



RAQUEL MESQUITA

**GERMINAÇÃO *in vitro* DE *Comanthera nitida* (Bong.) L.R.Parra
& Giul**

**LAVRAS - MG
2019**

RAQUEL MESQUITA

GERMINAÇÃO *in vitro* DE *Comanthera nitida* (Bong.) L.R.Parra & Giul

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Licenciado.

Prof. Renato Paiva, PhD
(Orientador)
Prof.(a) Dr^a. Michele Valquíria dos Reis
(Coorientadora)

**LAVRAS - MG
2019**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - PRO-REITORIA DE GRADUAÇÃO
 (ATA DE DEFESA - PARTE 1 DE 2)
G020 - CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (LICENCIATURA PLENA)
 PRG520 - MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO	CULTIVO IN VITRO DE COMANTHERA NITIDA (BONG.) L.R.PARRA GIUL		
TÍTULO ALTERADO			
DISCENTE	RAQUEL MESQUITA	MATRICULA	201511146
LOCAL: DBI 03; DATA: 06/12/2019; HORÁRIO: 16h00min			
RENATO PAIVA - DBI - PRESIDENTE(A)			
(X1) TRABALHO ESCRITO (DE 0 A 40 PONTOS) ⁽¹⁾	NOTA:	36	
(X2) APRESENTAÇÃO ORAL (DE 0 A 30 PONTOS) ⁽²⁾	NOTA:	30	
(X3) DEFESA DO TRABALHO (DE 0 A 30 PONTOS) ⁽³⁾	NOTA:	24	
ASSINATURA: <i>Renato Paiva</i>	(N1) NOTA (X1+X2+X3):	90	
MICHELE VALQUÍRIA DOS REIS - DAG - PRIMEIRO(A) MEMBRO(A)			
(X4) TRABALHO ESCRITO (DE 0 A 40 PONTOS) ⁽¹⁾	NOTA:	36	
(X5) APRESENTAÇÃO ORAL (DE 0 A 30 PONTOS) ⁽²⁾	NOTA:	30	
(X6) DEFESA DO TRABALHO (DE 0 A 30 PONTOS) ⁽³⁾	NOTA:	24	
ASSINATURA: <i>Michele</i>	(N2) NOTA (X4+X5+X6):	90	
DIOGO PEDROSA CORRÊA DA SILVA - DAG - SEGUNDO(A) MEMBRO(A)			
(X7) TRABALHO ESCRITO (DE 0 A 40 PONTOS) ⁽¹⁾	NOTA:	36	
(X8) APRESENTAÇÃO ORAL (DE 0 A 30 PONTOS) ⁽²⁾	NOTA:	30	
(X9) DEFESA DO TRABALHO (DE 0 A 30 PONTOS) ⁽³⁾	NOTA:	24	
ASSINATURA: <i>Diogo Pedrosa</i>	(N3) NOTA (X7+X8+X9):	90	
(NF) NOTA FINAL	(NF) NOTA FINAL ((N1+N2+N3)/3):	90	

Eu, RAQUEL MESQUITA, declaro perante a Universidade Federal de Lavras: i) que, sob as penas da lei, criei legalmente o presente trabalho; ii) que digitalizarei as páginas desta ata e as entregarei para guarda provisória de meu orientador, caso seja servidor da UFLA ou ao docente responsável pela disciplina caso meu orientador seja colaborador externo. (Arquivamento mantido até o registro de notas, após isto o discente poderá solicitar a devolução da ata original, caso contrário a ata será arquivada pelo orientador ou responsável pela disciplina por 1 ano e descartada).

Raquel Mesquita

Assinatura de RAQUEL MESQUITA, Lavras - MG, 06/12/2019.

Creridos avaliativos por item: (1) Fundamentação teórica; atendimento as normas de formatação; abrangência e profundidade de conteúdo; sequência e concatenação lógica de ideias; habilidade em expor o assunto em linguagem clara e acessível; e capacidade de síntese, de crítica e de objetividade. (2) Domínio do conteúdo; sequência e clareza ao apresentar o trabalho; domínio didático, linguagem culta; e adequação ao tempo. (3) Capacidade de defender as proposições do trabalho valendo-se de argumentos pertinentes; capacidade de responder as perguntas com clareza e objetividade; capacidade de convencer por meio de exposições técnicas e científicas.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRO-REITORIA DE GRADUAÇÃO

**ATA DE DEFESA DE PRG520 - MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO
G020 - CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (LICENCIATURA PLENA)
(ATA DE DEFESA - PARTE 2 DE 2)**

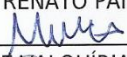
No dia 06/12/2019, às 16h00min, no(a) DBI 03, nesta universidade, foi realizada a defesa pública de PRG520 - MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO do(a) discente RAQUEL MESQUITA, matrícula 201511146, com o trabalho intitulado CULTIVO IN VITRO DE COMANTHERA NITIDA (BONG.) L.R.PARRA GIUL. Em caso de alteração, o novo título é:

Cultivo in vitro de Comanthera nitida (Bong.) L.R. Parra Giul.

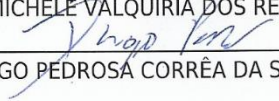
A Banca Examinadora, composta por: RENATO PAIVA (DBI) como presidente(a), MICHELE VALQUÍRIA DOS REIS (DAG) como primeiro(a) membro(a) e DIOGO PEDROSA CORRÊA DA SILVA (DAG) como segundo(a) membro(a); procedeu a arguição, após o término da defesa, os componentes da banca reuniram-se para avaliação e deliberação, considerando o trabalho: APROVADO (aprovado; aprovado com correções; reprovado) com nota final: 90 (noventa). Para constar, eu RENATO PAIVA lavrei a presente ata, que vai datada e assinada por mim e demais integrantes. Lavras (MG), 06/12/2019.



RENATO PAIVA



MICHELE VALQUÍRIA DOS REIS



DIOGO PEDROSA CORRÊA DA SILVA

Dedico este trabalho ao meu avô materno João Gomes Sales (in memoriam), por seu maravilhoso exemplo de amor e dedicação. Estará sempre em meu coração!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho e tudo que alcancei até aqui, só foram possíveis graças ao amor, apoio e esforço de minha mãe Mercedes e meu pai Antonio Carlos; a eles devo muito mais do que serei capaz de recompensar.

Ao meu irmão Alexandre pelo amor, apoio e pelo exemplo de ética e competência.

Meus agradecimentos a Universidade Federal de Lavras, ao Setor de Fisiologia Vegetal e ao curso de Ciências Biológicas – Licenciatura por me conceder a oportunidade de adquirir novos conhecimentos e coloca-los em prática.

Ao Professor Renato Paiva, gratidão por me abrir as portas do LCTP e permitir meu contato não apenas com a vivencia e o aprendizado das atividades de um laboratório e da cultura de tecido de plantas, mas também a honra de conhecer pessoas tão diferentes entre si, mas detentoras de personalidades, caráter e ética maravilhosos.

A professora Dr^a. Michele, ao Pós-doc. Diogo e a Dr^a. Júnia por toda a paciência e por proporcionar grande parte do conhecimento que tenho hoje, pelas risadas e correções também.

Aos primeiros amigos que a UFLA me proporcionou, Lucas, Heverton, Bruna e Susane e aqueles que ao longo do curso de Biologia fui tendo a oportunidade de conhecer, com suas loucuras e peculiaridades, mas insubstituíveis.

As pessoas maravilhosas e “estranhas” do LCTP, Di, Mi, Afonsinho, Jud, Carol, Let, Brunete, Bea, Isra, Josi, Mateus e Lucas pelo companheirismo, amizade, risadas, discussões e ensinamentos.

A todos os amigos, professores e colegas que contribuíram para o meu crescimento e desenvolvimento.

In memoriam de Naome por sua resistência e delicadeza em relação as turbulências do mundo.

In memoriam da democracia, mas esperançosa de sua ressurreição.

RESUMO

A espécie de sempre-viva *Comanthera nitida* (Bong.) L.R.Parra & Giul, pertencente à família *Eriocaulaceae* Martinov, possui, assim como as demais sempre-vivas, a peculiaridade de manter a estrutura morfológica de seu escapo e inflorescência intactas, mesmo após a excisão da planta matriz, por um longo período de tempo. Esta característica, lhe confere importância econômica no setor de floricultura, no mercado interno e externo. Porém, seu habitat natural, os campos rupestres, tem sido antropizado, devido ao manejo inadequado por parte da população tradicional e a devastação da região para fins do agronegócio. Estudos sobre germinação *in vitro* da espécie *C. nitida*, não foram apresentados até o momento. Portanto, no presente trabalho, objetiva-se avaliar formas de assepsia e meio de germinação *in vitro*. Verificando as variáveis: diferentes tempos de submersão em hipoclorito de sódio, tipos de meio de cultivo e a concentração dos seus sais, diferentes concentrações de sacarose, o melhor pH e concentração de ágar. Foi desenvolvido um procedimento de solidificação do ágar em baixo pH, sendo analisado o pH inicial e o pH final, com o objetivo de avaliar a estabilidade da acidez do meio de cultivo, antes e após a autoclavagem, para subsequente realização de teste de germinação. Os melhores resultados, foram obtidos a partir da desinfestação em qualquer um dos tempos estipulados, 10 e 15 minutos, em hipoclorito de sódio a 2,5%. A germinação sobressaiu em meio WPM^{1/2}, com 15 gL⁻¹ de sacarose, em pH 3,8, na concentração de 7 gL⁻¹ de ágar. O procedimento realizado para solidificação do ágar, em baixo pH foi efetivo.

Palavras – chave: Campo rupestre, acidez, sempre-viva, pH, meio de cultivo.

ABSTRACT

The ever-living species *Comanthera nitida* (Bong.) LRParra & Giul, belonging to the Eriocaulaceae Martinov family, has, as well as the other always-alive species, a peculiarity of keeping the escape morphology and inflorescence intact, even after the excision of the matrix. plant for a long time. This resource gives economic importance in the floriculture sector, in domestic and foreign markets. However, their natural habitat, the rupestrian fields, was anthropized due to the management of part of the traditional population and the devastation of the region to agribusiness fins. *In vitro* germination studies of *C. nitida* species have not been presented so far. Therefore, in the present work, the objective is to evaluate forms of asepsis and *in vitro* germination medium. Verifying as variables: different submersion times in sodium hypochlorite, types of culture medium and its salt concentration, different sucrose levels, the best pH and agar concentration. It was developed as a low pH solidification procedure, and the initial and final pH were analyzed, in order to evaluate the acidity stability of the culture medium, before and after autoclaving, for subsequent germination test. The best results were obtained from disinfection at any of the stipulated times, 10 and 15 minutes, in 2.5% sodium hypochlorite. A spare germination in WPM^{1/2} medium with 15 gL⁻¹ sucrose at pH 3.8 at 7 gL⁻¹ agar concentration. The procedure performed for agar solidification at low pH was effective.

Key words: Rupestrian field, acidity, evergreen, pH, culture médium.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Campos rupestres.....	11
2.2	<i>Eriocaulaceae: Comanthera nitida</i>	11
2.3	Subsistência e comércio	12
2.4	Cultivo <i>in vitro</i>	12
3	OBJETIVOS.....	15
3.1	Geral	15
3.2	Específicos.....	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1	Assepsia e germinação em diferentes meios de cultivo	16
4.2	Germinação com diferentes meios de cultivo e concentrações de sacarose.....	16
4.3	Solidificação do ágar em baixo pH.....	17
4.4	Germinação em diferentes pHs e concentrações de ágar	18
4.5	Análise estatística	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1	Assepsia e germinação em diferentes meios de cultivo	19
5.2	Germinação com diferentes meios de cultivo e concentrações de sacarose.....	20
5.3	Solidificação do ágar em baixo pH.....	21
5.4	Germinação em diferentes pHs e concentrações de ágar	23
	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies de plantas, de interesse econômico, possuem também, papel social na manutenção de comunidades tradicionais, além, de funções ecológicas, que devem ser resguardadas. Uma destas espécies é a *Comanthera nitida*, uma sempre-viva, que como as demais, possui a peculiaridade de manter a estrutura morfológica de seu escapo e inflorescência intactas, mesmo após a excisão da planta matriz. Conhecida popularmente como sapatinho, possui sua área de ocorrência associada às regiões de campos rupestres.

Apesar de parte dos campos rupestres se encontrarem em unidades de conservação (UC), muito de sua área de ocorrência, vezes associado ao Cerrado e a Caatinga, está desprotegida. A mercê de ações antrópicas em larga escala, sem a devida preocupação com as questões de proteção e conservação da flora.

Considerando as condições atuais deste ambiente, e sua conseqüente ameaça para a manutenção da espécie *C. nitida*, é preciso que mecanismos de conservação além de *in situ*, sejam apresentadas. Um destes mecanismos é a conservação *in vitro*, que visa o estabelecimento, conservação e multiplicação de plantas em laboratório, em meio asséptico, podendo ser utilizada para a manutenção de bancos de germoplasma, outra ferramenta importante para a conservação da flora.

As técnicas que permitem o manuseio do material vegetal *in vitro*, variam de acordo com a finalidade e a espécie a ser trabalhada. Para algumas espécies, como a *C. nitida*, podem ser utilizadas sementes, a fim de se obter plântulas normais, em condições assépticas. Esta técnica só é possível, devido as características das sementes desta espécie: pequenas, de fácil manipulação e armazenamento. Porém, possui como qualquer outra espécie, características específicas, oriundas de mecanismos evolutivos, que exigem o conhecimento de variáveis ambientais. As variáveis edáficas, por exemplo, são muito importantes, já que as condições do solo de campos rupestres tendem a ter baixo pH, pouca disponibilidade de nutrientes e baixa capacidade de retenção de água.

Devido a estas características, algumas variáveis precisam ser avaliadas no meio de cultivo *in vitro*, de forma a condicionar as sementes em um ambiente mais próximo do ideal e assim, permitir os melhores resultados de germinação. Dentre as variáveis, podem ser avaliados o tipo de meio de cultivo, a concentração de sais além do pH. Diante disso objetivou-se desenvolver um protocolo de germinação *in vitro* para manutenção e conservação do germoplasma *ex situ* de sementes de *Comanthera nitida*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Campos rupestres

Campos rupestres são ecossistemas raros que ocorrem em ambientes de transição, como em áreas de Cerrado e Caatinga, porém possuem flora distinta da vegetação dominante e solo formado a partir de quartzito ou rochas ígneas (RODELA, 1998).

Geralmente ocorrem acima de 900m de altitude possuindo um ambiente com grandes amplitudes térmicas, solos com baixo pH variando de 3,5 a 4, pouca disponibilidade de nutrientes e baixa capacidade de retenção de água (BENITES, 2003; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; RAPINI et al., 2008).

Os campos rupestres de formação quartzítica ocorrem principalmente ao longo das formações da Cadeia do Espinhaço, Chapada dos Veadeiros e Chapada dos Guimarães, comumente associados ao Cerrado. Essas áreas apresentam grande número de endemismo e riqueza de espécies, fatores marcantes para a conservação deste ecossistema (BENITES et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2015). Sua vegetação é herbácea-arbustiva destacando famílias como *Eriocaulaceae*, *Poaceae*, *Cyperaceae*, *Xyridaceae* e *Asteraceae* (BENITES et al., 2003).

2.2 *Eriocaulaceae*: *Comanthera nitida*

O táxon *Eriocaulaceae* Martinov, é uma família pantropical de campos rupestres que possui cerca de 1.400 espécies distribuídas em 10 gêneros (GIULIETTI et al., 2012; SANO et al., 2015), sendo a Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e Bahia seu principal centro de diversidade (GIULIETTI; HENSOLD, 1990; STÜTZEL, 1998).

Entre os gêneros, encontra-se a *Comanthera* spp. (L.B.Sm.) Parra & Giul. que apresenta 43 espécies distribuídas na Venezuela, Colômbia e principalmente no Brasil, tendo algumas de suas espécies consideradas como sempre-vivas (ECHTERNACHT, 2014; PARRA et al., 2010; PEREIRA; RIBEIRO; GIULIETTI, 2016).

Dentro do gênero *Comanthera* ocorre a *Comanthera nitida* (Bong.) L.R.Parra & Giul, conhecida popularmente como sapatinho, esta espécie é nativa e mantém sua área de vida dentro do estado de Minas Gerais, portanto, endêmica, (FLORA DO BRASIL 2020 - REFLORA, 2019; SANO et al., 2015). Caracterizada por rizoma glabro, folhas dispostas em roseta com cerca de 1,5 a 2,5 cm de comprimento, glabras na face adaxial e pilosas a glabrescentes na face abaxial, além de escapos com tricomas malpighiáceos e inflorescências capituliformes, com

vistas brácteas, que lhe conferem características desejadas para comercialização (PARRA et al., 2010; REFLORA, 2019; SANO et al., 2015).

2.3 Subsistência e comércio

As sempre-vivas, como a *C. nitida* possuem a singularidade de manter a estrutura morfológica intacta, aparentando vivacidade, mesmo após a excisão do escapo da planta matriz (BEDÊ et al., 2017). Tal característica as transformam em um produto ideal na ornamentação para a confecção de arranjos florais (BEDÊ et al., 2017; OLIVEIRA; CRUZ; TANAKA, 2014).

As inflorescências juntamente com seus respectivos escapos são colhidas e dessecadas ao sol para serem comercializadas, atuando no sustento das famílias locais (OLIVEIRA; CRUZ, 2014; PARRA et al., 2010). Muitos dos espécimes colhidos são exportados para países como Estados Unidos, Alemanha, Holanda e Japão (GIULIETTI et al., 1988).

A maioria das sempre-vivas comercializadas são oriundas das regiões Centro-Oeste e Sudeste brasileiro, principalmente de campos rupestres, onde ocorrem as espécies de maior valor econômico (GIULIETTI et al., 1996).

Nas regiões de maior extrativismo, a economia tem exercido uma intensa pressão sobre a colheita de sempre-vivas, conduzindo a uma redução severa das populações selvagens (PARRA et al., 2010). Pois a coleta é sempre feita antes do completo desenvolvimento dos frutos, o que certamente afeta a reprodução por sementes (GIULIETTI et al., 1996). Agravando o problema, durante a secção do escapo muitas vezes são retiradas as raízes, revelando à falta de conhecimento de manejo adequado por parte de coletores (OLIVEIRA, A et al., 2016).

2.4 Cultivo *in vitro*

A conservação *in situ* consiste em desenvolver estratégias de manutenção e preservação de espécies em seus ambientes naturais. Por outro lado, a conservação *ex situ* propõe a manutenção e preservação de espécies fora de seus habitats (BRASIL, 2012).

Devido à redução das populações *in situ* de sempre-vivas, faz-se necessária a utilização de técnicas complementares de conservação *ex situ* para manter a diversidade genética da espécie (BRITO, 2011).

Um dos métodos de conservação *ex situ* possível, é o *in vitro* como a cultura de tecidos de plantas, conjunto de técnicas que permitem a multiplicação massiva de plantas mantendo a

integridade anatômica, morfológica, fisiológica e genética dos espécimes, com os propósitos de criação e manutenção de bancos de germoplasma, intercâmbio de material genético, preservação de material ameaçado, uniformização do material, além de germinação e desenvolvimento, livres de contaminação endógena e exógena (ANDRADE, 2002; BRITO, 2011; PINHAL, 2011).

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado para a conservação de sempre-vivas como *Syngonanthus mucugensis* Giul., *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland e *Syngonanthus venustus* Silveira (BRITO, 2011; OLIVEIRA; GARCIA, 2005). Pois garante melhores condições ambientais que em viveiros, facilitando a germinação e subsequente desenvolvimento das plântulas. Para que este benefício seja fatural é necessário conhecer o ambiente natural da espécie e seu ciclo de vida, a fim de reproduzir as condições ideais (ANDRADE, 2002; MALAQUIAS et al., 2016).

Alguns elementos são essenciais na germinação *in vitro*, como a assepsia do material a ser utilizado e o meio de cultivo adequado, onde varia a concentração de nutrientes orgânicos e inorgânicos, fontes de carbono, agente solidificante e pH (ANDRADE, 2002; OLIVEIRA; GARCIA, 2005).

A assepsia das sementes, é um passo essencial, pois se feita de forma eficaz, garante que a germinação e o desenvolvimento dos corpos vegetais se realizem sem a interferência de patógenos (NASCIMENTO; FRANCO; FRASSETTO, 2007), sendo o álcool a 70% e o hipoclorito de sódio, dois dos agentes de assepsia mais utilizados (OLIVEIRA et al., 2013).

O meio de cultivo básico possui composição definida e serve de parâmetro para a adição das variáveis que se pretende testar (CARVALHO, A et al., 2011). Alguns dos meios que podem ser utilizados como base são o meio de cultivo WPM – Wood Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1981), que apresenta baixos níveis de íons nitrato e amônia e altos níveis de sulfato (QUISEN; ANGELO, 2008) e o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que por sua vez, possui grandes quantidades de micro e macronutrientes, apresentando alta concentração salina (CARVALHO et al., 2011). As concentrações de nutrientes variam de espécie para espécie, dependendo das exigências nutricionais (MALDENER et al., 2006). A sacarose atua como fonte de carbono e regulador osmótico, sendo outro fator variante. (LE MOS, 2002).

O pH e o ágar são muito importantes para a germinação, podendo interferir de forma positiva ou negativa. O pH interfere na ação gelificante do ágar, e o ágar atua como tamponante em relação ao pH (BARROS; PASQUAL, 1992). Quanto maior a quantidade de ágar menor é a interferência na variação do pH (pH inicial – pH final), sendo que a variação deste tende para níveis opostos, ou seja do meio ácido para o meio básico e vice-versa (BARROS; PASQUAL,

1992). A utilização de quantidades inadequadas de qualquer um dos elementos do meio de cultura pode prejudicar o desenvolvimento vegetal (SCHMILDT; SCHMILDT; OLIVEIRA, 2015).

O conhecimento sobre a germinação *in vitro* de sempre-vivas ainda é escassa e a maioria dos trabalhos realizados são focados em poucas espécies, como *Syngonanthus nitens* (Bong.) *Ruhland*, *Comanthera elegans* (Bong.) L.R. Parra & Giul e *Comanthera curralensis* Moldenke (ALBUQUERQUE et al., 2016; OLIVEIRA, A et al., 2016; PRUDENTE et al., 2015; SCHMIDT et al., 2008), para algumas espécies como a *C. nitida*, são escassas as informações apresentadas até o atual momento.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Obter um protocolo de germinação *in vitro* para manutenção e conservação do germoplasma *ex situ* de sementes de *Comanthera nitida*.

3.2 Específicos

- Avaliar, o melhor método de assepsia para conservação *in vitro* de sementes de *C. nitida*.
- Avaliar o melhor meio de cultivo, associado a diferentes concentrações de sais;
- Testar concentrações de sacarose na germinação;
- Testar diferentes pHs e concentrações de ágar;
- Desenvolver um procedimento adequado para solidificação de ágar em meio de cultivo de baixo pH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os testes foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP - UFLA), Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras – MG.

As inflorescências foram obtidas em Diamantina - MG, estas, foram mantidas armazenadas em ambiente refrigerado a 4°C no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas. As sementes foram extraídas das flores manualmente, através de peneiras granulométricas.

4.1 Assepsia e germinação em diferentes meios de cultivo

Em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas 35 sementes por tratamento, sendo mergulhadas em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2,5% pelos períodos de 10 e 15 minutos. Posteriormente foram inoculadas nos meios MS; MS ½ (50% dos sais); WPM e WPM ½ (50% dos sais). Após a desinfestação as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Foram adicionados 15 gL⁻¹ de sacarose e 7 gL⁻¹ de ágar e o pH do meio foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos a 1 atm, antes da inoculação.

Durante 30 dias as sementes foram mantidas dentro de frascos de vidro, com a adição de 50ml de meio de cultivo, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas, a 25°C. Após este período foram avaliados a porcentagem de germinação (PG) e a velocidade de germinação (VG).

4.2 Germinação com diferentes meios de cultivo e concentrações de sacarose

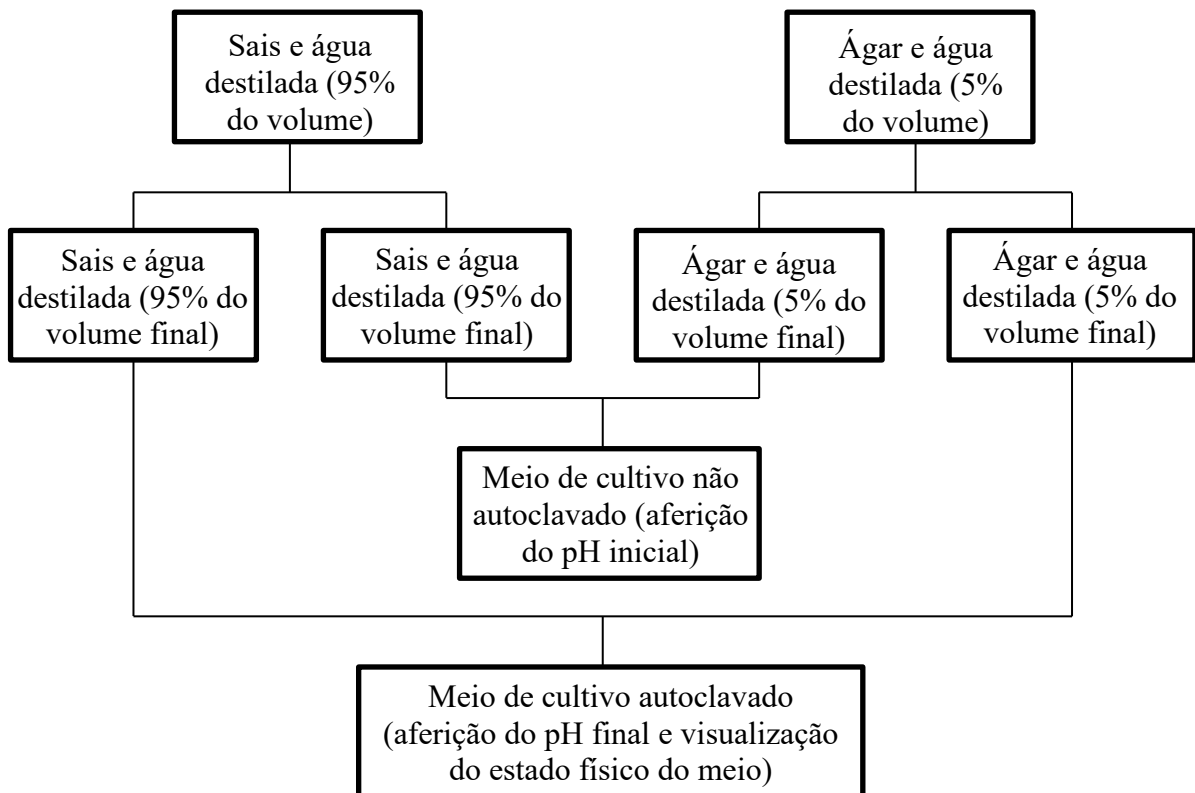
Foi utilizado o melhor tratamento obtido do experimento anterior, para verificar a melhor quantidade de sacarose para a germinação de sementes de *C. nitida*. Em câmara de fluxo laminar foram desinfestadas 15 sementes por tratamento, em álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos e lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Em seguida foram inoculadas nos meios de cultivo MS ½ e WPM ½ com a adição de 15 e 30 gL⁻¹ de sacarose. Foram acrescidos 7 gL⁻¹ de ágar nos meios de cultivo e o pH do meio foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121°C por 20 minutos a 1 atm. Os meios foram vertidos em Placas de Petri, onde foram inoculadas as sementes. Os tratamentos foram

armazenados em ambiente com fotoperíodo de 16 horas, na temperatura de 25°C, durante 30 dias, para germinação. Durante este período foram avaliados semanalmente a PG.

4.3 Solidificação do ágar em baixo pH

As principais etapas deste experimento podem ser visualizadas na Figura 1, onde foram preparadas as soluções de sais e ágar para o melhor meio de cultivo do experimento anterior.

Figura 1 – Sequência de distribuição das substâncias de sais, ágar e meio de cultivo, seguidos da aferição dos respectivos pHs.



Fonte: Da autora (2019).

As soluções de sais foram acrescidas água destilada até atingir 95% do volume final do meio de cultivo, sendo o pH ajustado para 5,8; 4,8 e 3,8. Isoladamente, foi preparado o ágar nas concentrações de 7 e 14 gL⁻¹ e acrescido de água destilada para completar os 5% do volume final do meio de cultivo restante, sendo o pH ajustado para 5

A relação entre pH e o volume das soluções de sais e ágar foram calculados a partir de média ponderada, em que:

$$\bar{x} = \frac{(p_1 \cdot x_1) + (p_2 \cdot x_2)}{p_1 + p_2}$$

onde, p_1 = É o valor da porcentagem de água destilada a ser adicionado aos sais; x_1 = É o valor do pH da solução com sais; p_2 = É o valor da porcentagem de água destilada a ser adicionado ao ágar; x_2 = É o valor do pH da solução com o ágar.

Para a verificação do pH do meio de cultivo antes (pH inicial) e após (pH final) o processo de autoclavagem, as soluções foram divididas em duas parcelas cada, sendo que a primeira parcela foi destinada a verificação do pH inicial do meio de cultivo, onde, as soluções de sais e ágar foram misturadas e aferidas, sem passar pela autoclavagem. E a segunda parcela foi destinada para a verificação do pH final, onde, as soluções de sais e ágar foram autoclavadas separadamente e só foram misturadas e aferidas, após o processo de autoclavagem, a 121°C durante 20 minutos a 1 atm. Em seguida, 1 hora após a autoclavagem, em temperatura de 25°C, foi observada o estado físico do meio de cultivo, verificando se houve solidificação.

4.4 Germinação em diferentes pHs e concentrações de ágar

Com base no experimento do Tópico 4.3, um terceiro teste referente a germinação de sementes de *C. nitida* foi realizado, buscando avaliar os efeitos do pH e de concentrações de ágar no meio de cultivo. Em câmara de fluxo laminar, as sementes de *C. nitida* foram inoculadas em meio com a adição de 15 gL⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado como descrito no Tópico 4.3 e foi adicionado ágar nas concentrações de 7 e 14 gL⁻¹ do produto, com 20 sementes por tratamento. Os tratamentos foram armazenados em ambiente com fotoperíodo de 16 horas, a 25°C, durante 30 dias, para germinação. Durante o período foram avaliados de 7 em 7 dias a PG e o desenvolvimento pós-seminal com o auxílio de um microscópio de luz, em objetiva com o aumento de 10 vezes e a ocular também com aumento de 10 vezes.

4.5 Análise estatística

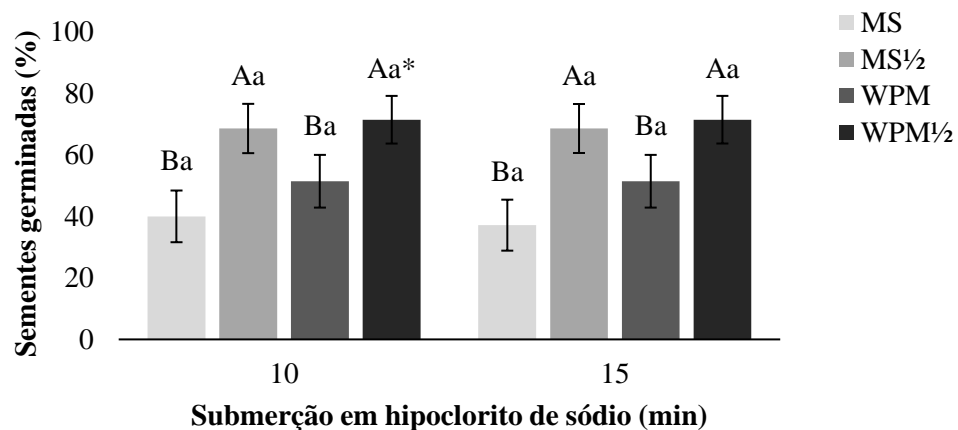
O Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) foi utilizado para a realização dos experimentos e os dados obtidos passaram pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA,2014), pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Assepsia e germinação em diferentes meios de cultivo

Observando a porcentagem de germinação (PG) na relação hipoclorito – meio de cultivo, houve diferença significativa, onde os melhores tratamentos foram os meios MS $\frac{1}{2}$ e WPM $\frac{1}{2}$, sendo observado as médias de germinação de 68,57% e 71,43%, respectivamente, na (FIGURA 3).

Figura 3 – Porcentagem de sementes de *C. nitida* germinadas em diferentes meios de cultivo, após processo de desinfestação por hipoclorito de sódio a 2,5%, em diferentes tempos e inoculados em diferentes meios de cultura.



*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem estatisticamente entre si no nível de 5% de significância pelo teste de Scott – Knott em relação a um mesmo período de submersão. Médias seguidas pela mesma letra minúscula para os mesmos meios de cultivo, não diferem estatisticamente entre si no nível de 5% de significância pelo teste de Scott – Knott em relação a diferentes períodos de submersão. Fonte: Da autora (2019).

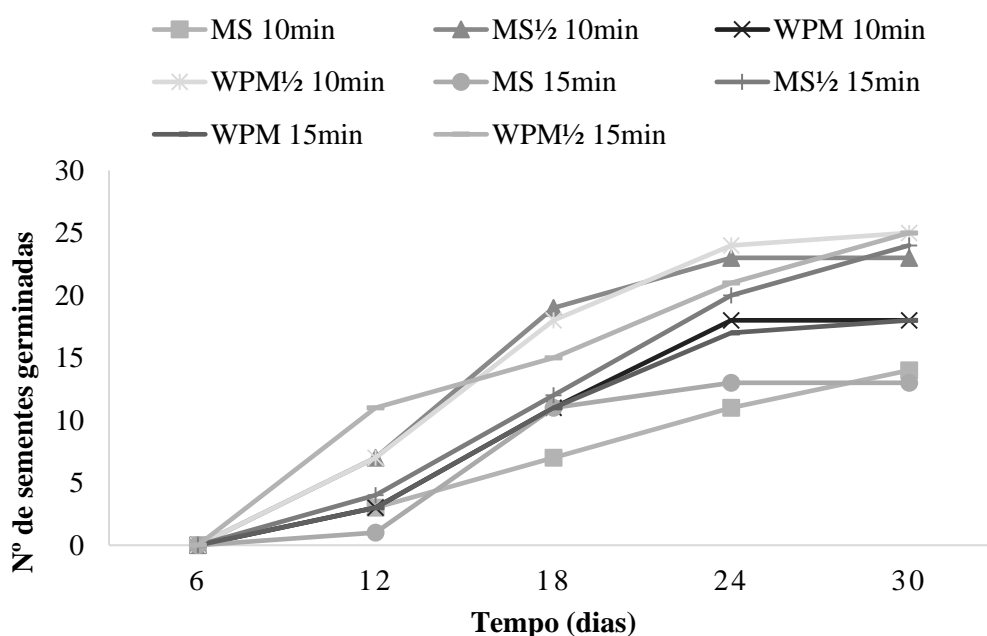
Para sementes de outras espécies, como a *Comanthera curralensis* Moldenke, o meio MS $\frac{1}{2}$ se destacou na performance germinativa das sementes (ALBUQUERQUE et al., 2015). Já para espécie *Syngonanthus elegans* Ruhland, foi testada a germinação em diferentes concentrações de sais em meio WPM, não obtendo diferenças significativas entre os tratamentos (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2014). Quando comparado os meios MS e WPM para a espécie *Actinocephalus bongardii* (A. St.-Hil.) Sano, foi obtido como melhor resultado, a germinação em meio WPM (PRUDENTE et al., 2015).

As altas médias de germinação das sementes de *C. nitida*, se relacionam diretamente com os meios de cultivo, compostos por baixas concentrações de micro e macronutrientes,

comparados com todos os meios testados. Essa relação, se deve a mecanismos evolutivos, desenvolvidos pelas sementes, que permitiram sua adaptação a solos com pouca disponibilidade de nutrientes e baixa capacidade de retenção de água (BENITES, 2003; CONCEIÇÃO; PIRANI, 2005; RAPINI et al., 2008).

Ao avaliar a velocidade de germinação (VG), os tratamentos com hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos em meio WPM $\frac{1}{2}$, e hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos em meio MS $\frac{1}{2}$, obtiveram os melhores resultados. Os tratamentos em meios MS obtiveram baixo desempenho no processo de germinação, em ambos os períodos de desinfestação, 10 e 15 minutos (FIGURA 4).

Figura 4 – Velocidade de germinação de sementes de *C. nitida* sob o efeito de diferentes meios de cultivo



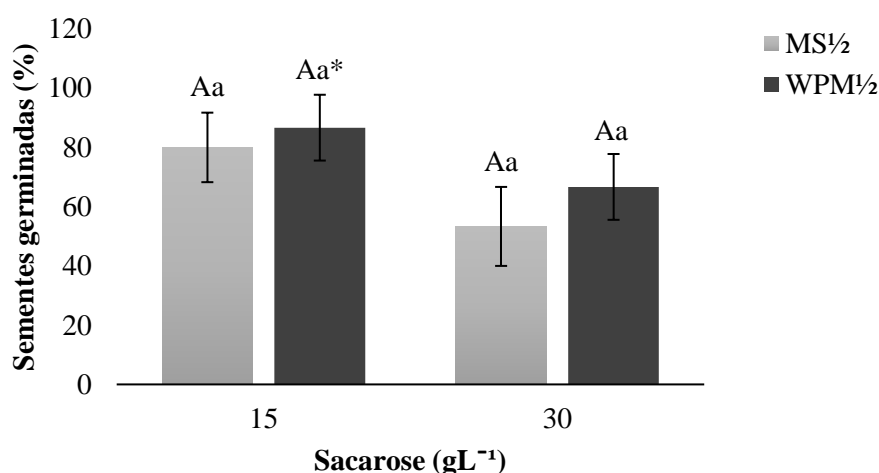
Fonte: Da autora (2019).

A germinação em todos os tratamentos se iniciou próximo do dia 9 e se estabilizou a partir do dia 24.

5.2 Germinação com diferentes meios de cultivo e concentrações de sacarose

Na Figura 5 é possível observar que para a concentração de sacarose não houve diferença estatística significativa entre as porcentagens de germinação (PG).

Figura 5 – Porcentagem de sementes de *C. nitida* germinadas em diferentes concentrações de sacarose nos meios MS $\frac{1}{2}$ e WPM $\frac{1}{2}$.



*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meios de cultivo, não diferem estatisticamente entre si no nível de 5% de significância pelo teste de Scott – Knott, em relação a mesma concentração de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra minúscula para os mesmos meios de cultivo, não diferem estatisticamente entre si no nível de 5% de significância pelo teste de Scott – Knott em relação as diferentes concentrações de sacarose. Fonte: Da autora (2019).

Resultados distintos, foram obtidos para as espécies *C. curralensis*, onde, foram testados os meios MS e MS $\frac{1}{2}$, com as concentrações de 15 e 30 gL⁻¹ de sacarose, sendo que o tratamento com meio MS $\frac{1}{2}$ e 15 gL⁻¹ de sacarose, sobressaiu em seus resultados (ALBUQUERQUE et al., 2016) e para a espécie *S. mucugensis*, o meio MS com adição de 30 gL⁻¹ de sacarose foi tóxico para as sementes (PAIXÃO-SANTOS et al., 2003).

Apesar de não haver diferença estatística em relação aos tratamentos, o melhor resultado pode ser observado no tratamento WPM $\frac{1}{2}$ com 15 gL⁻¹ de sacarose foi selecionado para uso de demais experimentos neste trabalho.

5.3 Solidificação do ágar em baixo pH

Na Tabela 1 é possível verificar o pH inicial e pH final do meio de cultivo, ou seja, antes e após a autoclavagem. Tais medições demonstraram que as proporções estipuladas, através de média ponderada, foram eficazes na previsão do pH inicial do meio de cultivo. Já os resultados em relação ao pH final, obtiveram alterações para os tratamentos com sais em pH 5,8, em todas as concentrações de ágar, sofrendo redução no pH final. Os tratamentos em que o pH dos sais foram de 3,8, obtiveram as menores variações em relação ao pH final.

Tabela 1 – Valores de pH do meio de cultivo antes e após a autoclaveagem.

pH dos Sais	Ágar	Valores de pH		
		pH inicial* (Média ponderada)	pH inicial (Valor observado)	pH final (autoclavado)
5,8	14 gL ⁻¹	5,76	5,79	4,71
	7 gL ⁻¹	5,76	5,78	4,96
4,8	14 gL ⁻¹	4,81	4,80	4,41
	7 gL ⁻¹	4,81	4,80	4,46
3,8	14 gL ⁻¹	3,86	3,82	3,96
	7 gL ⁻¹	3,86	3,82	3,87

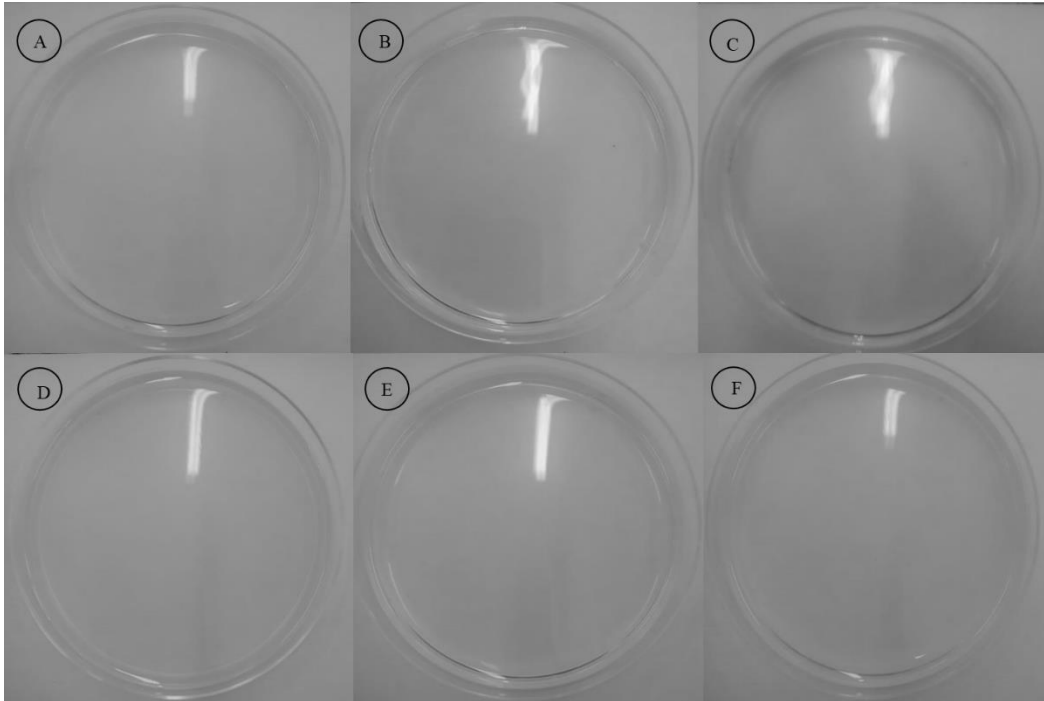
*Coluna intitulada pH inicial (Média ponderada), refere-se ao valor calculado da média ponderada; Coluna intitulada pH inicial (Valor observado), refere-se ao valor encontrado após medir o pH, antes da autolavagem; Coluna intitulada pH final (autoclavada), refere-se ao valor do pH encontrado após a autoclaveagem. Fonte: Da autora (2019).

Os resultados demonstram que quanto mais ácido o pH inicial, menor é a variação em relação ao pH final e que as concentrações de ágar não foram relevantes em relação a esta variação. Diferente destes resultados, Barros e Pasqual (1992) ao realizarem experimentos com meio MS, onde sais e ágar foram autoclavados juntos, obtiveram maior variação do pH, nos tratamentos em que foram adicionados menor concentração de ágar correlacionados com pHs extremos, sugerindo que a relação entre ágar e pH é inversamente proporcional, sendo que, quanto maior a concentração de ágar, menor é a variação do pH e quanto mais próximo da neutralidade for o pH, menor é sua variação e a influência do ágar (BARROS; PASQUAL, 1992).

A diferença entre os resultados obtidos neste experimento em relação ao experimento realizado por Barros e Pasqual (1992), pode ter ocorrido devido as concentrações de sais e sacarose distintas ou devido ao processo de autoclaveagem, em que no experimento desenvolvido neste trabalho foi realizado com as soluções de sais e ágar separados, enquanto que no estudo desenvolvido por Barros e Pasqual (1992), ambas as substâncias foram autoclavadas misturadas.

Quanto a solidificação do meio de cultivo em baixo pH após a autoclaveagem, foi observado uma consistência física sólida, em todos os tratamentos, demonstrando a eficácia do procedimento (FIGURA 6).

Figura 6 – Meios de cultivo em estado sólido após processo de autoclaveagem em diferentes pHs e concentrações de ágar.

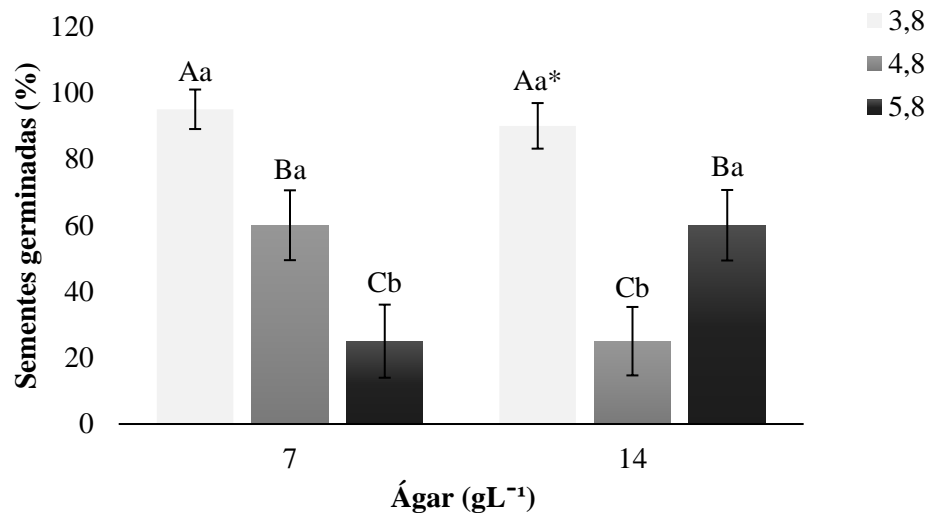


As imagens A e B se referem aos meios de cultivo com pH 5,8 e adição de 7 e 14 gL⁻¹, respectivamente. As imagens C e D se referem aos meios de cultivo com pH 4,8 e adição de 7 e 14 gL⁻¹, respectivamente. As imagens E e F se referem aos meios de cultivo com pH 3,8 e adição de 7 e 14 gL⁻¹, respectivamente. Todos os meios solidificaram. Fonte: Da autora (2019).

5.4 Germinação em diferentes pHs e concentrações de ágar

Quando a germinação foi relacionada com o pH e o ágar, houve diferenças significativas para os tratamentos, sendo que, as melhores respostas, foram dadas pelos tratamentos em pH 3,8, em ambas concentrações de ágar, 7 e 14 gL⁻¹, obtendo as médias de germinação de 95 e 90%, respectivamente (FIGURA 7).

Figura 7 – Porcentagem de sementes de *C. nitida* germinadas em diferentes pHs e concentrações de ágar

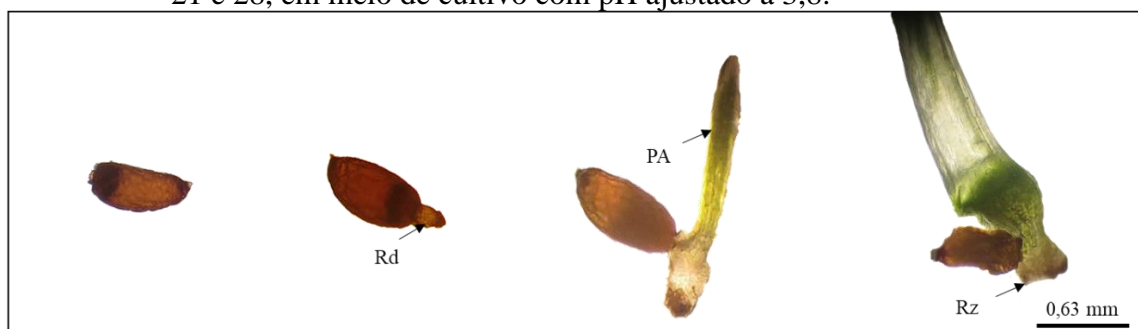


*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para pHs diferentes, não diferem estatisticamente entre si no nível de 5% de significância pelo teste de Scott – Knott em relação a mesma concentração de ágar. Médias seguidas pela mesma letra minúscula para pHs iguais, não diferem estatisticamente entre si no nível de 5% de significância pelo teste de Scott – Knott em relação as diferentes concentrações de ágar. Fonte: Da autora (2019).

Resultados diferentes, foram encontrados para a espécie, *Actinocephalus bongardii*, onde o melhor resultado para germinação, foi obtido em pH 5,8 com 7 gL⁻¹ (PRUDENTE et al., 2015).

O desenvolvimento pós-seminal de *C. nitida* foi acompanhado visualmente, com o auxílio de um microscópio de luz, em objetiva com o aumento de 10 vezes e a ocular também com aumento de 10 vezes (FIGURA 8).

Figura 8 – Visualização do desenvolvimento pós-seminal de *C. nitida*, nos dias 7, 14, 21 e 28, em meio de cultivo com pH ajustado a 3,8.



Sementes de *C. nitida* ao longo de 28 dias, nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente. Rd: Protusão da radícula; PA: Despoite da parte aérea; Rz: Raiz. Fonte: Da autora (2019).

Resultados como este, demonstram que algumas espécies foram adaptadas por parte de suas sementes, necessidade de pH específico, sendo necessário observar as variáveis edáficas (GADOTTI et al., 2013). Portanto, o resultado obtido, pode ser justificado pelas condições do

solo, onde, os espécimes de *C. nitida* possuem a sua área de vida. Este solo é ácido, devido a lixiviação que ocorre no período chuvoso (CUSTÓDIO et al., 2002), o que também justifica a ação do ágar, ao atuar como regulador osmótico, reduzindo as disparidades entre o solo do habitat natural e o meio de cultivo.

CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver a germinação *ex situ* a partir da utilização do meio de cultivo WPM^{1/2}, acrescido de 15 gL⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 3,8 e adição de 7 gL⁻¹ de ágar.

As sementes de *C. nitida* respondem melhor no estágio de germinação a meios que reproduzem o solo do seu habitat natural, os campos rupestres, portanto, meios com baixas concentrações de sais e baixo pH.

Os meios de cultivo com os pHs 3,8 e 4,8 atingiram o estado sólido a partir do processo de solidificação do ágar em baixo pH.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M.M.S. et al., 2016. ***In vitro* establishment of *Comanthera curralensis*, “sempre viva” native of Chapada Diamantina – Bahia.** Santa Maria: Ciência Rural. v.46, n.6, p.991-995.
- ANDRADE, S.L.M. 2002. **Princípios da cultura de tecidos vegetais.** EMBRAPA Cerrados. Planaltina, DF. v.1, p.14-15.
- BARROS, I.; PASQUAL, M., 1992. **Variação do pH do meio “MS” de cultura *in vitro* como função da concentração de ágar e do pH inicial.** Brasília: Pesquisa agropecuária brasileira. v.27, n.11, p.1513-1517.
- BENITES, V.M. et al., 2003. **Solos e vegetação nos complexos rupestres de altitude da mantiqueira e do espinhaço.** Floresta e Ambiente, EMBRAPA-SOLOS. v.10, n.1, p.76–85.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Conservação *in situ*, *ex situ* e on farm.** 2012. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacaoepromocaoedousoda-diversidadegenetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ-ex-situ-e-on-farm>>. Acesso em: 11 de agosto de 2019.
- BRITO, A.L. et al., 2011. **Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva.** Santa Maria: Ciência Rural. v.41, n.8, p.1354-1361.
- CARVALHO, A.C.P. et al., 2011. **Glossário de cultura de tecidos de plantas.** Plant Cell Culture. Lavras: Micropropag. v.7, n.1, p.30-60.
- CONCEIÇÃO, A.; PIRANI, J., 2005. **Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia:** Substratos, composição florística e aspectos estruturais. Boletim de Botânica. v.23, n.1, p.85-111.
- CONCEIÇÃO, A., 2015. **Vegetação endêmica e espécie invasora em campos rupestres de áreas garimpadas.** Rodriguésia. v.66, n.3, p.675-683.
- CUSTODIO, C.C. et al., 2002. **Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja.** Scientia Agricola. Piracicaba, Brasil. v.59, n.1, p.145-153.
- ECHTERNACHT, L. et al. 2014. **Phylogeny and taxonomy of *Syngonanthus* and *Comanthera* (*Eriocaulaceae*):** Evidence from expanded sampling. Taxon. v.63, p.47-63.
- FERREIRA, D. F., 2014. **Sisvar - sistema de análise de variância para dados balanceados.** Lavras: UFLA. p.19.
- GADOTTI, G.I. et al., 2013. **Faixa de exigência e influência do pH no teste de germinação.** La Plata: Revista de la Facultad de Agronomía. v.112, n.1, p.27-34.
- GIULIETTI, N; Pirani, J.R.; Menezes, N.L., 1988. **Estudos em sempre-vivas: Importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil.** Acta Botanica Brasilica. v.1, n.2, p.179–193.

GIULIETTI, A.M.; HENSOLD, N., 1990. **Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de *Eriocaulaceae***. Acta Botanica Brasilica. v.4, n.1, p.133-158.

GIULIETTI, A.M. et al., 1996. **Estudos em “Sempre-Vivas”**: Taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. Acta Botanica Brasilica. v.10, n.2, p.329-377.

GIULIETTI, A.M. et al., 2012. **Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of *Eriocaulaceae***. Rodriguésia. v.63, p.1-19.

JÚNIOR, W. A. et al., 2007. **Efeito do pH da água de embebição e do trincamento das sementes de maracujazeiro amarelo na germinação e desenvolvimento inicial**. Ciência e Agrotecnologia., Lavras. v.31, n.4, p.1014-1019.

LEMOS, E.E.P., 2002. **Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília v.37, n.10, p.1359-1364.

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

MALAQUIAS, J.O.S. et al., 2016. **Germinação *in vitro* de *Dalbergia nigra* vell. Fr. All. Ex benth.** UNIVAP. Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2016/anais/arquivos/RE_1102_1061_01.pdf>. Acesso em: 10 de agosto de 2019.

MALDANER, J. et al., 2006. **Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfafia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. Ciência Rural. Santa Maria. v.36, n.4, p.1201-1206.

MCCOWN, B.H.; LLOYD, G., 1981. **Woody Plant Medium (WPM) - A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species**. HortScience. v.16, p.453-453.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. 1962. **Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Physiologia Plantarum, Copenhagenv. v.15, p.473-497.

NASCIMENTO, P.K.V.; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G., 2007. **Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam)**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre. v.5, n.2, p.141-143.

OLIVEIRA, A.S. et al., 2016. **Maturação, temperatura e quebra de dormência na germinação de sementes de sempre-vivas**. Ornamental Horticulture. v.22, p.186-195.

OLIVEIRA, L. S. et al., 2013. **Micropropagação de espécies florestais brasileiras**. Pesquisa Florestal Brasileira. v.33, n.76, p 439-453.

OLIVEIRA, M.N.S.; Cruz L.I.; Tanaka, M.K. 2014. **Collection time and seed germination of commercialized *Comanthera* (*Eriocaulaceae*) from Serra do Ambrósio Minas Gerais Braz**. Journal of Botany. v.37, p.19-27.

OLIVEIRA, P.G; GARCIA, Q.S., 2005. **Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, *S. elegans* (Bong.) Ruhland e *S. venustus* Silveira (*Eriocaulaceae*)**. Acta Botanica Brasilica. v.1, n.3, p.639-645.

PAIXÃO-SANTOS, J. et al., 2003. **Germinação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giuliette**. Sitientibus. Feira de Santana: Série Ciências Biológicas. v.3, n.1, p.120-124.

PARRA, L.R.A.M. et al., 2010. **Reestablishment and new circumscription of *Comanthera* (*Eriocaulaceae*)**. Taxon. v.59, p.1135–1146.

PÊGO, R.G.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, R., 2014. **Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland na ornamental species**. Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá. v.36, n.2, p.347-353.

PEREIRA, A.C.S.; RIBEIRO, P.L.; GIULIETTI, A.M., 2016. ***Comanthera borbae* (*Eriocaulaceae*): a new species endemic to the Northern portion of the Chapada Diamantina, Bahia, Brazil**. Phytotaxa. v.270, p.025–032.

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

PRUDENTE, D.O. et al., 2015. **Germinação *in vitro* e aclimatização de sempre-viva**. Plant Cell Culture Micropropag., Lavras. v.11, n.2, p.62-69.

QUISEN, R.C.; ANGELO, P.C.S., 2008. **Manual de procedimento do Laboratório de Cultura de Tecidos da EMBRAPA Amazônia Ocidental**. EMBRAPA Amazônia Ocidental. Manaus. Documentos. v.61, p.1-44.

RAPINI, A. et al., 2018. **Flora Dos Campos Rupestres Da Cadeia Do Espinhaco**. Megadiversidade. v.4, p.15–23.

REFLORA, 2020. **Comanthera in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB116365>>. Acesso em: 01 de outubro de 2019

RODELA, L.G., 1998. **Cerrados de Altitude e Campos Rupestres do Parque Estadual do Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais: Distribuição e florística por subfisionomias da vegetação**. Revista do Departamento de Geografia. n.12, p.163-189.

SANO, P.T. et al., 2015. ***Eriocaulaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB116365>>. Acesso em: 25 de julho de 2019.

SCHIMIT, I.B. et al., 2008. **Produção e germinação de sementes de “capim dourado”, *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland (*Eriocaulaceae*): implicações para o manejo**. Acta Botanica Brasilica. v.22, n.1, p.37-42.

SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E.R.; OLIVEIRA, M.J.V., 2015. **Sais e sacarose na germinação *in vitro* de limoeiro ‘cravo’**. Nucleus. v.12, n.1, p.2015-222.

STÜTZEL, T. et al., 1998. ***Eriocaulaceae*** In K. Kubitzki (ed.) The families and genera of vascular plants. Springer Verlag. Berlin: Flowering Plants Monocotyledons - *Alismataceae* and *Commelinanae* (except *Grammineae*). v.7, p.197-207.