

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE AGRONOMIA

Fernanda Pereira

Propagação *in vitro* de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*, Myrtaceae): Efeito de Thidiazuron (TDZ) na multiplicação em diferentes meios de cultura

Curitibanos

2019

Fernanda Pereira

Propagação *in vitro* de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*, Myrtaceae): Efeito de Thidiazuron (TDZ) na multiplicação em diferentes meios de cultura

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Agronomia do Centro de Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Júnior.

Curitibanos

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Fernanda

Propagação in vitro de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*, Myrtaceae) : Efeito de Thidiazuron (TDZ) na multiplicação em diferentes meios de cultura / Fernanda Pereira ; orientador, Paulo Cesar Poeta Fermino Júnior, 2019.

37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2019.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Cultura de tecidos. 3. Multiplicação.
4. Espécie nativa. I. Fermino Júnior, Paulo Cesar Poeta .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2176 E-mail: agronomia.cts@contato.ufsc.br.

FERNANDA PEREIRA

Propagação *in vitro* de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*, Myrtaceae): Efeito de Thidiazuron (TDZ) na multiplicação em diferentes meios de cultura

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Engenheiro Agrônomo, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Agronomia.

Curitibanos, 22 de novembro de 2019.

Prof. Dr. João Batista Tolentino Junior
Vice Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Leocir José Welter
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. José Floriano Barêa Pastore
Membro da banca examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus pais, Ana e César.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor e paciência nesses anos em que estive longe de casa. Por todo apoio, carinho, compreensão e presença mesmo distantes fisicamente. Por todo abraço, beijo e afeto nos nossos momentos de reencontro, foram a minha força para continuar. Obrigada por fazerem o possível e o impossível para que esse sonho fosse real, com todo o amor do mundo. Essa conquista também é a de vocês.

Aos meus avós, Nena e Hercílio, por cederem amorosamente e gentilmente sua casa para que eu pudesse morar enquanto cursava a universidade. Por toda comida quentinha, roupa limpa e casa com cheiro de lar.

Aos meus familiares por todas as caronas, por todos os puxões de orelha, por todos os conselhos e incentivos. Todos foram essenciais nessa caminhada. Em especial aos meus primos, por serem meus grandes irmãos da vida.

Aos grandes amigos que fiz durante essa trajetória, em especial a minha amiga Camila por todo companheirismo e cumplicidade. Todas as risadas, abraços, grupos de estudos e trabalhos em grupo me fizeram amadurecer e entender que sozinhos não chegamos a lugar algum. Também ao meu grande amigo e amor, Felipe. Por ser o conforto de um lar em qualquer lugar e por todos os abraços, carinhos e confidências.

Ao meu orientador, Paulo, por confiar em mim desde o segundo semestre onde eu me apaixonei pela cultura de tecidos e pela paciência nos meus momentos de agitação, e também ao professor Lírio por todo conhecimento transmitido, gentileza e paciência na orientação e ajuda com este trabalho.

Também a minha cadela, Preta. Por ser minha companheira, ouvinte e maior amor da vida, por me recepcionar todos os dias após as aulas e por ser a melhor amiga que alguém poderia ter.

Meu muito obrigada a todos.

RESUMO

A goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) é uma espécie nativa dos biomas Mata Atlântica e Pampa, os quais vem sofrendo intensas pressões antrópicas que acabam levando à perda de áreas de vegetação nativa e de biodiversidade. Com isso, vem sendo buscados métodos para conservação e propagação desta espécie, sendo a micropropagação uma das alternativas viáveis. Entretanto, a cultura de tecidos precisa de aprimoramento das técnicas disponíveis para serem utilizadas rotineiramente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ) e dos diferentes meios de cultura nas respostas morfológicas da goiaba-serrana. As análises foram compostas por dois experimentos, sendo o primeiro avaliando o efeito de diferentes concentrações de TDZ e o segundo avaliando o efeito de três meios de cultura (MS, WPM e LPm) nas diferentes concentrações de TDZ. As sementes utilizadas foram retiradas manualmente de frutos maduros cedidos pela Epagri e inoculados em meio MS sem reguladores para germinação *in vitro*. Posteriormente, segmentos nodais contendo de 1 a 2 nós foram retirados das plântulas e introduzidos ao meio MS para primeiro e segundo subcultivo suplementado com TDZ (0; 0,5; 1,0 e 2,0 μM). Após 30 dias foram avaliados e subcultivados, no mesmo meio com as mesmas concentrações do fitoregulador. No segundo experimento três formulações salinas (MS, WPM, LPm) e quatro concentrações de TDZ (0; 0,5; 1,0 e 2,0 μM) foram avaliados após 30 dias. O uso de TDZ em diferentes concentrações foi indiferente a formação de brotos, e ainda, o número de nós por broto regenerado diminuiu com o aumento da concentração de TDZ. Em subcultivo sucessivo, a taxa de resposta morfológica, o número de brotos regenerados, o número de nós por broto e a altura dos brotos diminuem. Em meio de cultura LPm os microbrotos regenerados tiveram efeito inibitório na altura dos brotos com o aumento da concentração de TDZ. O uso de 2,0 μM de TDZ em meio de cultura LPm promoveu menor número de brotos regenerados, menor número de nós por broto e menor altura dos brotos do que em meio MS e WPM. O protocolo recomendado para a multiplicação por organogênese direta consiste no uso do meio de cultura semissólido MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar-ágar, isento de regulador de crescimento.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Multiplicação. Espécie nativa.

ABSTRACT

The feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret) is a native species of the Mata Atlântica and Pampa biomes, which have been suffering intense anthropic pressures that lead to loss of areas and biodiversity. Thus, methods have been sought for conservation and propagation of this species, and micropropagation is one of the viable alternatives. However, tissue culture needs improvement of the techniques available for routine use. The objective of this work was to evaluate the influence of different Thidiazuron (TDZ) concentrations and different culture media on the morphogenic responses of feijoa. The analyzes consisted of two experiments, the first evaluating the effect of different TDZ concentrations and the second evaluating the effect of three culture media on different TDZ concentrations. The seeds used were manually removed from ripe fruits provided by Epagri and inoculated in MS media without regulators for in vitro germination. Subsequently, nodal segments containing 1 to 2 knots were removed from the seedlings and introduced to the MS media for first and second subcultures supplemented with TDZ (0; 0.5; 1.0 and 2.0 μM). After 30 days they were evaluated and subcultured in the same media with the same phytohormone concentrations. In the second experiment three saline formulations (MS, WPM, LPM) and four TDZ concentrations (0, 0.5, 1.0 and 2.0 μM) were evaluated after 30 days. The use of TDZ at different concentrations promotes bud formation, and the number of nodes per regenerated shoot decreases with increasing TDZ concentration. In successive subculture, the morphogenic response rate, the number of shoots regenerated, the number of nodes per shoot and the height of the shoots decrease. In LPM culture media regenerated microshoots had an inhibitory effect on shoot height with increasing TDZ concentration. The use of 2.0 μM of TDZ in LPM culture media promoted smaller number of regenerated shoots, smaller number of nodes per shoot and smaller shoot height than in MS and WPM media. The recommended protocol for direct organogenesis multiplication is the use of MS solid media supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 7,5 g L⁻¹ ágar-ágar free promotes.

Keywords: Tissue Culture. Multiplication. Native species.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Frascos contendo 5 explantes de *Acca sellowiana* para multiplicação *in vitro* em primeiro subcultivo.....21
- Figura 2 - Multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret a partir de segmentos nodais. (A) Sementes desinfestadas utilizadas na germinação *in vitro*; (B) broto formado no 1º cultivo; (C) broto formado no 2º subcultivo; e (D) flor formada anteriormente ao cultivo suplementado com TDZ (aparente apenas em cv. Alcântara).23
- Figura 3 - Respostas morfogênicas na multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret sob efeito de diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ). A. Percentual de respostas morfogênicas; B. Número de brotos regenerados; C. Número de nós/broto regenerado; D. Altura dos brotos regenerados (cm). Legendas: ns = não significativo a 5% de probabilidade; subcultivo 1; subcultivo 2. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas a 5% de probabilidade na comparação entre subcultivo 1 e 2 para cada concentração de TDZ.24
- Figura 4 - Respostas morfofisiológicas na multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em diferentes meios de cultura sob efeito de diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ). A. Percentual de respostas morfogênicas; B. Número de brotos regenerados; C. Número de nós/broto regenerado; D. Altura dos brotos regenerados (cm). Legendas: ns= não significativo a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas a 5% de probabilidade na comparação entre os meios de cultura para cada concentração de TDZ.....28
- Figura 5 - Microbrotos de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo *in vitro*. A. Florescimento da cultivar Alcântara apresentada em todos os meios de cultura (MS, WPM, LPm) e em diferentes concentrações de TDZ. B. Formação de calo na base dos segmentos nodais. Barras= 0,5 cm.31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

2iP Isopentenil Adenina

AIA Ácido Indol Acético

AIB Ácido 3-Indol Butírico

ANA Ácido alfa-Naftaleno Acético

ANOVA Análise de variância

BA 6-Benziladenina

BAP 6-Benzilaminopurina

CIN Cinetina

LPm Meio nutritivo elaborado por Von Arnold & Erikson (1981)

MS Meio nutritivo elaborado por Murashige & Skoog (1962)

TDZ Thidiazuron

WPM “Wood Plant Medium”, meio nutritivo elaborado por Lloyd & McCown (1981)

ZEA Zeatina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C graus Celsius

% Porcentagem

μM Micromolar (10^{-6} M)

μmol m⁻² s⁻¹ Micromol por metro quadrado por segundo

cm Centímetro

g Gramas

L Litro

mL Mililitros

mg Miligrama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	JUSTIFICATIVA.....	13
1.2	OBJETIVO.....	14
1.2.1	Objetivo geral	14
1.2.2	Objetivo específico	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	<i>Acca sellowiana</i> (O.Berg.) Burret.....	15
2.2	MICROPROPAGAÇÃO	16
2.3	MEIOS NUTRITIVOS	17
2.4	REGULADORES DE CRESCIMENTO.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	ORIGEM DO MATERIAL DE ESTUDO	20
3.2	CONDIÇÕES DO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	20
3.3	CULTIVO <i>IN VITRO</i> SOB EFEITO DE THIDIAZURON (TDZ).....	20
3.4	CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM DIFERENTES FORMULAÇÕES SALINAS	21
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	EFEITO DE SUBCULTIVOS SUCESSIVOS NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	23
4.2	EFEITO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES SALINAS NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	27
5	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A região sul do Brasil abriga inúmeras espécies alimentícias, entre essas, frutíferas nativas com grande potencial de uso, como algumas mirtáceas, a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), o araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine.) e a goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret.), sendo a goiabeira-serrana nativa da região do planalto meridional brasileiro e nordeste do Uruguai, com dispersões na Argentina e Paraguai (CIOTTA *et al.*, 2018).

Chamada de goiaba-serrana no Brasil, mas também conhecida como feijoa em outros países, possui alta variabilidade genética (GUERRA *et al.*, 2013). Apresenta porte reduzido, raramente ultrapassando 5 metros de altura. É predominantemente alógama, de floração tardia (outubro-novembro) quando não há mais riscos de geada e com polinização feita, em grande parte, por pássaros frutívoros que comem as pétalas da goiabeira-serrana e ficam com pólen da espécie na cabeça (DUCROQUET & HICKEL, 1997).

Apesar de ser comercialmente explorada na Nova Zelândia, Estados Unidos, Austrália e alguns países europeus, a goiaba-serrana foi recentemente domesticada e cultivada comercialmente no Brasil (GUERRA *et al.*, 2013). O interesse de estudo desta planta também se deve ao fato de a espécie ser adaptada as condições edafoclimáticas da região sul brasileira. Além da qualidade dos frutos, que podem ser consumidos *in natura* ou processados, por suas pétalas que podem também ser destinadas ao consumo humano (como decoração em pratos, saladas, doces, etc.) e, ainda, devido à sua beleza na época de floração, a goiabeira-serrana pode ser utilizada como planta ornamental (CIOTTA *et al.*, 2018).

A goiabeira-serrana pode ser propagada de forma sexuada, onde as mudas são obtidas a partir de sementes, e de forma assexuada, sendo realizada a partir de técnicas de clonagem, como enxertia, estaquia, mergulhia e micropropagação (FACHINELLO; NACHTIGAL, 1992).

Em especial, a micropropagação ou propagação *in vitro*, apresenta potencial para conservação de germoplasmas, limpeza clonal (plantas livres de vírus), produção em massa de mudas, aceleração dos programas de melhoramento pela multiplicação de clones, entre outras funções no meio biotecnológico (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O sucesso do cultivo *in vitro* de espécies vegetais depende de diversos fatores ligados à indução e ao controle da morfogênese quanto à regeneração de brotos e sistema radicular no processo de organogênese, fazendo com que o controle da composição do meio de cultura seja essencial. Sendo assim, vários tipos de reguladores vegetais vêm sendo empregados nas

técnicas de micropropagação, com destaque na suplementação do meio com auxinas e citocininas (SOUZA *et al.*, 2010).

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada através da avaliação das respostas fisiológicas apresentadas pela planta com meios suplementados com diferentes tipos de citocininas exógenas. Dentre os protocolos de cultura de tecidos, a citocinina mais utilizada é o BAP (6-benzilaminopurina). Contudo, a CIN (Cinetina) e o TDZ (Thidiazuron) também mostraram resultados promissores (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

1.1 JUSTIFICATIVA

O interesse no estudo desta espécie se deve ao potencial organoléptico dos frutos. A exploração comercial e cultivo da goiaba-serrana é capaz de permitir a oferta à população de uma nova opção de frutos, com propriedades nutracêuticas desejáveis (AMARANTE; SANTOS, 2011).

Como métodos de propagação, a estaquia, apresenta baixa eficiência (DUARTE *et al.*, 1992) e baixa taxa de enraizamento (CIOTTA *et al.*, 2018). Uma das hipóteses seria a elevada quantidade de compostos fenólicos que promovem a rápida oxidação das estacas recém-retiradas dos ramos da planta-matriz. A enxertia também apresenta baixos índices de pega com enxertia lenhosa ou semilenhosa, onde os índices não ultrapassam 20% a 30% (CIOTTA *et al.*, 2018).

Com essas limitações, a cultura de tecidos vegetais e seus procedimentos podem ser aplicados com sucesso para a micropropagação de clones em massa de genótipos com alto valor genético, fixando genótipos de interesse agrícola, com boas condições fitossanitárias e para domesticação da espécie. Entretanto, as técnicas disponíveis necessitam de aperfeiçoamento para serem utilizadas rotineiramente.

1.2 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da citocinina Thidiazuron (TDZ) e o efeito dos diferentes meios de cultivo (MS, WPM e LPm) na multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito de diferentes concentrações de TDZ em sucessivos subcultivos (primeiro e segundo subcultivos);
- Comparar as respostas morfogênicas em diferentes formulações salinas (MS, WPM, LPm) na multiplicação *in vitro* com o uso de diferentes concentrações de TDZ.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret

Pertencente à família *Myrtaceae* e popularmente conhecida como goiaba-serrana, feijoa, goiabeira-do-campo ou goiabeira-do-mato, a *Acca sellowiana* foi descrita pela primeira vez em 1856, pelo botânico Otto Karl Berg. No Brasil, ocorre com maior frequência nas áreas de bosque e floresta de araucárias nos estados do Paraná e Santa Catarina, e no Rio Grande do Sul, ocorre nas margens da Floresta Estacional Decidual e em Campos sulinos, em altitudes menores do que nos estados acima. Mostrando-nos que houve influência antrópica em sua dispersão nesses locais (CIOTTA *et al.*, 2018).

Apesar de ser uma fruta nativa brasileira, ela é menos conhecida no Brasil do que no exterior. É uma árvore de pequeno porte ou arbusto, com altura média de dois a seis metros, com galhos muito ramificados e frutificações a partir do quarto ano de vida. As *Myrtaceas* brasileiras são comumente exploradas por suas frutificações, no caso da goiabeira-serrana, também por sua considerável beleza. A *A. sellowiana* recebeu o nome comum de goiabeira-serrana por sua semelhança física com a goiaba comum (*Psidium guajava* L.) (MORETTO, 2014).

Segundo Amarante & Santos (2011), a goiaba-serrana vem sendo estudada desde 1986 em Santa Catarina, pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (Epagri), com o objetivo de selecionar genótipos superiores que se desenvolvam em um sistema de produção de escala comercial. Com isso, entre 2007 e 2008, foram lançados as quatro primeiras cultivares comerciais brasileiras, sendo elas: Alcântara, Helena, Mattos e Nonante.

A cultivar Alcântara é oriunda da seleção de mudas com origem de uma planta identificada em 1987 em Bom Jardim da Serra (SC). Destaca-se por sua precocidade de maturação, sendo está a primeira a iniciar a colheita seguida das cultivares citadas, em meados de março nas condições do Planalto Serrano de Santa Catarina (CIOTTA *et al.*, 2018).

Já a cultivar Helena foi selecionada entre as 960 mudas obtidas em função de um projeto de melhoramento genético em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina, iniciado em 1995. O projeto avaliou progênies do cruzamento entre o acesso 101 (coletado em Urubici – SC) e o cultivar neozelandês ‘Unique’, formando assim uma planta de alta

produtividade, porte pequeno, precocidade na produção, com bom tamanho e aparência dos frutos (CIOTTA *et al.*, 2018).

A cultivar Mattos foi selecionada por sua boa aparência e tamanho de frutos, de ocorrência natural em São Joaquim (SC). Este é o segundo a entrar em maturação, geralmente na segunda quinzena de março, estendendo-se por até 30 dias. Requer atenção quanto a questão fitossanitária. E a cultivar Nonante, também é oriunda da seleção das 960 mudas assim como a cultivar 'Helena', entretanto o cruzamento foi entre o acesso 101 (coletado em Urubici – SC) e o acesso 50 (coletado em Videira – SC), gerando um genótipo de alta produtividade, produção regular, boa qualidade de frutos, com maturação tardia (segunda quinzena de abril, entendendo-se por até 30 dias), além de ser autocompatível (DUCROQUET *et al.*, 2008).

2.2 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação está envolvida na produção de plantas a partir de células, tecidos e órgãos, que são cultivados *in vitro* em meio nutritivo e sob condições assépticas além do controle rigoroso das condições ambientais (BRONDANI, 2012).

Para o desenvolvimento de cultivares superiores de plantas, a técnica de cultura de tecidos vem sendo utilizada de formas divergentes. Entre elas, a propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação é a aplicação mais prática e com maior impacto na cultura de tecidos. O destaque especial é por permitir a multiplicação e manutenção rápida de mudas, a partir de um genótipo selecionado, em curto prazo e em espaços reduzidos, além de ser seguro quanto aos problemas fitossanitários. A micropropagação tem como base a teoria da totipotência celular, a qual coloca, a qualquer parte da planta, o potencial de regenerar órgãos que lhe faltam, desde que se forneça condições ótimas para tal fato (PAIM, 2011).

Segundo Brondani (2012) a micropropagação é dividida em cinco fases, nas quais, primeiramente, referem-se à condição em que a planta matriz se encontra e está intimamente ligada ao seu estado fisiológico, sanidade e o ambiente em que ela se localiza. As matrizes bem nutridas, vigorosas, sadias, livres de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento são as ideais para fornecerem os melhores explantes. Posteriormente, encontra-se o estabelecimento do explante *in vitro*. Todas as operações devem ser realizadas em condições assépticas e em câmara de fluxo laminar, para evitar qualquer tipo de contaminação que possa competir ou até mesmo matar o explante. Por isso, recomenda-se que o explante seja

introduzido em tubo de ensaio ou potes de cultura absolutamente livre de contaminação (autoclavados e assepsiados antes do uso). Seguindo, são as fases de multiplicação, alongamento das brotações e indução do enraizamento, respectivamente.

Para goiabeira-serrana, existem protocolos de micropropagação com taxas de enraizamento de até 69% (OLTRAMARI *et al.*, 2000), entretanto é um método de maior custo que necessita de infraestrutura de laboratórios e pessoas especializadas. Contudo, a técnica de cultura de tecidos auxilia na preservação de espécies, na obtenção de plantas livres de pragas e doenças e ainda proporciona a produção de um número significativo de novas mudas uniformes e com características idênticas a da planta mãe. Para obtenção dessas mudas em larga escala, está a organogênese (BATISTA, 2012).

A organogênese se dá, geralmente, pela otimização da relação citocinina e auxina no meio de cultura e ocorre pela diferenciação de órgãos e brotos diretamente do explante (organogênese direta) ou do calo (organogênese indireta). Depende de diversos fatores, internos e externos, do tipo de meio de cultura, da fonte de explante e dos fatores do ambiente, como também, da ação dos reguladores de crescimento (BATISTA, 2012).

2.3 MEIOS NUTRITIVOS

Os meios nutritivos ou meios de cultura são utilizados na cultura de tecidos para o fornecimento de substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos *in vitro*. Em geral, os meios consistem em uma mistura balanceada de macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas, e em alguns casos, reguladores de crescimento (AMARAL, 2006).

As formulações e dosagens dos meios variam de acordo com cada fase de desenvolvimento e necessidade da cultura estabelecida *in vitro*. Os meios se baseiam nas exigências nutricionais de cada planta, com algumas alterações para se adaptarem ao ambiente *in vitro* (QUISEN; ANGELO, 2008). Podem ser sólidos, semissólidos ou líquidos, dependendo do protocolo para o sistema de cultivo (GUERRA *et al.*, 2016).

Segundo Paim (2011), a composição do meio nutritivo varia de acordo com a espécie a ser micropropagada e com as diferentes etapas do processo, ou seja, estabelecimento, multiplicação e enraizamento.

O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) é usado em todo o mundo, especialmente em casos de morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas, caracterizada por sua

elevada concentração de sais. Foi formulado inicialmente para micropropagação de células de tabaco (*Nicotiana* sp.), mas apresentou-se eficiente para a maioria das espécies herbáceas (QUISEN; ANGELO, 2008; BERTOZZO; MACHADO, 2010).

Já o meio WPM – Wood Plant Medium (Lloyd e McCown, 1981) possui $\frac{1}{4}$ das concentrações de nitrato e amônio em relação ao meio MS, além de mais potássio e maiores níveis de sulfato. Seu uso é abundante na micropropagação de arbustos e plantas lenhosas (QUISEN; ANGELO, 2008).

O meio LPm (Von Arnold & Erikson, 1981) é muito utilizado nos processos de indução de embriogênese somática, as concentrações de sais são intermediárias as formulações MS e WPM (AMARAL, 2006).

2.4 REGULADORES DE CRESCIMENTO

Os hormônios de plantas ou também chamados fitormônios, são compostos orgânicos sintetizados em alguma parte da planta e posteriormente translocado para outra parte, provocando uma resposta fisiológica (promoção ou inibição). Em relação aos reguladores de crescimento é normalmente utilizado para designar compostos naturais ou sintéticos que apresentam atividade no controle do crescimento e/ou desenvolvimento da planta. Os reguladores de crescimento adicionados em meios nutritivos servem para suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, e também, estimular o alongamento e multiplicação da parte aérea (PAIM, 2011).

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento comumente utilizadas na cultura de tecidos. A formação da raiz, parte aérea e formação de calos na micropropagação é resultado da interação e disponibilidade desses dois reguladores (CURTI, 2011).

Ainda segundo Curti (2011), as auxinas frequentemente utilizadas são ANA, AIA, AIB, 2,4-D, entre outras possuem diferentes respostas *in vitro*. AIB é a auxina frequentemente utilizada na indução de raízes e ANA é utilizada em meios de isolamento, entretanto em concentrações maiores tende a estimular o desenvolvimento de calos. Entre as citocininas também existem diferenças. BAP, ZEA, CIN, 2iP, TDZ, entre outras, sendo que BAP leva ao maior número de brotos, e conseqüentemente, a maior taxa de multiplicação em vários sistemas de micropropagação, e ainda, é a citocinina sintética de menor custo em relação a outras citocininas e é a mais utilizada na multiplicação de diversas espécies.

As citocininas são hormônios que auxiliam vários processos nas plantas, como divisão celular, morfogênese, maturação de cloroplastos, crescimento de brotos laterais e senescência. Também possuem influência na síntese proteica e no tipo de proteína produzida pelas células (MELO, 2002)

O TDZ é outra substância com atividade de citocinina que vem sendo empregada como regulador de crescimento bastante eficaz na cultura de tecidos para diferentes tipos de espécies, podendo ser utilizado desde gramíneas, herbáceas até espécies lenhosas, por exemplo. TDZ é relativamente estável em sistema de regeneração e as respostas fisiológicas podem ser induzidas mesmo depois de um longo prazo de armazenamento das soluções estoque (CURTI, 2011). O TDZ promove crescimento e rediferenciação de tecidos (PAIM, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DO MATERIAL DE ESTUDO

Para iniciação e estabelecimento da cultura *in vitro*, foram utilizadas sementes extraídas de frutos fisiologicamente maduros coletados de plantas matrizes de duas cultivares de *Acca sellowiana*, Helena (Registro no MAPA SCS 412) e Alcântara (Registro no MAPA SCS 411) doados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), da cidade de São Joaquim – SC.

3.2 CONDIÇÕES DO CULTIVO *IN VITRO*

O experimento foi realizado no laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos. Para o cultivo *in vitro* e multiplicação da goiabeira-serrana, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962). Todos os processos de manipulação foram realizados em câmara de fluxo laminar horizontal e posteriormente mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e lâmpadas fluorescentes brancas ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons), com fotoperíodo de 16 h.

3.3 CULTIVO *IN VITRO* SOB EFEITO DE THIDIAZURON (TDZ)

Para o cultivo *in vitro*, as sementes de *Acca sellowiana* foram removidas manualmente dos frutos maduros, lavadas em água corrente com detergente para a remoção da mucilagem e armazenadas em geladeira (9°C) por 15 dias. Para a assepsia seguiu-se o protocolo de desinfecção com imersão em álcool 70% por 2 minutos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, e finalmente em água destilada esterilizada, por três vezes consecutivas para a remoção das substâncias de assepsia. Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar-ágar para a germinação.

Após 90 dias da germinação, segmentos nodais contendo de 1 a 2 nós caulinares foram removidos das plântulas e transferidos para meio de multiplicação. O meio de multiplicação foi composto por sais de MS (Murashige e Skoog, 1962 – SIGMA - Aldrich®) suplementado

com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2 g L⁻¹ de Phytigel, e diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ): 0 µM; 0,5 µM; 1,0 µM e 2,0 µM. Em cada frasco foram inoculados cinco explantes de *Acca sellowiana* cv. Helena. Os frascos de vidro foram fechados com tampa plástica convencional (sem troca gasosa) e ainda foram vedados com PVC.

Após 30 dias, os novos brotos regenerados (multiplicados) *in vitro* foram removidos na base com auxílio de bisturi e subcultivados (2º subcultivo), mantendo as respectivas concentrações de TDZ das condições do 1º cultivo. Os parâmetros avaliados no subcultivo 1 e 2 foram: percentual de resposta morfogênica, número de brotos, número de nós por brotos, e altura de brotos (cm).

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 2 (quatro concentrações de TDZ e 2 subcultivos sucessivos) com 3 repetições, sendo utilizados 5 explantes em um frasco por parcela (Figura 1).

Figura 1. Frascos contendo 5 explantes de *Acca sellowiana* para multiplicação *in vitro* em primeiro subcultivo.



3.4 CULTIVO *IN VITRO* EM DIFERENTES FORMULAÇÕES SALINAS

Sementes de *A. sellowiana* cv. Alcântara foram retiradas manualmente dos frutos maduros e posteriormente passaram por assepsia conforme descrito no item 3.3. Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar-ágar para a germinação.

Após 98 dias, foram extraídas as raízes das plântulas e os brotos foram inseridos novamente em meio MS (Murashige e Skoog, 1962 – SIGMA - Aldrich®). Passados 53 dias, segmentos nodais contendo de 1 a 2 nós caulinares foram removidos das plântulas e transferidos para meio de multiplicação. O meio de multiplicação foi composto por sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), sais de WPM (Lloyd e McCown, 1981) e LPm (Von Arnold & Erikson, 1981), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7,5 g L⁻¹ de ágar-ágar, 5 ml L⁻¹ de vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e as diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ): 0 µM; 0,5 µM; 1,0 µM e 2,0 µM. Os frascos de vidro foram fechados com tampa plástica convencional (sem troca gasosa) e ainda foram vedados com PVC.

Após 30 dias, os novos brotos regenerados foram avaliados quanto a: percentual de resposta morfogênica, número de brotos, número de nós por broto, e altura de brotos (cm).

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 3 (quatro concentrações de TDZ e 3 formulações salinas de meio de cultivo) com 3 repetições, sendo utilizados 5 explantes em um frasco por parcela.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

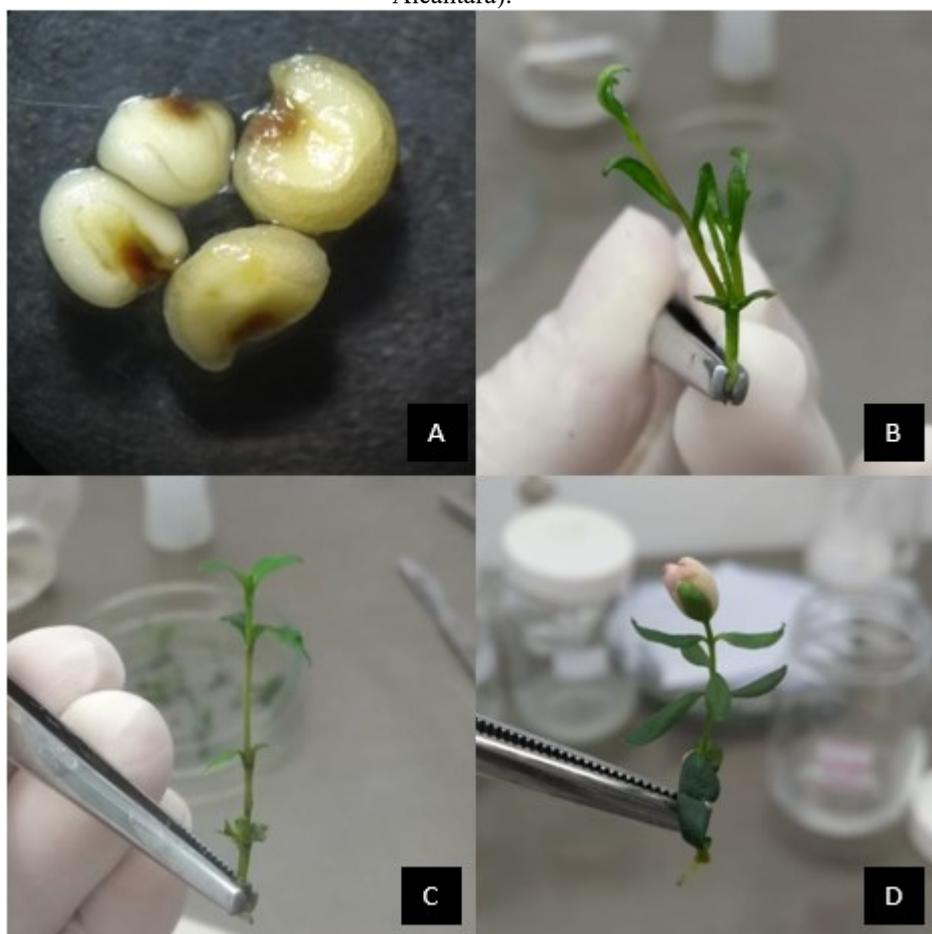
Os dados obtidos em cada parâmetro avaliado foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para os fatores qualitativos foi utilizado o teste SNK ao nível de 5% de probabilidade, e para os fatores quantitativos foi empregada a análise de regressão. A análise estatística foi realizada através do software estatístico R Core Team (2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DE THIDIAZURON (TDZ) NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

A formação de brotos adventícios ocorreu em todas as concentrações utilizadas de TDZ (Figura 2), inclusive na sua ausência. O percentual de respostas morfogênicas, o número de brotos regenerados, e a altura dos brotos não foram significativos para o efeito das concentrações de TDZ (Figura 3A, B, D) e para a interação dos fatores concentrações e subcultivos. O número de nós por broto regenerado foi significativo para o efeito das concentrações de TDZ (Figura 3C). Em todos os parâmetros, o efeito dos subcultivos foram estatisticamente significativos.

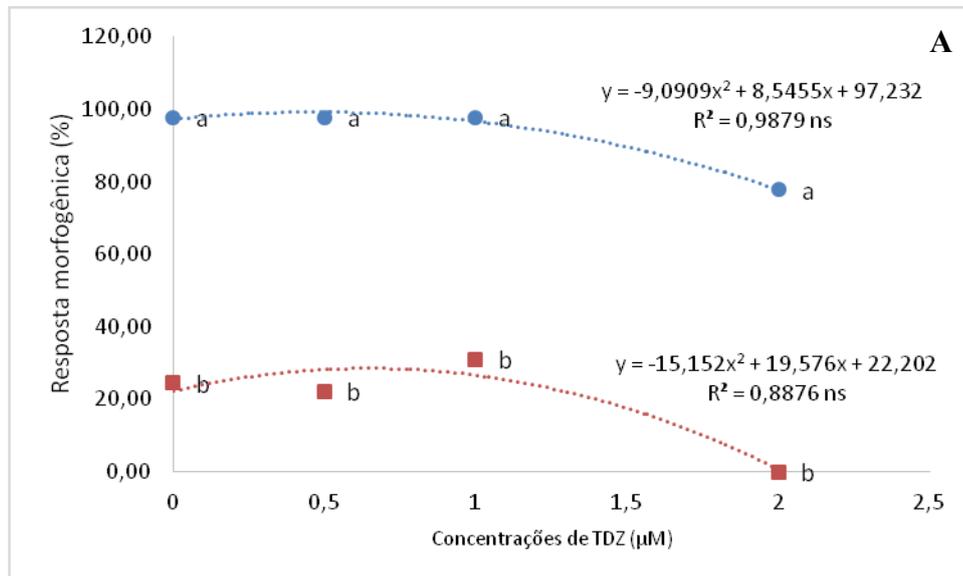
Figura 2. Multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret a partir de segmentos nodais. (A) Sementes desinfestadas utilizadas na germinação *in vitro*; (B) broto formado no 1° cultivo; (C) broto formado no 2° subcultivo; e (D) flor formada anteriormente ao cultivo suplementado com TDZ (aparente apenas em cv. Alcântara).

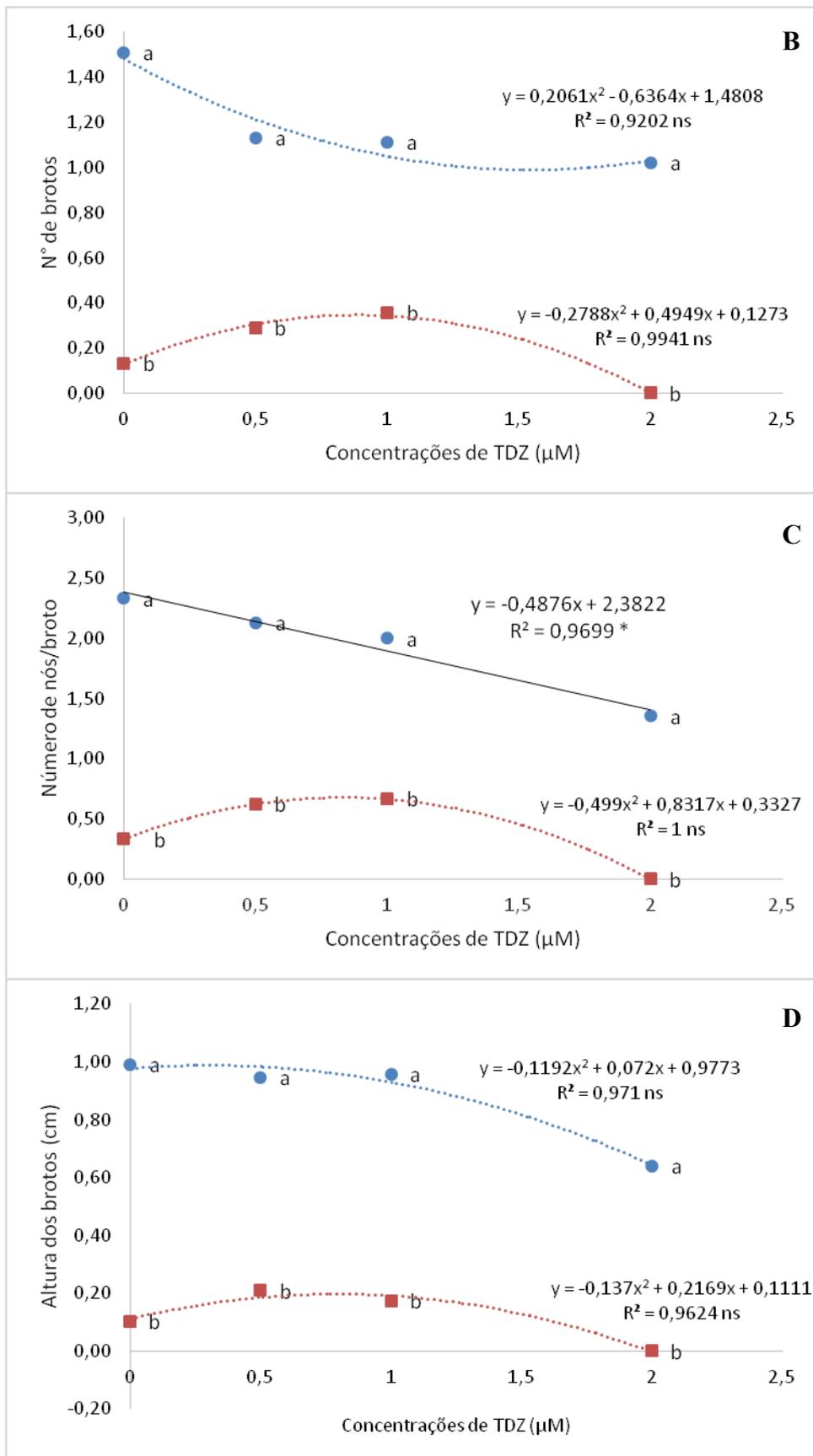


As diferentes concentrações de TDZ não promoveram diferenças significativas no percentual de respostas morfogênicas, no número de brotos regenerados e na altura dos brotos. Com relação ao número de nós por broto o aumento das concentrações de TDZ promoveu efeito inibitório no primeiro subcultivo (Figura 3C), expresso por equação de regressão linear com coeficiente de determinação r^2 de 0,96.

Na multiplicação *in vitro* de *Eugenia involucrata* (GOLLE *et al.*, 2017), o maior número médio de brotações ocorreu na ausência de TDZ. O maior número de brotações por explante e o número médio de gemas adventícias é observado com o uso combinado de 0,5 μM de ANA e 32 μM de TDZ. O TDZ também não causou hiperhidricidade nas plântulas.

Figura 3. Respostas morfogênicas na multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret sob efeito de diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ). **A.** Percentual de respostas morfogênicas; **B.** Número de brotos regenerados; **C.** Número de nós/broto regenerado; **D.** Altura dos brotos regenerados (cm). Legendas: ns = não significativo a 5% de probabilidade; ● subcultivo 1; ■ subcultivo 2. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas a 5% de probabilidade na comparação entre subcultivo 1 e 2 para cada concentração de TDZ.





Ainda sobre as concentrações de TDZ, Oliveira (2016) quando utilizou TDZ nas mesmas concentrações de BAP (0,25; 0,5; 0,75 e 1 mg L⁻¹) para micropropagação de *Eremanthus incanus* (Less.) Less., em dois subcultivos, os explantes apresentaram menores números de brotações, indicando que o TDZ ao contrário de estimular pode ter inibido a produção de brotações. Supõe-se que a diminuição das brotações do primeiro para o segundo subcultivo está relacionada ao fato das citocininas possuírem grande efeito residual, assim como, a grande produção de calos principalmente para o TDZ podendo indicar toxidez, além de que a autora conclui que a citocinina mais indicada para multiplicação seria o BAP. Na micropropagação de crisântemo o TDZ não estimulou significativamente a produção de brotos a partir dos explantes *in vitro* (SALGADO *et al.*, 2001).

Na propagação *in vitro* de *Campomanesia rufa* (SANT'ANA *et al.*, 2018), foram testados diferentes tipos e concentrações de citocininas para indução das brotações, sendo usados o BAP, BA ou TDZ nas concentrações 0; 2,25; 4,5 e 9,0 µM. O uso de BAP proporcionou maiores taxas de brotações, com maior formação na concentração 4,5 µM sem se diferir estatisticamente da concentração 9,0 µM. Também foram avaliados os explantes ao longo do tempo (30, 60 e 90 dias), mostrando que BAP foi o único que demonstrou diferença ao longo dos dias, tendo a maior taxa de brotações aos 90 dias. Para as outras fontes de citocininas, a diminuição do comprimento das brotações e no número de gemas, demonstram que pode haver uma possível fitotoxicidade das fontes de BA e TDZ.

Em todas as concentrações de TDZ utilizadas em *A. sellowiana* para todos os parâmetros avaliados a comparação entre o subcultivo 1 e o subcultivo 2 tiveram diferenças significativas, sendo os resultados no subcultivo 2 inferiores ao subcultivo 1 (Figura 3). Semelhante a isso, em frutíferas contemporâneas, em todos os genótipos estudados foram observados que ao início do estudo a taxa de multiplicação estava no máximo e após o segundo subcultivo declinou, mostrando que o potencial morfogenético dos tecidos diminuiu gradualmente conforme foram subcultivados (VUJOVIĆ; RUŽIĆ; CEROVIĆ, 2012).

Uma das hipóteses para o declínio das brotações pode ser devido ao efeito residual do hormônio utilizado. Segundo Hussain *et al.* (2007), a redução na formação das brotações de *Sterculia urens* Roxb. pode melhorar com a redução da concentração da citocinina TDZ, favorecendo a produção contínua de brotações. Em ensaios com amoreira-preta (VILLA *et al.*, 2006), os autores citam que apesar da utilização de citocinina ser essencial para multiplicação dos brotos, o excesso pode ser tóxico e algumas características observadas são: falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós.

De acordo com Mankessi *et al.* (2009), as plantas ao ficarem expostas excessivamente aos regimes de subcultivos de longo prazo, com componentes inadequados dos meios, podem resultar na elevação das concentrações ideais de certas substâncias no interior dos tecidos vegetais, refletindo no desempenho da cultura como na obtenção de baixas taxas de multiplicação.

Segundo Huetteman & Preece (1993), as concentrações de TDZ eficazes são de 10 a 1000 vezes menores do que outros reguladores de crescimento de plantas. Os autores também descobriram que, em alguns casos, o cultivo em duas etapas, que consiste em um meio primário contendo TDZ para induzir a proliferação de brotações seguida por um meio secundário com concentrações menores de TDZ ou outros fitorreguladores para promover o desenvolvimento das brotações, pode ser muito eficaz. No geral, concentrações mais baixas de TDZ (inferiores a 1 μM) têm a capacidade de induzir maiores taxas de brotações, e em concentrações mais altas, pode levar a formação de calos.

4.2 EFEITO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES SALINAS NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

O percentual de resposta morfogênica, o número de brotos regenerados e o número de nós por broto não foram significativos para o efeito das concentrações de TDZ, para os tipos de meio de cultura (Figura 4A, B, C) e para a interação entre os fatores. A altura das brotações foi significativa para o efeito dos tipos de meio de cultura (Figura 4D).

O uso do meio de cultura LPm com concentrações crescentes de TDZ promoveu redução na altura dos brotos regenerados (Figura 4D), expresso por ajuste de equação de regressão linear com coeficiente de determinação r^2 de 0,92.

Segundo Goelzer *et al.* (2019), na micropropagação de guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg) foram testadas concentrações de TDZ (5 μM), ANA (1 μM) e a combinação dos dois fitorreguladores em meio MS, encontrando que o meio suplementado com TDZ apresentou brotações de maiores alturas, e ainda, promoveu aumento no número de folhas e da taxa de multiplicação.

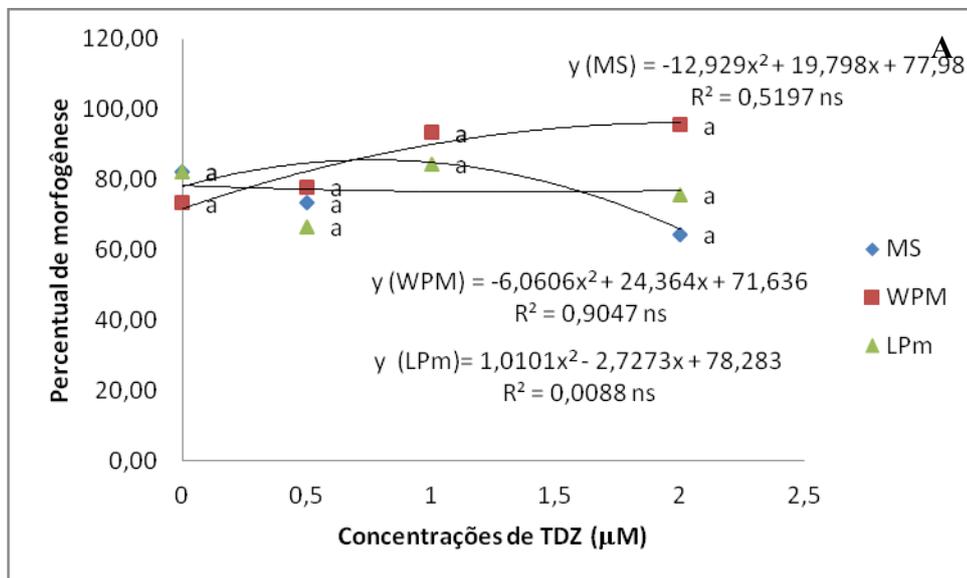
Similar a isto, na micropropagação de *Cedrela fissilis* (AMARAL, 2006), foram utilizados duas formulações salinas (WPM e MS) combinadas com as citocininas BAP e CIN concentradas a 5 $\mu\text{M L}^{-1}$, sendo BAP (5 $\mu\text{M L}^{-1}$) a citocinina que apresentou melhor média para número de brotos em relação a CIN na mesma concentração ou na ausência destas. Para

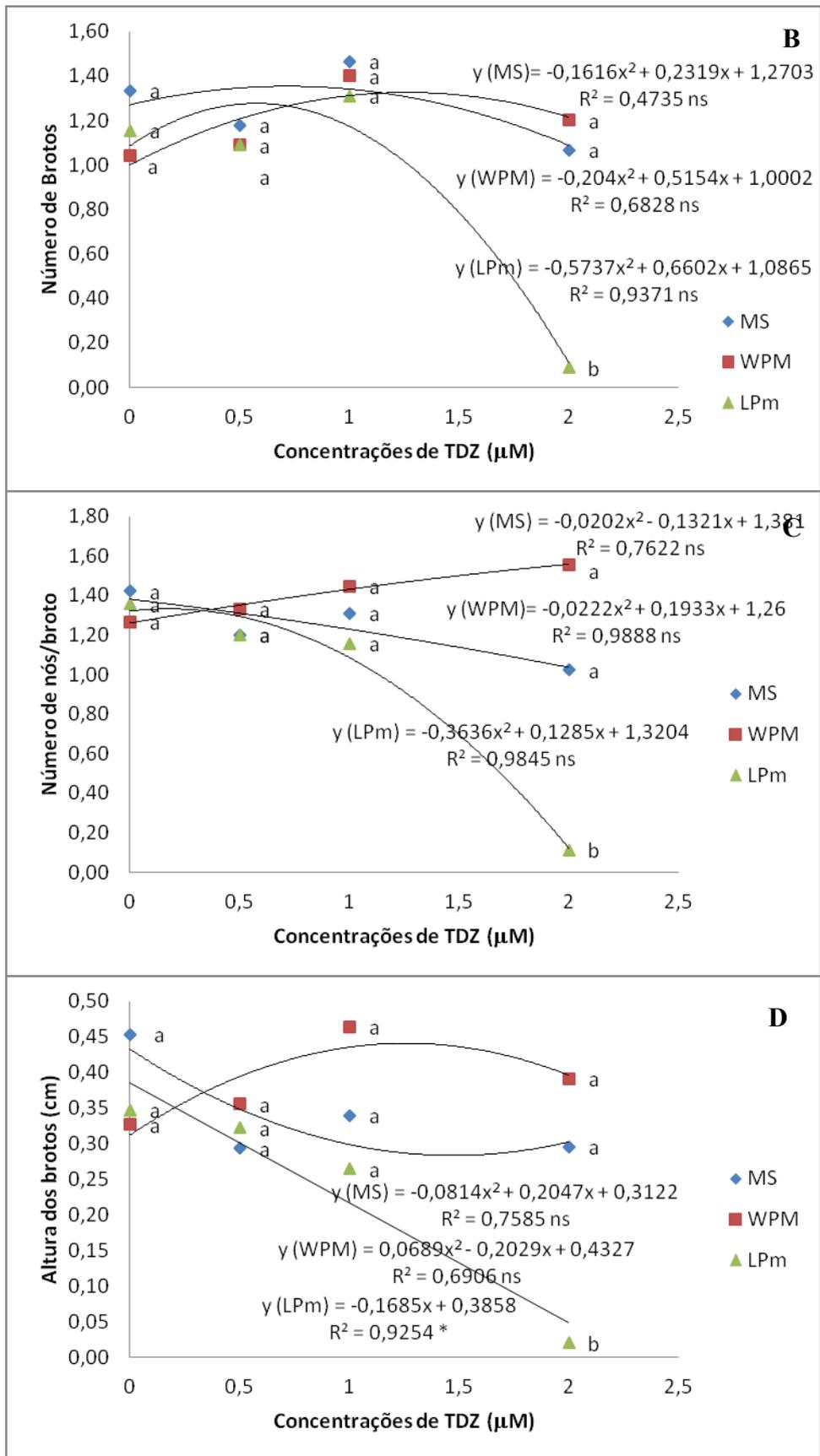
os meios de cultura não houve diferença significativa nem mesmo interação entre os meios e efeito das citocininas.

Amaral (2006) ainda explica a inter-relação entre os sais inorgânicos presentes no meio de cultura e os fitorreguladores adicionados, que em parte, podem explicar as diferenças na capacidade de multiplicação de brotações na goiabeira-serrana. A maioria das formulações salinas incorporam ambos sais de nitrato e amônio como fonte de nitrogênio para o crescimento, onde a forma e a concentração de nitrogênio influenciam significativamente na síntese de citocininas endógenas.

Para Fracaro & Echeverrigaray (2011), o meio MS é superior aos outros por apresentar maiores concentrações de nitrogênio em sua formulação. Dal Vesco & Guerra (1999) citam que o meio WPM pode ser superior pelo fato de ser uma solução salina específica para plantas lenhosas assim como a goiabeira-serrana.

Figura 4. Respostas morfofisiológicas na multiplicação *in vitro* de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret em diferentes meios de cultura sob efeito de diferentes concentrações de Thidiazuron (TDZ). **A.** Percentual de respostas morfogênicas; **B.** Número de brotos regenerados; **C.** Número de nós/broto regenerado; **D.** Altura dos brotos regenerados (cm). Legendas: ns= não significativo a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam a existência de diferenças significativas a 5% de probabilidade na comparação entre os meios de cultura para cada concentração de TDZ.





O percentual de morfogênese não apresentou diferenças significativas entre os tipos de meio de cultura em todas as concentrações avaliadas (Figura 4A). O número de brotos regenerados, o número de nós por broto e a altura dos brotos não apresentaram diferenças significativas com a utilização das concentrações 0; 0,5 e 1,0 μM comparando se os meios MS, WPM e LPm. Na concentração de 2,0 μM o meio LPm apresentou o menor número de brotos regenerados (Figura 4B), o menor número de nós por broto (Figura 4C) e a menor altura dos brotos (Figura 4D).

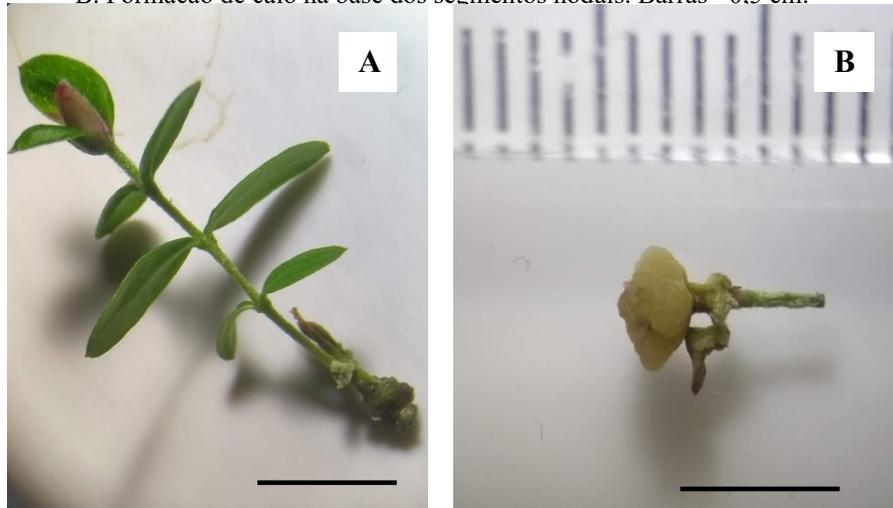
De acordo com Jesus *et al.* (2002), no cultivo *in vitro* de café arábica, em meio de cultura MS sem suplemento de BAP e posteriormente subcultivados em meio MS suplementado com TDZ, não houve incremento em nenhuma das variáveis avaliadas, sem diferença entre os tratamentos. Os autores ainda citam que o TDZ vem apresentando resultados superiores em relação a outras citocininas, na indução e multiplicação de diversas espécies. Contudo, algumas anormalidades vêm ocorrendo associadas ao seu uso na cultura de tecidos, como brotos menores e menos vigorosos.

Para George *et al.* (2008) não há formulação salina padrão para a utilização *in vitro*, contudo o meio MS, com suas modificações e diluições, vem sendo utilizado com sucesso para diversas culturas. Também ressalta que o sucesso do processo de micropropagação da planta é altamente influenciado pela natureza da formulação salina utilizada.

Dal Vesco & Guerra (1999) concluíram que o meio MS suplementado com TDZ em concentração de 4,5 μM estimulou a proliferação de gemas múltiplas em *Acca sellowiana* (acesso 159), mas as taxas mais elevadas de multiplicação e o maior vigor das brotações (acesso 53B-7) foram obtidos com o meio WPM na ausência de fitorreguladores, na cultura de segmentos nodais. Ainda demonstraram que as respostas morfogenéticas são dependentes dos genótipos.

No presente estudo com *A. sellowiana* cv. Alcântara foi observado a formação de flores, mesmo após o subcultivo e manifestou-se em todos os meios de cultura e nas diferentes concentrações de TDZ (Figura 5A).

Figura 5. Microbrotos de *Acca sellowiana* (O.Berg.) Burret no cultivo *in vitro*. A. Florescimento da cultivar Alcântara apresentada em todos os meios de cultura (MS, WPM, LPm) e em diferentes concentrações de TDZ. B. Formação de calo na base dos segmentos nodais. Barras= 0,5 cm.



A formação de calos na base dos segmentos nodais foi verificada em explantes no meio de cultura LPm suplementado com TDZ a uma concentração de 2,0 μM em todas as repetições, sem desenvolvimento de parte aérea (Figura 5B). Cangahuala-Inocente *et al.* (2007), utilizando explantes com tecidos florais de *Acca sellowiana* em meio LPm com 2,4-D e Dicamba obtiveram culturas embriogénicas e não embriogénicas com formação de calo. Para Pimenta-de-macaco (PORFIRIO *et al.*, 2019) a porcentagem de calos foi superior nos tratamentos que continham o meio MS, não comprometendo a formação de brotos. Concentrações mais altas de citocinina podem promover a formação de calos, não sendo o objetivo na fase de multiplicação, pois interferem completamente no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização das plântulas.

Para Cordeiro *et al.* (2014), as citocininas são indispensáveis para quebrar a dominância apical e induzir a proliferação de gemas axilares, bem como a sua combinação com as auxinas são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*, sendo também afetada de maneira diferenciada pelos meios de cultura.

5 CONCLUSÃO

O uso do Thidiazuron (TDZ) nas diferentes concentrações utilizadas foi indiferente na formação de brotos adventícios em segmentos nodais de *Acca sellowiana*.

O número de nós por broto regenerado diminui com o aumento da concentração de TDZ. O percentual de resposta morfogênica, o número de brotos regenerados e a altura dos brotos independem da concentração de TDZ utilizada.

O segundo subcultivo sucessivo aos 30 dias promoveu menor percentual de resposta morfogênica do explante, número de brotos regenerados, número de nós por broto e altura dos brotos em todas as concentrações de TDZ avaliadas.

Em meio de cultura LPm os microbrotos regenerados tiveram efeito inibitório na altura dos brotos com o aumento da concentração de TDZ.

O uso de 2,0 μM de TDZ em meio de cultura LPm promoveu menor número de brotos regenerados, menor número de nós por broto e menor altura dos brotos do que em meio MS e WPM.

O protocolo recomendado para a multiplicação por organogênese direta consiste no uso do meio de cultura semissólido MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar-ágar, isento de regulador de crescimento.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, V. F. M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Área de Concentração em Silvicultura, Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, RS, 2006. 44 f. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/8655/Vanessa%20%20Fiad%201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- AMARANTE, C. V. T.; SANTOS, K. L. Goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1. 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000100042
- BATISTA, T. R. **Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012. 76 f. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/327/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Organog%C3%AAAnese%20e%20embriog%C3%AAAnese%20som%C3%A1tica%20de%20h%C3%ADbrido%20de%20Eucalyptus%20grandis%20x%20Eucalyptus%20urophylla.pdf>
- 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. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542010000600018
- BRONDANI, G. E. **Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*.** Tese (Doutorado) – Curso de Engenharia Florestal, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012. 184f.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; CAPRESTANO, C. A.; DUCROQUET, J. P.; GUERRA, M. P. Competência embriogenética em tecidos florais de *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 87-89, jul. 2007. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/120/118>
- CHALUPA, V. C. In vitro propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. **Journal of Forest Science**, Praga, v. 48, n. 12, p. 529-535, 2002. Disponível em: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/286476.pdf>
- CIOTTA, M. N.; ARIOLI, C. J.; PINTO, F. A. M. F.; SANTOS, K. dos; ARAUJO, L.; PASA, M. da S. (Orgs.). **A cultura da goiabeira-serrana**. Florianópolis: Epagri, 2018. 216 p.
- CORDEIRO, G. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 103, p. 337-344, 2014. Disponível em: <https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/leitura.asp?Article=03&Number=103&p=s>
- CURTI, A. R. **Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2011. 94 f.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação da Goiabeira-serrana (*Feijoa sellowiana* Berg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 21, n. 1, p. 60-64, 1999.

DUARTE, O.R.; FACHINELLO.J.C.; SANTOS FILHO. B.G. Multiplicação da goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. **Pesq. Agrop. Bras**, Brasília, v.27, n.3, p.513-516, 1992.

DUCROQUET, J.P.H.J., HICKEL, E.R. Birds as pollinators of feijoa (*Acca sellowiana* Berg). **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 452, p. 37-40, 1997.

DUCROQUET, J. P. H. J.; NUNES, E. C.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Novas cultivares brasileiras de goiabeira serrana: SCS 414- Mattos e SCS 415- Nonante. **Agropecuária Catarinense**. Florianópolis – SC, v. 21, n. 2, p. 77-80, 2008. Disponível em: http://intranetdoc.epagri.sc.gov.br/producao_tecnico_cientifica/DOC_33031.pdf

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C. Propagação da goiabeira serrana *Feijoa sellowiana* Berg, através da mergulhia de cepa. **Scientia Agricola**, Piracicaba (SP), v. 49, p. 37-39, 1992.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Springer, 2008. 501 p. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4020-5005-3.pdf>

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galoides*, a popular medicinal plant of South Brazil. **Plant Cell Research**, v. 64, n. 1, p. 1-4, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1010626200045.pdf>

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; MUNIZ, M. F. B.; SILVA, K. B. Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. **Revista Árvore**, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v41n5/0100-6762-rarv-41-05-e410509.pdf>

GOLZER, A.; DÉO, T. G.; LOPES, G. B.; DAMIANI, C. R. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Braz. Ap. Sci. Rev.**, Curitiba, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, 2019. Disponível em: <http://brjd.com.br/index.php/BASR/article/view/1342/1214>

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; FRITSCHÉ, Y. **Apostila de Biotecnologia vegetal. Apostila de Biotecnologia I**. 2016. 44p. Disponível em: <http://lfdgv.paginas.ufsc.br/files/2014/08/Apostila-Biotec-2016.1-Final.pdf>

GUERRA, M. P.; CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; CAPRESTANO, C. A. **Micropropagation Systems of Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret)**. Protocols for Micropropagation of Selected Economically – Important Horticultural Plants. p. 45-62. 2013.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 33(2):105-119, 1993. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF01983223.pdf>

HUSSAIN, T. M.; CHANDRASEKHAR, T.; GOPAL, G. R. High frequency shoot regeneration os *Sterculia urens* Roxb. An endangered tree species through cotyledonary node cultures. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1643-1649. 2007. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57736/46104>

JESUS, A. M. S.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M.; DUTRA, L. F. Micropropagação do cafeeiro com concentrações de BAP em meio de pré-cultivo e de BAP e TDZ em meio de subcultivo. **Revista Ceres**, v. 49, n. 283, p. 253-263, 2002.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, v. 30, p. 421-327, 1981.

MANKESSI, F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. In vitro rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees**, Berlin, v. 23, n. 5, p. 931-940, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00468-009-0335-y>

MELO, N. F. **Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal**. In: SEMINÁRIO CODA DE NUTRIÇÃO VEGETAL, 1., 2002, Petrolina. Anais [...]. Petrolina: CODA, 2002.

MOREL, G. M.; WETMORE, R.H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, New York, n. 38, p. 141-143, 1951.

MORETTO, S. P. **A domesticação e a disseminação da feijoa (*Acca sellowiana*) do século XIX ao século XXI**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, centro de Filosofia e Ciências Humanas, Programa de Pós-graduação em História. Florianópolis – SC. 2014. 432 p.

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

OLIVEIRA, R. N. Propagação *in vitro* e controle de hiperidricidade em candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016. 53 p. Disponível em: http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/bitstream/1/1095/1/rafaela_naiara_oliveira.pdf

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OLTRAMARI, A. C.; DAL VESCO, L. L.; PEDROTI, E. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Desenvolvimento do protocolo de micropropagação de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, v. 30, p. 61-68, 2000.

PAIM, A. F. **Contribuições para a micropropagação de *Eugenia involucrata* DC. E *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC) Mattos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2011. 79 f.

PORFIRIO, K. P.; TITON, M.; CASTRO, A. C. M.; PEREIRA, I. M.; KNEGT, R. A. P. Multiplicação *in vitro* de *Xylopiá aromática* em diferentes meios de cultura e concentrações de BAP. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 39, p. 1-7, 2019.

QUINSEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus: **EMBRAPA Amazônia Ocidental**, 2008. 44p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47132/1/Doc-61-A5.pdf>

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2017. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

SANT'ANA, C. R. O.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; SILVA, D. P. C.; SILVA, L. C. In vitro propagation of Campomanesia rufa: An endangered fruit species. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 372-380, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v42n4/1981-1829-cagro-42-04-372.pdf>

SALGADO, S. M. L.; CUNHA, R. L.; NIELLA, G. R.; TEIXEIRA, H.; PASQUAL, M. Efeito da utilização de TDZ e benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.25, n.2, p.274-280, 2001. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Sonia_Salgado3/publication/237733082_EFEITO_DA_UTILIZACAO_DE_TDZ_E_BENOMYL_NA_MICROPROPAGACAO_DO_CRISANTEM_O_Dendranthema_morifolium/links/5697847c08aea2d74375a07c.pdf

SOUZA, C.R.; COELHO, C. M. M.; GUIDOLIN, A. F.; ENGELSING, M. J.; BORDIN, L. C. Influência do ácido giberélico sobre a arquitetura de plantas de feijão no início de desenvolvimento. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.2, p.325-32, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/asagr/v32n2/a20v32n2.pdf>

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G. S.; MIYATA, L. Y. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'cherokee': Efeito de meios de cultura, cinetina e GA₃. **Ceres**, v. 36, p. 357-362, 2006.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, 59:870-874, 1981.

VUJOVIĆ, T.; RUŽIĆ, Dj.; CEROVIĆ, R. *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. **Hort. Sci. (Prague)**, v. 39, n. 3, p. 101-107, 2012.