

Desenvolvimento de ipê-roxo em meios de cultura e concentrações de bap (6-benzilaminopurina) durante a etapa de multiplicação *in vitro*Chaiane Bassegio¹, Luciana Alves Fogaça¹, Paola Baltazar¹, Eduarda Emmel¹¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC, Campus Toledo, CEP 859000-001, Toledo, PR, Brasil.Email autor correspondente: xaya_xb@hotmail.com

Artigo enviado em 05/01/2017, aceito em 30/03/2017.

Resumo: O ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex. DC Mattos) esta na lista de espécies ameaçadas de extinção. A micropopagação é uma alternativa para maximizar a produção de mudas da espécie. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o desenvolvimento do ipê roxo em função de meios de cultura (MS, MS/2 e WPM) e doses de BAP (6-benzilaminopurina) (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. Os ensaios foram realizados no laboratório de Biotecnologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC, campus de Toledo. No primeiro ensaio, foram avaliadas a germinação e a contaminação das sementes, bem como altura de planta, número de folhas e raízes em função dos meios de cultura. No segundo ensaio, fase de multiplicação, as plantas obtidas do primeiro ensaio foram submetidas a doses de BAP, as quais avaliou-se a altura de plantas, número de folhas, brotos e raízes, comprimento de raiz, massa fresca e seca das plantas. Os meios de cultura WPM e MS são semelhantes em relação à porcentagem de germinação, com 81 e 76%, respectivamente. Em relação ao desenvolvimento inicial das plantas, o meio WPM promoveu maiores médias de altura (7,57 cm), número de folhas (6,77) e número de raízes (7,17). Na fase de multiplicação observou-se que para todas as variáveis analisadas, não houve diferença significativa. Portanto, conclui-se que os meios de cultura MS e WPM proporcionaram resultados semelhantes para germinação de sementes, no entanto, o WPM condicionou melhor desenvolvimento inicial das plantas. Na fase de multiplicação *in vitro* de ipê-roxo, não é necessária a suplementação do meio WPM com BAP na planta.

Palavras-chave: *Handroanthus impetiginosus*, micropropagação, reguladores de crescimento**In vitro development of purple ipê in different culture mediums and 6-benzylaminopurine concentrations**

Abstract: The purple ipê (*Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex. DC Mattos) is in the list of endangered species. Micropoping is an alternative to maximize the production of seedlings of the species. For this reason and considering the ecological, economic and medicinal importance, the present study aimed to evaluate the *in vitro* development of the Pink lapacho by using Murashige and Skoog medium (MS) and Woody Plant medium (WPM) and different concentrations of 6-Benzylaminopurine (BA) (0.0; 2.0; 4.0 and 8.0 mg L⁻¹). The tests were conducted in Biotechnology Laboratory of Pontifical Catholic University of Parana, Toledo Campus, Parana, Brazil. In the first test, initiation of tissue culture, we evaluated germination and contamination percentage, plant height, and number of leaf and roots. In the second test,

multiplication of shoots, the plants obtained in the first test were submitted to different BA concentrations and evaluated attending to plant height, number of leaves, shoots and roots, roots length, fresh weight and dry mass. Medium WPM and MS have shown similar results in relation to germination percentage with 81 and 76%, respectively. According to initial development of plants, WPM promoted greater media of height (7.57 cm), leaf number (6.77) and roots number (7.17). On the other hand, in the multiplication of shoots it was observed that for all the analysed variables there was no significant difference. Thus, it was concluded that the medium MS and WPM promoted similar results to seeds germination. However, WPM provided better initial development of plants. Thus, in the multiplication of pink lapacho is not needed the supplementation of the medium WPM with BAP in the plant.

Key words: *Handroanthus impetiginosus*, micropropagation, phytohormones

Introdução

O ipê-roxo *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex. DC Mattos) (sin. *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb) é uma espécie de grande importância econômica, medicinal e ecológica, nativa da Mata Atlântica, popularmente conhecida como: piúva, ipê-rosa, pau-d'arco, piúna, ipê-roxo, ipê-roxo-de-bola, ipê-una, ipê-roxo-grande, ipê-de-minas, piúna-roxa (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2003).

Na década de 60 e 70, a fama propagada, atribuindo a propriedade antitumoral aos extratos à base de casca de ipê-roxo, colocou a espécie na lista das espécies de risco de extinção (RIZZINI, 1976; FALKENBERG, 1999). Portanto, faz-se necessário a elaboração de estratégias de propagação e conservação dessa espécie.

O ipê-roxo é uma espécie que apresenta produção de mudas limitada pela baixa viabilidade das sementes, dessa forma, a micropropagação pode ser uma alternativa para maximizar esse processo (CARVALHO, 2003).

A propagação do Ipê é feita principalmente por sementes (OLIVEIRA et al., 2005), porém poucos estudos são realizados objetivando definir metodologias adequadas para avaliar a capacidade de germinação dessas sementes, visto que a germinação *in vitro*

de sementes proporciona a manutenção de uma variabilidade genética maior que qualquer outro método (BELLINTANI et al., 2007). Neste sentido, a técnica de micropropagação emerge como importante alternativa diante da perda da viabilidade das sementes após pouco tempo de coleta, aliada a possibilidade de multiplicação em qualquer época do ano em espaço de tempo curto (SOUZA et al., 2005).

Inúmeros meios de cultura são utilizados na micropropagação, cuja função principal é a nutrição e manutenção dos cultivos *in vitro*. Os meios de cultura são compostos de uma fonte de carbono, nutrientes minerais (macro e micronutrientes), vitaminas, substâncias reguladoras de crescimento e agentes gelificantes (MROGINSKI et al., 2004). Dentre as inúmeras formulações, a mais utilizada é a MS de Murashige e Skoog, publicada em 1962, para diferentes processos da cultura de tecidos, incluindo a micropropagação (SEREJO et al., 2006). No entanto, o meio MS não se mostra satisfatório em alguns casos, mas as composições mais diluídas dos sais apresentam melhor desempenho (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Assim, existem formulações específicas para determinadas espécies, como o meio Woody Plant Medium-WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), mais usual em espécies

lenhosas (CALDAS et al., 1998, GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Essa formulação apresenta 25% das concentrações dos íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, tendo sido amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (PASQUAL, 2001).

Para a multiplicação *in vitro*, além de meios de cultura a adição de reguladores de crescimento é importante para suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que foram isolados da planta matriz, bem como estimular o alongamento ou a multiplicação da parte aérea (CALDAS et al., 1998). Esses hormônios também chamados de citocininas participam na regulação de muitos processos na planta, incluindo divisão celular, morfogênese, maturação de cloroplastos crescimento celular e senescência (TAIZ; ZEIGER, 2004). Neste sentido, estes reguladores de crescimento auxiliam para a quebra da dominância apical e indução de gemas axilares (PÉREZ-TORNERO et al., 2000; HARTMANN, 2010), sendo que a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido a mais utilizada na indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e formação de grandes números de brotos e à alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (CALDAS et al., 1998).

Pimentel et al. (2012) com ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) e Máximo et al. (2009) e Pereira et al. (2015) com ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) com meio de cultura WPM destacaram a ineficácia do uso de BAP em segmentos nodais. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de ipê-roxo em função de meios de cultura (WPM e MS) e doses de BAP durante a etapa de multiplicação *in vitro*.

Material e Métodos

Os ensaios foram realizados no laboratório de Biotecnologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC, campus de Toledo. Nos ensaios, foram utilizadas, como plantas doadoras de sementes o Ipê-roxo, coletados em plantas matrizes localizadas na praça na Avenida Cirne Lima, Jardim Coopagro, em Toledo/PR. As sementes foram coletadas no mês de agosto e deixadas para secar por um período de duas semanas no laboratório ao ar livre e acondicionadas sob baixa temperatura.

No laboratório, as sementes foram mantidas por 12 minutos em solução contendo 100 ml de água + 100 ml Hipoclorito (2%) + Tween 20 (6 gotas) com pH aferido em 6. Em seguida, as sementes foram levadas para a câmara de fluxo e mantidas em álcool 70% por 3 minutos. Por fim, foi realizada a tríplice lavagem com água destilada e autoclavada.

Após a assepsia, as sementes foram inoculadas em diferentes meios nutritivos (MS, MS/2 e WPM). Os meios de cultura (MS, MS/2) foram preparados conforme o protocolo estabelecido por Murashige e Skoog (1962), enquanto que o meio de cultura WPM por Lloyd e McCown (1981). O pH foi ajustado para 5,8 anteriormente autoclavagem a 120°C por 15 minutos. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas no escuro por uma semana na sala de crescimento do laboratório, com temperatura controlada $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as mesmas foram transferidas para luz, a fim de estimular a germinação. Assim que as sementes iniciaram o processo de germinação foram avaliadas a cada 2 dias. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de sementes germinadas e contaminadas.

No segundo experimento as plantas obtidas da germinação de sementes nos meios MS, MS/2 e WPM com 30 dias de

inoculação foram transferidas para meios de cultura contendo concentrações de BAP (0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹).

Os parâmetros avaliados nesse segundo experimento foram: altura de plantas e comprimento de raiz, com o auxílio de uma régua graduada; número de folhas, raízes e brotos a partir da contagem individual por planta. Após, as plantas foram pesadas em balança de precisão de 0,01 g, obtendo assim a massa fresca (MF), e logo em seguida as plantas foram acondicionadas em sacos de papel e deixadas na estufa até peso constante, obtendo a massa seca (MS).

Os resultados foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e ajustados em regressão ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os meios de cultura WPM e MS foram semelhantes em relação à porcentagem de germinação, com 81 e 76%, respectivamente. Em relação à contaminação, observa-se que os meios de cultura não proporcionaram diferença significativa na germinação das plantas, apesar do MS apresentar menos de 1% de contaminação. Já o meio MS/2 e WPM, observou-se 1,5 e 1,25% de plantas contaminadas, respectivamente (Figura 1).

Apesar da escassez de informações científicas sobre o meio MS/2 na micropropagação do Ipê-roxo, nas condições estudadas o meio não foi efetivo na germinação das plântulas. O meio de cultura WPM apesar de proporcionar na maioria dos dias menos plantas germinadas em relação ao meio MS, foi comparável no final dos dias. Uma possível explicação é pela presença de 25% das concentrações dos íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, tendo sido amplamente utilizado para a

micropropagação de espécies lenhosas (PASQUAL, 2001).

A contaminação pode comprometer a micropropagação em qualquer fase do cultivo *in vitro* (SOUZA et al., 2006). Segundo Bertozzo e Machado (2010) a contaminação é mais frequente em explantes advindos de plantas cultivadas em campo, considerado um problema para o estabelecimento de muitas espécies *in vitro*. De acordo com observações de Litz e Conover (1978), quando os explantes são retirados de plantas cultivadas em campo e introduzidos *in vitro*, a taxa de contaminação microbiana pode chegar a 95%, mesmo após a descontaminação, o que não foi observado no presente estudo. Uma possível explicação para o fato é devido a perfeita assepsia e pela utilização de sementes para propagação, o que reduz as chances de contaminações em relação a outros propágulos.

Em relação ao crescimento inicial das plantas em função dos meios de cultura, observou-se que com exceção do número de raízes, as demais características foram influenciadas significativamente ($p < 0,05$) pelos meios de cultura (Figura 1). A altura de plantas no meio de cultura WPM sobrepôs significativamente em 67 e 63% os meios MS/2 e MS, respectivamente. Em contrapartida, apesar do meio WPM apresentar acréscimo de 40 e 64% e maiores médias absolutas para o número de folhas e raízes, respectivamente, em relação ao meio MS, não se observou diferença estatística entre os meios.

A tendência de maior crescimento inicial das plantas com utilização do meio de cultura WPM, está associada a maior indicação do meio WPM para espécies lenhosas (CALDAS et al., 1998, GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001), assim como observado para o ipê-roxo no presente estudo, ao promover maior crescimento inicial.

Apesar dos bons resultados de crescimento inicial observado no meio de

cultura WPM, na segunda fase do experimento, onde foram adicionadas as doses de BAP, houve contaminação, o que impossibilitou a avaliação e análises estatísticas neste meio.

O uso de BAP prejudicou o crescimento da planta (altura) e o sistema radicular (nº de raízes) no meio de cultura MS, assim comprovado com ajuste significativo da regressão e coeficiente de determinação aceitável (Tabela 2), visto que para sistemas *in vitro* consideram-se altos os valores de R² compreendidos entre 0,5 e 0,9 (COMPTON, 1994). Já o número de folhas foi expresso através de equação quadrática significativa ($\hat{y}=0,18x^2+0,92x+7,05$), cuja dose de 2,5 mg L⁻¹ de BAP resultou em 8 folhas (Tabela 2).

A redução da altura de plantas e o sistema radicular aliado ao aumento de folhas nas plantas com utilização de doses de BAP no meio de cultura MS observado no presente estudo, coincidem com outros

autores. Fermino Junior e Scherwinski-Pereira (2012) ao trabalharem com cerejeira (*Amburana acreana*), observaram que a maior altura de brotos foram aqueles isento de regulador ou com 0,25 mg.L⁻¹ de BAP, e as maiores concentrações de BAP aplicadas exogenamente tendem a desenvolver brotos com menor altura. Lopes et al. (2012) ao estudarem doses de BAP (0,5 a 3 mg L⁻¹) em pinhão manso (*Jatropha curcas*), também observaram que 2 mg L⁻¹ proporcionou maior número de folhas. No entanto, Fermino Junior e Scherwinski-Pereira (2012) com (*Amburana acreana*) observaram maior número de brotos com a concentração de BAP de 4,0 mg.L⁻¹. Na multiplicação *in vitro* de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*), Ribas et al. (2005), observaram que o uso de BAP nas concentrações de 1 a 4,0 mg.L⁻¹ promoveu eficiente formação de brotações a partir de segmentos nodais.

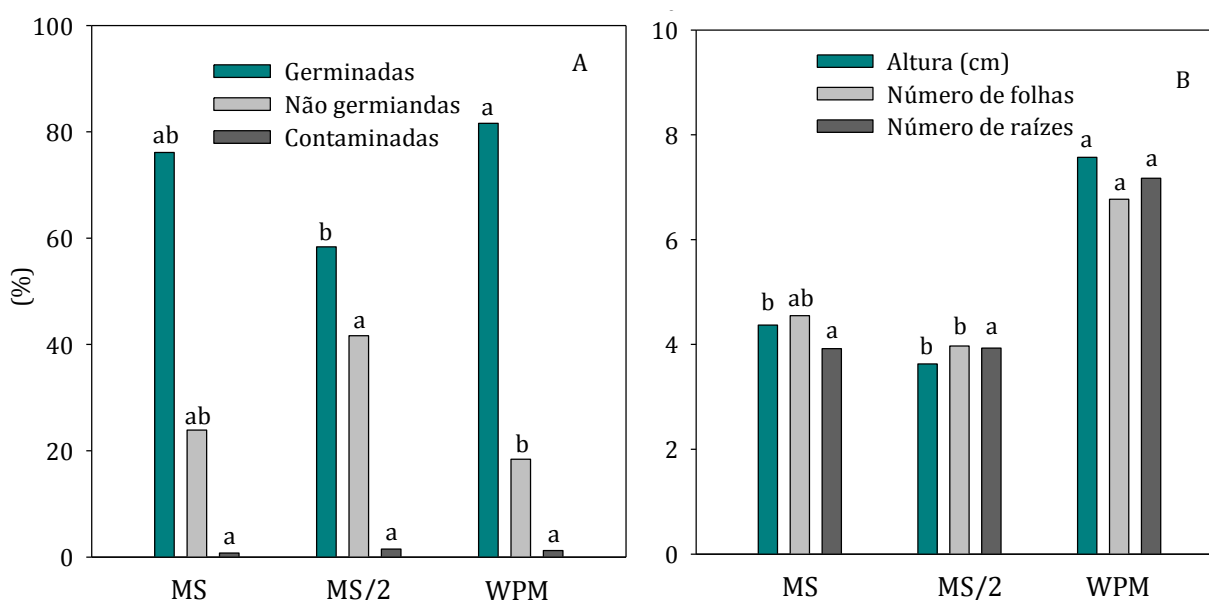


Figura 1. Plantas germinadas, não germinadas, contaminadas (A), altura de plantas, número de folhas e raízes (B) em função dos meios de cultura. Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Altura de plantas, número de folhas e número de raízes em função de doses de BAP na semente em meio de cultura MS.

BAP mg L ⁻¹	Altura (cm)	Número de folhas	Número de raízes
0	7,15	6,75	3,75
2	4,62	9,00	0,50
4	6,50	7,25	0,25
8	1,66	3,00	0,00
Regressão	35,12 ** (1)	10,81 ** (2)	9,20 * (3)

Médias seguidas por letras minúsculas distintas, nas colunas, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ******= regressão significativa a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. R²=coeficiente de determinação. (1) $\hat{y} = -0,6067x+7,10$; R²=0,70. (2) $\hat{y} = -0,18x^2+0,92x+7,05$; R²=0,93; x máx.=2,55; y máx.=8,24. (3) $\hat{y} = -0,3929x+2,5$; R² = 0,58.

Quando observado a utilização de BAP no meio de cultura MS/2 (Tabela 3), verificou-se que assim como no meio de cultura MS, a altura de plantas e o número de raízes não foram beneficiados pelo uso de BAP, apesar da baixa determinação (R²) e da comparação de médias. Diferentemente do comportamento das demais variáveis analisadas, o número de folhas de plantas que foram cultivados no meio MS/2 com dose de 8 mg L⁻¹ de BAP se sobressaíram.

Uma provável causa, é que a citocinina (BAP) tende a promover maior brotação e número de folhas (ROUT et al., 2000; VANGADESAN et al., 2002; CAMPOS et al., 2007) e reduzir a altura da planta. No entanto, alguns estudos (LOPES et al., 2012; FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012) apontam para o efeito inibitório de altas de concentrações de BAP sobre o crescimento de espécies lenhosas.

Tabela 3. Altura de plantas, número de folhas e número de raízes em função de doses de BAP na semente em meio de cultura MS/2.

BAP	Altura (cm)	Número de folhas	Número de raízes
0	7,12	7,00	5,75
2	4,00	8,00	0,25
4	2,50	5,50	0,00
8	4,25	17,25	0,00
Regressão	29,62 ** (1)	6,06 * (2)	47,41 ** (3)

Médias seguidas por letras minúsculas distintas, nas colunas, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ***** e ******= regressão significativa a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. R²=coeficiente de determinação. (1) $\hat{y} = -0,30x+5,52$; R² = 0,28. (2) $\hat{y} = 1,25x+5,05$; R² = 0,65. (3) $\hat{y} = -0,58x+3,55$; R² = 0,49.

Em relação ao experimento 2, onde as plantas foram transferidas para tubos com as doses de BAP (Tabela 4), observou-se que para todas as variáveis analisadas (altura de plantas, número de folhas,

número de raízes, número de brotos, comprimento de raiz, massa fresca e massa seca), não houve diferença significativa (p ≤ 0,05) e coeficiente de determinação significativo para as doses de BAP.

Na fase de multiplicação, os resultados obtidos no presente estudo, se alinham aos de Pimentel et al. (2012), que ao trabalharem com ipê-roxo e doses de BAP (1,5 e 3 mg L⁻¹) também com meio de cultura WPM, não observaram efeito significativo nas variáveis analisadas. Máximo et al. (2009) também observaram que o emprego de BAP (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µmol.L⁻¹) não favoreceu a indução de brotos em explantes de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). Os resultados do presente trabalho também estão em concordância com os obtidos por Pereira et al. (2015), que ao trabalharem com de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*), verificaram que a presença de BAP no meio nutritivo não é benéfica à

multiplicação *in vitro* das plântulas de ipê-amarelo. Ainda segundo os autores, a adição do BAP diminui a porcentagem de explantes estabelecidos, o enraizamento e, também, a formação de brotações, além de aumentar, consideravelmente, a formação de calos.

Apesar dos resultados obtidos no presente estudo demonstrarem tendência de eficiência do uso de BAP nas sementes em comparação com uso posterior somente na multiplicação, como também observado por outros autores, são necessários estudos acerca do assunto, com outros meios de cultura e diferentes suplementações, a fim de cobrir algumas lacunas que ainda restam.

Tabela 4. Altura de plantas, número de folhas, número de raízes, número de brotos, comprimento de raiz, massa fresca (MF) e massa seca (MS) em função de doses de BAP em meio de cultura WPM na planta.

BAP	Altura cm	Folhas nº	Raiz cm	Broto cm	Comp. raiz cm	MF g	MS g
0	4,37	8,75	7,50	2,50	11,37	0,47	0,02
2	5,37	9,25	6,75	2,25	11,25	0,68	0,03
4	6,12	6,00	5,00	1,75	8,12	0,52	0,05
8	5,25	6,25	9,50	2,00	12,75	0,83	0,06
Regressão	0,23 ns	0,91 ns	0,35 ns	1,47 ns	0,01 ns	0,67 ns	2,10 ns

Médias seguidas por letras iguais nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns=regressão não significativa a 5% de probabilidade.

Conclusão

Os meios de cultura MS e WPM proporcionam semelhante germinação de plantas, no entanto, o WPM condiciona melhor desenvolvimento inicial do ipê-roxo.

Na fase de multiplicação *in vitro* de ipê-roxo, não é necessária a suplementação do meio WPM com BAP na planta.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; DE SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia-Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1101-1103, 2007.

- BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) in vitro. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.
- CALDAS, L.S.; HARISADAN, P.; FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ. v.1. p.87-132, 1998.
- CAMPOS, R. A. S.; AÑEZ, L. M. M.; DOMBROSKI, J. L. D.; DIGNART, S. L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Mull. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, v. 9, n. 3, p. 30- 36. 2007.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Curitiba: Embrapa-CNPQ/SPI, 2003. v.1. 1039p.
- COMPTON, M. Statistical methods suitable for analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 37, n.3, p. 217-242,1994.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. 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, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C. et al. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, p.99-169. v. 1, 1998.
- HARTMANN, H. T. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 915 p, 2010.
- LITZ, R.E.; CONOVER, R. In vitro propagation of papaya. **HortScience**, Alexandria, v.13, p.241-242, 1978.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montaim laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combinet Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.
- LOPES, L. C.; MACHADO, I. S.; MAGOGA, E. C.; ANDRADE, J. G.; PENNA, H. C.; MORAES, L. E. F. Cultura de embrião e indução de brotos *in vitro* para micropropagação do pinhão manso. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.47, n.7, p.900-905, 2012.
- MÁXIMO, W. P. F.; SANTOS, B. R.; MARTINS, J. P. R.; BARBOSA, S. **Multiplicação in vitro de Ipê-amarelo**; Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG, 2009.
- MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. **Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales**. In: ECHENIQUE, V. et al. Biotecnología y mejoramiento vegetal. INTA: Consejo Argentino para La Información y el Desarrollo de la Biotecnología. p.35-42, 2004.
- OLIVEIRA, L. D.; CARVALHO, M. D.; SILVA, T. D. A.; BORGES, D. I. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. - Bignoniaceae. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.642-648, maio/jun. 2005.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 127 p, 2001.
- PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; Multiplicação in vitro de

ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*).
Nativa, Sinop, v. 03, n. 01, p. 59-63, 2015

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n.2, p.133-141, 2000.

PIMENTEL, N.; HEBERLE, M.; KIELSE, P.; LENCINA, K. H.; BISOGNIN, D. A.; FISCHER, H. Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação in vitro de Ipê-roxo. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Bento Gonçalves – RS. **Anais...** Bento Gonçalves: 2012. p.1.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU, Ed. da Universidade de São Paulo, 207 p, 1976.

ROUT, G. R.; SAMATARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology and Advances**, v. 18, n. 2, p. 91- 120, 2000.

SEREJO, J. A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. **Meios nutritivos para micropropagação de plantas**. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. Introdução à micropropagação de plantas. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p 80-97, 2006.

SOUZA, V. C., ANDRADE, L. A.; BRUNO, R. L. A.; CUNHA, A. O.; SOUZA, A. P. Produção de Mudas de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich.) em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Agropecuária Técnica**, Areia, p.98-108, v.26, n.2, 2005.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VANGADESAN, G. *In vitro* propagation of *Acacia* species- a review. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p. 663-671, 2002.