

Antioxidante e giberelina no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.

Antioxidant and gibberellin on *in vitro* cultivation of *Eugenia involucrata* DC.

Charlene M. Stefanel, Lia R. S. Reiniger*, Silvia M. dos S. Rabaiolli, Karol B. da Silva e Tatiane L. P. Andreolla

Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil
(* E-mail: liarsr@ufsm.br)

<https://doi.org/10.19084/rca.23704>
Recebido/received: 2017.09.28
Aceite/accepted: 2021.02.16

RESUMO

Eugenia involucrata apresenta sementes recalcitrantes e é dotada de elevado potencial econômico e ambiental, o que justifica a realização de estudos relacionados à produção de mudas via cultura de tecidos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar concentrações de Polivinilpirrolidona (PVP) e GA₃ no cultivo *in vitro*. Testaram-se diferentes concentrações de PVP: 0; 0,5; 1 ou 1,5 g L⁻¹ e, em um segundo experimento, de GA₃: 0; 1; 2 ou 4 μM, em dois períodos de cultivo *in vitro* (30 ou 60 dias). Não houve efeito significativo de PVP, observando-se médias altas para sobrevivência (83,10%) e estabelecimento (73%), mas baixas para oxidação fenólica (16,55%). No segundo experimento, foi observado efeito significativo do período de cultivo apenas para sobrevivência, enquanto que, para altura média e número de brotos, somente do GA₃. A maior sobrevivência ocorreu aos 30 (88,10%), observando-se decréscimo aos 60 dias (61,45%). Para altura dos brotos, a maior média (0,52 cm) foi obtida a 4 μM de GA₃, já, na sua ausência, ocorreu a menor média (0,12 cm). Para número de brotos, obteve-se maior média (4,5) na sua ausência, enquanto, a 4 μM, ocorreu o menor número (0,15). PVP é dispensável; GA₃ apresenta efeito no alongamento *in vitro*, mas reduz o número de brotos em *E. involucrata*.

Palavras-chave: espécie florestal, PVP, GA₃, micropropagação, alongamento *in vitro*.

ABSTRACT

Eugenia involucrata presents recalcitrant seeds and is endowed with a high economic and environmental potential, which justifies the realization of studies related to the production of seedlings via tissue culture. The present work aimed to evaluate the effects of distinct concentrations of polyvinylpyrrolidone (PVP) and GA₃ in the *in vitro* culture. Different concentrations of PVP were tested: 0; 0.5; 1 or 1.5 g L⁻¹ and, in a second experiment, of GA₃: 0; 1; 2 or 4 μM, in two *in vitro* culture periods (30 or 60 days). There was no significant effect of PVP, with high survival rates (83.10%) and establishment (73%), but low for phenolic oxidation (16.55%). In the second experiment, significant effect of the cultivation period was observed only for survival rate, whereas average height and number of shoots were affected only GA₃ had an effect. The greatest survival occurred at 30 days (88.10%), decreasing at 60 days (61.45%). For shoot height, the highest mean (0.52 cm) was at 4 μM of GA₃, and in the absence, the lowest mean (0.12 cm) occurred. For the number of shoots, a higher mean was obtained (4.5) in its absence, whereas, at 4 μM, the lowest number occurred (0.15). PVP is dispensable; GA₃ has an effect on *in vitro* elongation but reduces the number of shoots in *E. involucrata*.

Keywords: forest species, PVP, GA₃, micropropagation, *in vitro* elongation.

INTRODUÇÃO

A Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC.) pertence à família *Myrtaceae* e possui ocorrência natural em vários estados brasileiros, distribuindo-se do Rio Grande do Sul até Minas Gerais, além de outros países da América do Sul, como Argentina, Uruguai e Paraguai (Lorenzi, 2016). A espécie apresenta diversas características desejáveis sendo muito utilizada para uso madeireiro, frutícola, paisagístico, ambiental e medicinal. Entretanto, sua propagação pela via seminal é bastante dificultada, pois suas sementes são consideradas recalcitrantes, isto é, não se mantêm viáveis durante longos períodos de armazenamento (Backes e Irgang, 2002; Carvalho, 2014).

Por apresentar elevado potencial econômico e ambiental, justificam-se estudos relacionados à produção de mudas via propagação vegetativa (Degenhardt *et al.*, 2007; Sartoretto *et al.*, 2008), e, particularmente, pela micropropagação. Esta modalidade da cultura de tecidos é um método muito estudado em diferentes espécies vegetais e que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Entretanto, o emprego da micropropagação em escala comercial visando à produção de mudas pode ser limitado, devido, entre outros fatores, ao elevado custo para obtenção da muda (Erig e Schuch, 2005), para isso cada espécie necessita de ajustes em seus protocolos a fim de otimizar as condições de cultivo das plantas (Sartor *et al.*, 2013), e reduzir custos.

Dentre os fitorreguladores passíveis de utilização na micropropagação, o Ácido giberélico (GA_3), que é uma das mais importantes giberelinas como produto comercial (Xavier *et al.*, 2013), pode promover um aumento na divisão celular. Essa giberelina, geralmente, tem, como efeito fisiológico, a indução ao alongamento dos brotos, favorecendo a propagação *in vitro* (Taiz *et al.*, 2017).

Além dos fitorreguladores, podem ser adicionados ao meio nutritivo, também, aditivos, como é o caso da Polivinilpirrolidona (PVP), que diminuem a intoxicação dos explantes pelos compostos fenólicos oxidados produzidos pelos próprios tecidos vegetais. Estes compostos são, geralmente, liberados nas zonas em que os explantes sofrem cortes, dificultando, assim, o desenvolvimento *in vitro* da

planta (Bezerra *et al.*, 2014). Altas concentrações desses compostos fenólicos podem ocasionar a morte do material vegetal e a abscisão foliar precoce, que é acarretada pelo acúmulo de etileno nos tecidos cultivados *in vitro*, o qual torna o explante mais frágil e reduz o seu desenvolvimento *in vitro* (Kerbaui, 2008). A oxidação fenólica é uma das principais limitações da propagação *in vitro*, especialmente quando se trabalha com espécies lenhosas (Sartor *et al.*, 2013).

O PVP é um antioxidante que tem sido amplamente utilizado nos cultivos *in vitro* e tem como principal vantagem a captação de elétrons, sendo indicado no controle da oxidação fenólica (Cid e Teixeira, 2014). Adicionalmente à função antioxidante o PVP pode, também, regular o crescimento *in vitro* das plantas (Xavier *et al.*, 2013).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do antioxidante PVP no meio nutritivo, no controle da oxidação fenólica, e, também, o efeito do GA_3 no alongamento *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho, realizado no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, constituiu-se de dois experimentos, independentes um do outro, conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O primeiro, teve a finalidade de avaliar somente o efeito da Polivinilpirrolidona (PVP), apresentou arranjo unifatorial e foi constituído por concentrações do antioxidante, e o segundo, bifatorial (4x2), somente o efeito de combinações de concentrações do Ácido Giberélico (GA_3) e períodos de cultivo no alongamento *in vitro* de explantes de *Eugenia involucrata*.

Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais que não fossem extremamente lenhosos, com aproximadamente 1cm de comprimento e 167 mm de diâmetro, de espécimes de *Eugenia involucrata* cultivados em casa de vegetação com aproximadamente 9 anos de idade. No laboratório, as brotações foram lavadas com o auxílio de água corrente e detergente comercial e, após, foram enxaguadas

duas vezes com água destilada. Na sequência, em câmara de fluxo laminar, foram expostos, por 1min, à solução de etanol a 70% (v/v), e, a seguir, submetidos à imersão em solução de hipoclorito de cálcio a 3,0% (v/v) durante 15 min e, após, em solução de hipoclorito de sódio a 2,0% (v/v) por 15min. Por fim, os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada e autoclavada.

Em ambos experimentos, utilizou-se o meio nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962), cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS), o qual foi acrescido de 10 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 4 g L⁻¹ de ágar e pH, ajustado para 6,0, conforme metodologia de Stefanel (2016). A unidade experimental de ambos os experimentos foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo, e três explantes. O primeiro experimento foi composto por quatro tratamentos e 10 repetições, totalizando 40 unidades experimentais e 120 explantes. O segundo experimento foi composto por oito tratamentos e 10 repetições, totalizando 80 unidades experimentais e 240 explantes.

Anteriormente à inoculação dos explantes e após a adição do ágar, o meio nutritivo foi autoclavado a 121°C e 1 atm durante 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2°C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻²s⁻¹, obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

No primeiro experimento, os tratamentos consistiram das concentrações de PVP (0; 0,5; 1,0 ou 1,5 g L⁻¹), sendo a ausência de PVP no meio nutritivo o tratamento testemunha. Foram avaliadas, após 30 dias de cultivo *in vitro*, as variáveis: sobrevivência *in vitro* (indicada pela coloração verde do explante), estabelecimento *in vitro* (determinado pelo desenvolvimento de primórdios foliares no explante) e oxidação fenólica (foram contabilizados como oxidados os explantes que se apresentaram totalmente e/ou com pelo menos a metade do seu tamanho na coloração marrom escuro), todas expressas em porcentagem.

Já no segundo experimento, os tratamentos consistiram da combinação das concentrações de GA₃ (0; 1; 2 ou 4 µM), sendo a ausência de GA₃ no meio

nutritivo, o tratamento testemunha, com os dois períodos de cultivo *in vitro* (30 e 60 dias). Foram avaliadas as variáveis: sobrevivência *in vitro* (indicada pela coloração verde do explante) expressa em porcentagem, altura média dos brotos (cm) e número de brotos. A variável altura de brotos foi mensurada, por meio de uma régua, avaliando-se todas as brotações por explante para cada tratamento e repetição.

Após avaliar a normalidade dos erros pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, os dados foram transformados pela função $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, médias de tratamentos qualitativos foram submetidos à comparação de médias por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (Ferreira, 2014) para a análise estatística dos dados. Para determinar a precisão dos ensaios foi estimado o Índice de Variação (IV), calculado por $\frac{CV}{N}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (Pimentel-Gomes, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, em que se testaram diferentes concentrações de PVP, não houve efeito significativo dos tratamentos para as variáveis sobrevivência (p= 0,4033), estabelecimento *in vitro* (p= 0,2731) e oxidação fenólica (p= 0,6688) (Quadro 1). Observou-se uma média geral alta para a sobrevivência e o estabelecimento *in vitro* dos explantes (83,10% e 73% respectivamente) e uma média geral relativamente baixa para a variável oxidação fenólica (16,55%).

A alta sobrevivência e estabelecimento observadas, corroboram com outro estudo realizado com a espécie em que, da mesma maneira que no presente trabalho (Figura 1), a presença de oxidação fenólica não inviabilizou o estabelecimento nem, tampouco, o desenvolvimento dos segmentos nodais de *Eugenia involucrata* (Golle *et al.*, 2012). Ademais, nas avaliações

Quadro 1 - Sobrevivência (%), estabelecimento *in vitro* (%) e oxidação fenólica (%), observadas em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, após a inoculação em meio ½MS contendo diferentes concentrações de PVP, aos 30 dias de cultivo *in vitro*

PVP (g L ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento <i>in vitro</i> (%)	Oxidação fenólica (%)
Testemunha	66,40 a*	53,00 a	20,00 a
0,5	93,20 a	73,00 a	13,20 a
1,0	86,40 a	79,60 a	26,40 a
1,5	86,40 a	86,40 a	6,60 a
Média	83,10	73,00	16,55
IV	3,44	3,77	5,65

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) = , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

do ensaio, observou-se que, geralmente, a região oxidada desprendia-se facilmente do explante e, abaixo dessa região, existiam novos tecidos. A descamação é uma característica comum da espécie durante o seu crescimento, o que pode ter sido o motivo que desencadeou a oxidação observada. Por isso, pode-se justificar que, por ser uma característica comum da espécie (Golle, 2010), a oxidação fenólica presente nos explantes não tenha prejudicado sua sobrevivência e estabelecimento *in vitro*.

De maneira contrária ao obtido, no cultivo *in vitro* de *Handroanthus chrysotrichus* foi observada uma maior sobrevivência dos segmentos nodais da espécie quando inoculados em meio ½WPM (Lloyd e McCown, 1980) contendo 1g L⁻¹ de PVP (Rabaioli, 2014) sugerindo, com isso, que a presença ou não de PVP no meio nutritivo é relativo de cada espécie estudada.



Figura 1 - Oxidação fenólica em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, inoculados em meio nutritivo MS com a concentração de sais reduzida à metade (½MS) contendo 1,0 g L⁻¹ de PVP, após 30 dias de cultivo *in vitro*, cuja oxidação não prejudicou o desenvolvimento das gemas axilares pré-existentes. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

A presença do antioxidante, independentemente da concentração utilizada (0,5; 1,0 ou 1,5 g L⁻¹), não proporcionou eficiência no controle da oxidação fenólica dos segmentos nodais de *Eugenia involucrata*. Isso pode ter acontecido, provavelmente, em função de que a espécie é lenhosa, necessitando, assim, de elevadas concentrações do antioxidante para diminuir os compostos fenólicos.

Corroborando em parte, para *Dalbergia nigra*, a presença de 1 g L⁻¹ de PVP, tanto no meio nutritivo MS quanto no WPM, ocasionou as maiores média de oxidação dos explantes (Sartor *et al.*, 2013). Entretanto, o contrário foi observado em *Theobroma grandiflorum*, em que a presença de somente 0,4 g L⁻¹ de PVP no meio DKW (McGranahan *et al.*, 1987) foi eficiente no controle da oxidação fenólica dos explantes (Almeida *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem, novamente, que a resposta à concentração de PVP é muito dependente da espécie.

No segundo experimento, em que foram testadas diferentes concentrações de GA₃, foi observado efeito significativo somente do fator principal período de cultivo para a variável sobrevivência *in vitro* (p=0,0073) (Quadro 2). Já para altura média dos brotos (p=0,0275) e número de brotos (p=0,0004), observaram-se efeito significativo somente do fator principal GA₃. Para a altura média dos brotos, a equação estimada que resultou no melhor ajuste foi a linear crescente (Figura 2), ao passo que, para o número de brotos, foi uma equação linear decrescente (Figura 3).

Em relação ao período de cultivo, a maior média de sobrevivência ocorreu aos 30 dias (88,10%), observando-se um decréscimo significativo aos 60 dias

Quadro 2 - Sobrevivência (%) observada em segmentos nodais de *Eugenia involucrata* aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, após a inoculação em meio ½MS contendo diferentes concentrações de GA₃

Dias	Sobrevivência (%)
30	88,10 a*
60	61,45 b
Média	74,77
IV	4,30

*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra 'a' representa o resultado mais favorável para as variáveis analisadas. IV (Índice de variação) = , em que CV= coeficiente de variação e N= número de repetições.

(61,45%) (Quadro 2), o que pode ter sido ocasionado pela menor quantidade de nutrientes disponíveis aos explantes, devido ao maior tempo de permanência no mesmo meio nutritivo. Isso também foi observado em outro estudo com a mesma espécie, em que foi obtida, aos 30 dias de cultivo, 71,12% de sobrevivência dos explantes enquanto aos 60 dias foi observado um decréscimo significativo, com apenas 52,48% dos explantes vivos (Stefanel, 2016). Isso pode sugerir que a queda na sobrevivência de *Eugenia involucrata* aos 60 dias de cultivo pode ser considerada uma característica comum do comportamento *in vitro* dessa espécie.

Para a variável altura média dos brotos obteve-se a maior média (0,52 cm) na presença da maior concentração da giberelina (4 µM), ao passo que, quando se diminuiu a concentração de GA₃ no meio nutritivo, a altura dos brotos também reduziu, sendo que, na ausência da giberelina obteve-se a menor média (0,12 cm) (Figura 2). O resultado obtido era esperado, visto que o GA₃ é uma substância conhecida por possuir efeito no alongamento celular das plantas (Taiz *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos corroboram em parte com o verificado em *Maclura tinctoria*, em que as concentrações de 10,97 µM e 16,46 µM de GA₃ no meio nutritivo WPM induziram o crescimento dos brotos (Gomes *et al.*, 2010). Da mesma maneira, para o cultivo *in vitro* de *Cattleya tigrina* a adição de GA₃ no meio nutritivo se fez necessária para a obtenção de brotações mais alongadas (Fritsche, 2012). Porém, o contrário foi observado em diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden, em que a presença do ácido giberélico no meio nutritivo ½MS não foi favorável ao alongamento dos explantes, além

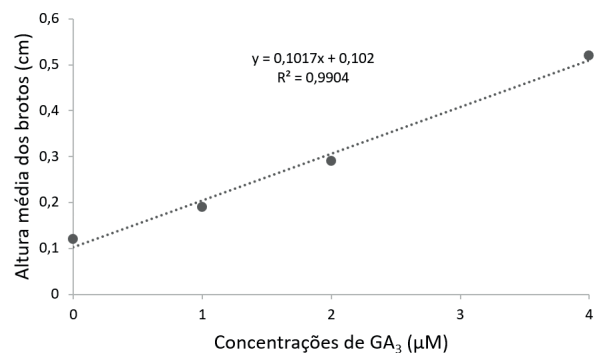


Figura 2 - Altura média dos brotos (cm) obtidos a partir de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, em função das concentrações de GA₃ (0; 1; 2 ou 4 µM) adicionadas ao meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS), independentemente do período de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

disso, a giberelina proporcionou menor tamanho das brotações e formação de estruturas calogênicas (Navroski *et al.*, 2013), o que pode ter sido decorrente de um possível efeito inibitório da giberelina sobre o alongamento celular da espécie.

Para a variável número de brotos obteve-se a maior média na ausência da giberelina no meio nutritivo (4,5), ao passo que na presença da sua maior concentração (4 µM de GA₃) observou-se o menor número de brotos (0,15) (Figura 3). Esses resultados sugerem um efeito inibitório do GA₃ sobre o número de brotos em *Eugenia involucrata* à medida em que se aumentou a concentração da giberelina

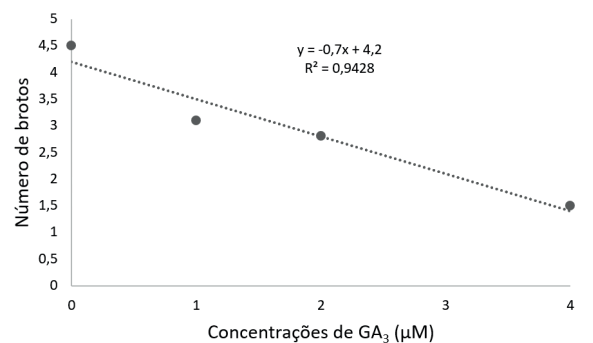


Figura 3 - Número de brotos obtidos a partir de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, em função das concentrações de GA₃ (0; 1; 2 ou 4 µM) adicionadas ao meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade (½MS), independentemente do período de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

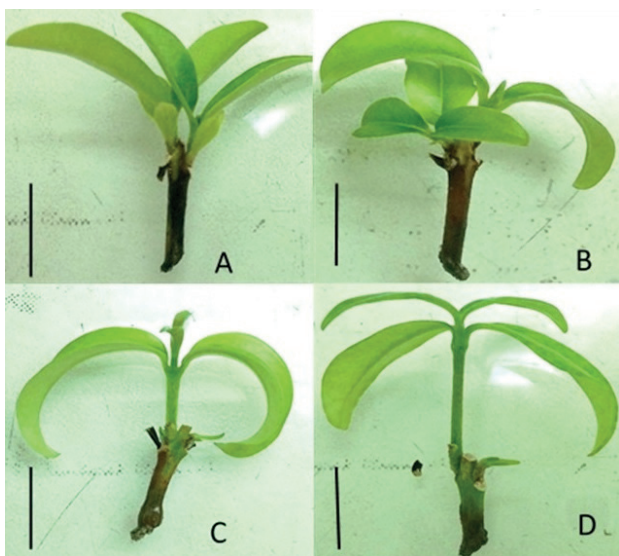


Figura 4 - Representação ilustrativa das brotações de *Eugenia involucrata* cultivadas *in vitro*, em função de diferentes concentrações de GA₃ adicionadas ao meio nutritivo ½MS, independentemente do período de cultivo *in vitro*. Observa-se em “A” brotações na ausência do fitorregulador; “B” brotações na presença de 1 μM de GA₃; “C” brotações na presença de 2 μM de GA₃; e “D” brotações na presença de 4 μM de GA₃. Barra = 1cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2017.

no meio nutritivo até 4 μM (Figura 4). Esse comportamento é reforçado pelos resultados de alguns estudos que relataram que o uso de GA₃ pode inibir a proliferação de partes aéreas em plantas (Grattapaglia e Machado, 1998).

Comportamento similar foi observado em outro estudo com *Eugenia involucrata*, em que, na ausência da giberelina, foi obtido o maior número de brotos, já, na presença de 20 μM a 40 μM, os brotos entraram em senescência e acabaram se inviabilizando, o que conforme Golle (2010), teria sido devido à toxidez causada pelas concentrações elevadas

dessa giberelina. Também, na espécie *Mentha x piperita*, o maior número de brotos por explantes foi observado na presença de 0,15 μM de GA₃ associado à auxina 6-benzilaminopurina (BAP) a aproximadamente 2 μM, sendo obtidos até 6,08 brotos/explante (Morais *et al.*, 2014).

Em contrapartida, em explantes juvenis de *Carica papaya*, a aplicação de aproximadamente 0,3 μM de GA₃ em meio MS, além de contribuir para o maior tamanho em altura das plantas, proporcionou um maior número de brotações por explante (1,84), principalmente quando a giberelina foi associada a aproximadamente 0,5 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) (Vidal *et al.*, 2013). Isso pode ter ocorrido devido a um sinergismo entre a citocinina e o ácido giberélico, indicando que associação desses fitorreguladores podem estimular a multibrotação dos explantes.

De uma maneira geral, concentrações superiores a 2 μM de GA₃ prejudicam a multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata*, porque, apesar de alongar os brotos, acabam reduzindo o número de brotos por explantes, o que não é desejável na micropropagação, pois acaba reduzindo a taxa de multiplicação da espécie.

CONCLUSÕES

É dispensável a utilização de PVP no meio nutritivo no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata*.

O ácido giberélico (GA₃) apresenta efeito positivo no alongamento *in vitro* de *Eugenia involucrata*.

Na presença de concentrações superiores a 2 μM de GA₃ em meio nutritivo ½MS, há uma redução no número de brotos por explante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, C.F.; Rodrigues, S.M. & Lemos, O.F. (2010) - Indução de calos embriogênicos em explantes de cupuaçu. In: *Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso*. In: Seminário de iniciação científica, 14°. Belém, Embrapa Amazônia Oriental.
- Backes, A. & Irgang, B. (2002) - Árvores do Sul: guia de identificação e interesse ecológico. Porto Alegre: Pallotti. 326 p.
- Bezerra, R.M.F; Aloufa, M.A.I.; Freire, F.A.M. & Santos, D.D. (2014) - Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Fabaceae). *Revista Árvore*, vol. 38, n. 5, p. 771-778.
- Carvalho, P.E. (2014) - *Espécies arbóreas brasileiras*. vol. 5. Brasília: Embrapa Informação Tecnológicas; Colombo: Embrapa Florestas. 634 p.
- Cid, L.P.B. & Teixeira, J.B. (2014) - Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cid, L.P.B. (Ed.) - *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília: EMBRAPA, 325 p.
- Degenhardt, J.; Franzon, R.C. & Costa, R.R. (2007) - Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*). Pelotas: Embrapa Clima Temperado (Documentos, n. 211). 24 p.
- Erig, A.C. & Schuch, M.W. (2005) - Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, vol. 35, n. 4, p. 961-965. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000400039>
- Ferreira, D.F. (2014) - Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 38, n. 2, p. 109-112. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- Fritsche, Y. (2012) - *Regeneração de estruturas semelhantes a protocormos e citometria de fluxo aplicadas ao melhoramento genético e ao estudo do genoma nuclear de orquídeas*. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina. 138 p.
- Golle, D.P. (2010) - *Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise da diversidade genética em acessos de Eugenia involucrata DC*. Tese de Doutorado. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria. 161 p.
- Golle, D.P.; Reiniger, L.R.S.; Curti, A.R. & León, E.A.B. (2012) - Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. *Ciência Florestal*, vol. 22, n. 1, p. 207-214. <http://dx.doi.org/10.5902/198050985092>
- Gomes, G.A.C.; Paiva, R.; Herrera, R.C. & Paiva, P.D.D.O. (2010) - Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. *Revista Árvore*, vol. 34, n. 1, p. 25-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622010000100003>
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A. (1998) - Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (Org.) - *Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas*. Brasília: Embrapa, vol. 1, p. 133-145.
- Kerbaudy, G.B. (2008) - *Fisiologia vegetal*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452 p.
- Lloyd, G. & McCown, B. (1980) - Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, vol. 15, n. 3, p. 416-420.
- Lorenzi, H. (2016) - *Árvores brasileiras: manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. vol. 1, 7 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum. 384 p.
- McGranahan, G.H.; Driver, J.A. & Tulecke, W (1987). Tissue culture of *Juglans*. In: Bonga, J.M. & Durzan, D.J. (Eds.) - *Cell and tissue culture in forestry: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, v.3, p. 261-271.
- Morais, T.P.; Asmar, S.A. & Luz, J.M.Q. (2014) - Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, vol. 16, n. 2, p. 350-355. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_017
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, n. 3, p.473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Navroski, M.C.; Reiniger, L.R.S.; Pereira, M.O.P.; Curti, A.R. & Paim, A.F. (2013) - Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Cerne*, vol. 19, n. 4, p. 545-550. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-77602013000400003>
- Pimentel-Gomes, F. (2009) - *Curso de estatística experimental*. 15 ed. Piracicaba, FEALQ, 451 p.

- Rabaiolli, S.M. dos S. (2014) - *Sementes e miniestaquia em Nectandra megapotamica (Spreng.) Mez. e sementes e micropropagação em Handroanthus chrysotrichus (Mart. ex DC.) J. Mattos*. Dissertação de Mestrado. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria. 100 p.
- Sartor, F.R.; Zanotti, R.F.; Pôssa, K.F.; Pilon, A.M. & Fukushima, C.H. (2013) - Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do Jacarandá da Bahia. *Bioscience Journal*, vol. 29, n. 2, p. 408-411.
- Sartoretto, L.M.; Saldanha, C.W. & Corder, M.P.M. (2008) - Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Ciência Rural*, vol. 38, n. 3, p. 861-871. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000300046>
- Stefanel, C.M. (2016) - *Aspectos da qualidade e sementes e do estabelecimento in vitro de Eugenia involucrata de Candolle*. Dissertação de Mestrado. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria. 101 p.
- Taiz, L.; Zeiger, E.; Møller, I. M. & Murphy, A. (2017) - *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 858p.
- Vidal, F.R.; Diniz, J.D.N. & Silva, F.P. (2013) - Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, vol. 43, n. 1, p. 64-70. <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-40632013000100010>
- Xavier, A.; Wendling, I. & Silva, R.L. (2013) - *Silvicultura Clonal: princípios e Técnicas*. Viçosa, Ed. UFV, 272 p.