.; MELO, M. D.; ALOUFA, M. I. Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 171-173, jan. 2006.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, New York, v. 32, n. 6, p. 741-757, June 2013.

SANTOS, E. M. et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de Bastão do Imperador em diferentes volumes de recipientes. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 1, p. 134-137, jan./fev. 2013.

SANTOS, R. F. E. P. et al. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 3, p. 367-373, jul./set., 2015.

SÃO PAULO. **Resolução SMA n° 21**, de 21 de novembro de 2001. Disponível em:
<http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/documentos/2001_Res_SMA_21.pdf> Acesso em: 03 maio 2015.

SHEMER, O. et al. Competency for shoot regeneration from Arabidopsis root explants is regulated by DNA methylation. **Plant Science**, Ireland, v. 238, p. 251-261, Sept.2015.

SILVA, C. A.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 2A, p. 501-9, abr./jun. 2009.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J.; ROSS, S. Phloroglucinol in plant tissue culture. **In Vitro Cellular Development Biology Plant**, [Amsterdam], v. 49, n. 1, p. 1-16, Jan. 2013.

SILVA, R. C.; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Técnicas para superação da dormência de sementes de guanandi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 49, n. 9, p. 719-727, set. 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/111002/1/2014-API-Elisa-PAB-Tecnicas.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

SILVA, R. S. et al. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*), the Swamp palm. **Flora**, Jena, v. 209, n. 1, p. 674-685, Nov. 2014.

SOLÍS-FUENTES J. A. et al. Mamey sapote seed oil (*Pouteria sapota*). Potential, composition, fractionation and thermal behavior. **Grasas Aceites**, Seville, v. 66, n. 1, p. 1-10, Jan./Mar. 2015.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, 61-88, May 1945.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, L. C. D. et al. Composição química e nutrientes em sementes das espécies florestais Pente de Macaco, Flor de Paca, Itaúba, Jatobá e Murici Manso. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 3, p. 478-483, maio/jun., 2012.

SOUZA, P. M. et al. O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, n. 4, p. 393-399, Mar. 2012.

SUGLA, T. et al. Micropropagation of *Pongamia pinnata* through enhanced axillary branching. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 43, n. 5, p. 409-414, Oct. 2007.

SWENSON, U.; BARTISH, I. V.; MUNZINGER, J. Phylogeny, diagnostic characters, and generic limitation of Australasian Chrysophylloideae (Sapotaceae, Ericales): Evidence from ITS sequence data and morphology. **Cladistics**, Oxon, v. 23, n. 3, p. 201-228, June 2007a.

SWENSON, U.; MUNZINGER, J.; BARTISH, I. V. Molecular phylogeny of *Planchonella* (Sapotaceae) and eight new species from New Caledonia. **Taxon**, Vienna, v. 56, n. 2, p. 329-354, May 2007b.

TIAN, B. et al. Physicochemical changes of oat seeds during germination. **Food Chemistry**, Kidlington, v. 119, n. 3, p. 1195-1200, Apr. 2010.

TORRA, J.; ROYO-ESNAL, A.; RECASENS, J. Germination ecology of five arable Ranunculaceae species. **European Weed Research Society**, Hoboken, v. 55, n. 5, p. 503-513, Oct., 2015.

VAZ, T. A. A et al. *Swartzia langsdorffii* Raddi: Morphophysiological traits of a recalcitrant seed dispersed during the dry season. **Seed Science Research**, Shaftesbury, v. 26, n.1, p. 47-56, Mar. 2016.

VÁZQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 69-87, 1993.