

Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae)

In vitro establishment of *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae)

Vanessa Ishibashi¹, Karina Vanelli Koguta^{1*}, Paulo César Flôres Junior¹, Antonio Rioyei Higa¹

RESUMO

Acácia-negra vem sendo utilizada em plantios comerciais no Estado do Rio Grande do Sul e apresenta características de interesse comercial tanto para sua madeira como para casca e tem grande representatividade no setor florestal brasileiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de genótipos, substâncias com efeito fungicida e bactericida adicionadas ao meio de cultura e a influência da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na micropropagação de *A. mearnsii*. O material vegetal utilizado foram segmentos nodais provenientes de cepas de dois clones com 15 meses de idade que foram submetidos à desinfestação superficial antes da instalação dos experimentos, onde: I) Estabelecimento *in vitro*: explantes inoculados em meio MS ¼ contendo quatro tratamentos, 2 g L⁻¹ de Cercobin®, 2 ml L⁻¹ de Kasumin® (Casugamicina), 2g L⁻¹ de Cercobin® + 2 ml L⁻¹ de Kasumin® e o testemunha sem adição de fungicida/bactericida ao meio de cultura; II) Indução de brotação: explantes inoculados em meio MS ¼ contendo 2 g L⁻¹ de Cercobin®, 2 ml L⁻¹ de Kasumin® e quatro tratamentos constituídos 0,5 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 1,5 mg L⁻¹ de BAP e o testemunha sem adição da citocinina. Ambos os experimentos foram instalados em delineamentos em blocos casualizados. O melhor tratamento para o controle de contaminação foi utilizando 2 g L⁻¹ Cercobin® + 2 ml L⁻¹ Kasumin®. A porcentagem de explantes com brotações responde de forma crescente conforme houve aumento na concentração de BAP, não ocorrendo redução até a concentração de 1,5 mg L⁻¹.

Termos para indexação: Desinfestação; fungicida; BAP.

ABSTRACT

Black wattle has been used in commercial plantations in the state of Rio Grande do Sul and it presents commercial interest features, for both its wood and bark, having strong participation in the Brazilian forest sector. The goal of this study was to evaluate the effect of genotypes, the addition of bactericidal and fungicidal substances to the growth medium and the influence of the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) in *A. mearnsii* micropropagation. The plant material used was nodal segments collected from two clones at the age 15 months, which underwent superficial disinfection before the experiments installation: I) *in vitro* establishment: explants were inoculated in MS ¼ containing four treatments: 2 g L⁻¹ Cercobin®, 2 ml L⁻¹ Kasumin® (Kasugamycin), 2g L⁻¹ Cercobin® + 2 ml L⁻¹ Kasumin® and control without fungicidal/bactericidal substance in the culture medium; II) Shoot induction: explants inoculated in MS ¼ containing 2 g L⁻¹ Cercobin®, 2 ml L⁻¹ Kasumin® and four treatments: 0.5 mg L⁻¹, 1.0 mg L⁻¹, 1.5 mg L⁻¹ BAP and the control without addition of cytokinin. Both experiments were conducted in randomized complete blocks design. The best treatment to avoid contamination was using 2 g L⁻¹ Cercobin® + 2 ml L⁻¹ Kasumin®. The percentage of explants with shoots responds positively to the increase in the concentration of BAP, with no signs of reduction in this response up to the maximum concentration tested of 1.5 mg L⁻¹.

Index terms: Disinfection; fungicidal; BAP.

INTRODUÇÃO

Acacia mearnsii, popularmente conhecida como acácia-negra, pertence à família Fabaceae e tem sua origem do Sudeste da Austrália. A espécie foi introduzida no Brasil em 1918 e os primeiros plantios comerciais foram estabelecidos a partir de 1928 (Schneider; Tonini, 2003). Atualmente, estima-se uma área plantada de 103.000 ha com esse gênero (Associação Gaúcha de Empresas Florestais - AGEFLOR, 2015), sendo a maior parte com acácia-negra. A espécie possui representativa importância socioeconômica no estado do Rio Grande do Sul, onde se concentram as plantações da espécie, sendo utilizada principalmente com

finalidade: madeira (energia, carvão, cavaco para celulose, painéis de madeira) e extração de tanino (curtumes, adesivos, petrolífero, borrachas, floclulantes) (Associação Brasileira de Produtores de Florestas - ABRAF, 2013).

O uso de florestas clonais é uma opção com grande potencial para aumento de produtividade, além de proporcionar uma homogeneidade nos plantios e racionalização das operações silviculturais e de colheita. Já os plantios comerciais originados de mudas seminais resultam em florestas com alta variabilidade genética entre os indivíduos do povoamento e, consequentemente, variabilidade na produtividade (Disarz; Martins-Corder, 2009).

Recebido em 5 de Junho de 2017 e aprovado em 16 de Agosto de 2017

¹ Universidade Federal do Paraná/UFPR, Departamento de Ciências Florestais, Curitiba, PR, Brasil

*Autor para correspondência: karina.vanelli@gmail.com

Acácia-negra apresenta dificuldades de enraizamento via macropropagação de genótipos adultos selecionados. Assim, a micropropagação é uma técnica promissora para acácia-negra, pois a alta taxa de multiplicação de plantas micropropagadas acelera os programas de propagação clonal, possibilita a clonagem de indivíduos de alto valor e de difícil enraizamento (Brondani et al., 2009) e fornece um material livre de patógenos (Sartoretto; Saldanha; Martins-Corder, 2008).

Os principais limitantes para o sucesso dessa técnica são o genótipo, a desinfestação superficial e a quebra de recalcitrância dos explantes (Borges et al., 2012). Variações nos genótipos das plantas matrizes estão diretamente relacionados com a capacidade de regeneração, sobrevivência dos explantes e a exigência de meios de cultura e condições ambientais específicas para seu estabelecimento (George; Hall; de Klerk, 2008). A condição das plantas matrizes também influencia na descontaminação dos explantes, principalmente quanto à contaminação endógena (Grattapaglia; Machado, 1998).

Resultados positivos para o estabelecimento *in vitro* da espécie foram obtidos utilizando solução contendo o fungicida Benlate® e/ou cloreto de mercúrio (Beck; Dunlop; Van Staden, 1998; Beck; Dunlop; Van Staden, 2000; Correia; Graça, 1995). Porém, o uso de Benlate® não é mais permitido no Brasil e o cloreto de mercúrio resulta em grande porcentagem de necrose dos explantes devido a sua alta toxicidade (Grattapaglia; Machado, 1998). Devido a isso, atualmente grande parte dos trabalhos de micropropagação com acácia-negra, utilizam material oriundo de germinação *in vitro* (Borges Júnior; Soborsa; Martins-Corder, 2004; Disarz; Martins-Corder, 2009; Huang; Al-Khayri; Gbur, 1994) e não de outras fontes de explantes, como segmentos nodais ou meristemas a partir de material genético cultivado em viveiro ou de indivíduos adultos em plantios comerciais.

Para a fase de multiplicação *in vitro*, os reguladores de crescimento mais utilizados são as citocininas, sendo a 6-Benzilaminopurina (BAP) mais utilizada. Estas possuem síntese em ápices radiculares e caulinares e são transportadas pelo xilema e floema. Sua presença

induz a divisão celular, formação de gemas e estímulo de brotações laterais (Taiz; Zeiger, 2013). Borges Junior, Soborsa e Martins-Corder (2004) testaram diferentes concentrações de citocininas em segmentos nodais oriundos de sementes germinadas *in vitro* de *A. mearnsii* em meio B5, obtendo melhores resultados na utilização de BAP.

Não houve diferença estatística entre os clones no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua* L. (Brondani et al., 2010). Já na micropropagação de 29 clones de híbridos de *Eucalyptus* sp. essa diferença foi evidenciada (Borges et al., 2012).

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de genótipos, substâncias com efeito fungicida e bactericida adicionadas ao meio de cultura e a influência da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na micropropagação de *A. mearnsii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos distintos, o primeiro testando o estabelecimento de explantes de dois clones comerciais de acácia-negra com o uso de fungicida e bactericida no meio de cultura e o segundo a indução de brotações com o uso de BAP, empregando no meio de cultura o melhor resultado do primeiro teste. Para ambos, o material vegetal foi procedente do mesmo local e aplicada às mesmas condições de ensaio e técnica para preparo dos explantes.

Material vegetal, local e condições de ensaio

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal do Departamento de Ciências Florestais da UFPR. O material vegetal foi oriundo de minicepas plantadas no minijardim clonal instalado em viveiro localizado no *campus* da UFPR, composto por dois clones de matrizes selecionadas com 15 meses de idade. A fertirrigação do minijardim foi realizada semanalmente com solução nutritiva preparada com produtos comerciais Kristalon® (NPK 18 18 18) (Yara, Brasil) como fonte de macronutrientes e YaraVita Rexolin BRA® (Yara, Brasil) como fonte de micronutrientes e 48 h antes da coleta do material, receberam tratamento com fungicida Cercobin® 700 WP (Tiofanato-Metilico) (Iharabras, Brasil) na concentração de 2g L⁻¹.

Preparo dos explantes para instalação dos experimentos

Para todos os experimentos foram utilizados como explantes segmentos nodais de tamanho aproximado de 2 cm contendo uma gema axilar oriundos de cepas do minijardim clonal. Após a coleta, os explantes foram imersos em solução de 2 g L⁻¹ de Cercobin® por 20 minutos e lavados em água corrente por 10 minutos. Em câmara de fluxo, foram imersos em uma solução contendo etanol 70% e hipoclorito de sódio 1,5% de cloro ativo por 10 minutos. Efetuou-se a tríplice lavagem em água destilada estéril para que fossem inoculados nos tubos de ensaio.

Estabelecimento *in vitro* de acácia-negra

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) com sais reduzidos a ¼, vitaminas e compostos orgânicos do mesmo meio, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Brasil), 5 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) e quatro tratamentos constituídos por 2 g L⁻¹ de Cercobin®, 2 ml L⁻¹ de Kasumin® (Casugamicina) (Arysta Lifescience, Brasil), 2g L⁻¹ de Cercobin® + 2 ml L⁻¹ de Kasumin® e o testemunha sem adição de fungicida/bactericida ao meio de cultura. O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 ± 2 e esterilizado em autoclave a 121 °C ± 1 °C por 20 minutos. As culturas permaneceram em sala de crescimento com temperatura controlada (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 2800 lux, proporcionada por lâmpadas fluorescente, tipo “luz do dia”, de 30 W.

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados composto por seis blocos e oito explantes por parcela em esquema fatorial 2x4, sendo dois clones e quatro tratamentos de substâncias desinfestantes adicionadas ao meio de cultura. As avaliações ocorreram aos quatorze dias quando foi verificada a presença de contaminantes (fungos e bactérias). Para a análise estatística foi realizada análise de variância – ANOVA e teste de Tukey para comparação das médias utilizando o software estatístico SPSS®.

Uso de 6-Benzilaminopurina (BAP) na indução de brotações de explantes de acácia-negra

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura MS conforme descrito

acima e acrescido de 2 g L⁻¹ de Cercobin®, 2 ml L⁻¹ de Kasumin® e quatro tratamentos constituídos 0,5 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 1,5 mg L⁻¹ de BAP e o testemunha sem adição da citocinina. O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8 ± 2 e esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos. As culturas permaneceram em sala de crescimento com temperatura controlada (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 2800 lux, proporcionada por lâmpadas fluorescente, tipo “luz do dia”, de 30 W.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com cinco blocos e oito explantes por parcela. As avaliações ocorreram aos sete, quatorze e vinte um dias, quando foi calculada a porcentagem de explantes com brotações. Para a análise estatística foi realizada análise de variância – ANOVA e teste de Tukey para comparação das médias e analisados por regressão polinomial utilizando o software estatístico SPSS®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento *in vitro* de acácia-negra

Aos 14 dias, os explantes estavam em sua maioria contaminados por fungos e bactérias concomitantes no mesmo tubo de ensaio, por isso as análises foram efetuadas considerando a contaminação total. Houve diferença estatística para clones, tratamentos, mas não para a interação destes. A melhor eficiência para o controle de contaminação foi utilizando 2 g L⁻¹ Cercobin® + 2 ml L⁻¹ Kasumin® com 62,5% e 68,8% de contaminação por patógenos para o clone A e B, respectivamente (Tabela 1).

Lafetá et al. (2015), no cultivo *in vitro* de eucalipto, testaram a imersão dos explantes em diferentes concentrações de Cercobin® (0,5, 1, 2 e 4 g L⁻¹) antes da inoculação e obteve alta contaminação por fungos, superiores aos obtidos nesse trabalho (Tabela 1), o que sugere que a adição do fungicida ao meio de cultura é mais eficiente no controle de contaminação do que somente a imersão em solução fungicida.

O tratamento testemunha e o tratamento contendo 2 ml L⁻¹ de Kasumin® adicionados ao meio de cultura não apresentaram diferença estatística e resultaram em alta contaminação dos explantes por patógenos (Tabela 1). Esse fato pode ser consequência de concentração insuficiente

do bactericida adicionado ao meio de cultura ou que o princípio ativo do Kasumin® seja termossensível e o processo de autoclavagem reduziu o efeito bactericida. Palú et al. (2011) testou a adição de antibióticos (cloranfenicol, ampicilina sódica, ácido nalidíxico, cefalotina sódica, tetraciclina e norfloxacin) ao meio de cultura após o processo de autoclavagem e obteve bons resultados no controle de contaminação bacteriana. Pelliza et al. (2013), utilizando combinação de Cercobin® 700 WP (0,7 g L⁻¹) e Kasumin® (2 ml L⁻¹) em diferentes cultivares de mirtilheiro, observou que não houve interação entre os fatores cultivar e agentes desinfestantes para as variáveis: contaminação fúngica e contaminação bacteriana estabelecidos aos 28 dias de cultivo *in vitro*, só houve efeito significativo para variáveis de explantes oxidados.

Tabela 1 – Contaminação total (%) no estabelecimento *in vitro* de *A. mearnsii*, após 14 dias de cultura, de clones com 15 meses de idade.

Variável	Contaminação total	
	Clone	
	A	B
Tratamento		
2 g L ⁻¹ Cercobin® + 2 ml L ⁻¹ Kasumin®	62,5 ^a	68,8 ^a
2 g L ⁻¹ Cercobin®	79,2 ^{ab}	97,9 ^b
2 ml L ⁻¹ Kasumin®	100 ^b	100 ^b
Testemunha	100 ^b	100 ^b
Média	85,4 ^A	91,7 ^B
CV (%)	1,63	

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas, minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p≤0,05).

O clone A foi superior ao B, com 14,6% e 8,3% de explantes livres de contaminação respectivamente (Tabela 1). As minicepas foram manejadas nas mesmas condições no minijardim clonal e o processo de desinfestação superficial (preparo dos explantes) foi o mesmo para os dois clones e, no entanto, foi detectada diferença significativa entre os clones para a contaminação dos explantes. O mesmo não ocorreu no trabalho de Brondani et al. (2010) em que nas mesmas condições de ensaio não houve diferença significativa entre os clones de *Liquidambar styraciflua* L. Essa diferença sugere que o clone B possui

uma maior quantidade de patógenos endógenos e é menos susceptível aos tratamentos desinfestantes que foram aplicados. Com isso, protocolos diferentes de estabelecimento *in vitro* devem ser estudados para cada material genético.

Efeito do 6-Benzilaminopurina (BAP)

Os explantes introduzidos do minijardim clonal que desenvolveram brotações continham apenas uma brotação aos 21 dias, por esse motivo essa variável foi tratada como categórica (0 – ausência de brotação e 1 – presença de brotação) e calculada a porcentagem de explantes com brotações por tratamento. A responsividade de segmentos nodais coletados a partir de árvores maduras é um grande entrave na propagação *in vitro* e por isso poucos são os trabalhos que reportam a utilização de explantes oriundos de material adulto (Oliveira et al., 2013). Atualmente, grande parte dos trabalhos de multiplicação *in vitro* da espécie acácia-negra são oriundos de germinação *in vitro* das sementes e assim a necessidade de testar a concentração de reguladores vegetais mais adequados para as condições e idade fisiológica do material genético utilizado.

Os dados do modelo ajustado pela função quadrática indicaram um alto grau de relação, com um coeficiente de determinação (R²) de 0,98. A curva resposta (Figura 1), apresenta-se ascendente conforme há aumento nas concentrações de BAP. Até a concentração de 1,5 mg L⁻¹ de BAP não houve redução na porcentagem das brotações nem hiperhidricidade dos explantes.

No entanto, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos para a porcentagem de explantes com brotações aos 21 dias. O fato do tratamento testemunha, sem adição de BAP, não diferir estatisticamente dos demais pode ser explicado porque a maior parte das citocininas é produzida nas raízes e transportadas via xilema, sendo que a seiva bruta é rica em citocininas e capaz de promover crescimento *in vitro* (George; Hall; de Klerk, 2008), porém não sustentam o aumento das brotações no período de avaliação (Figura 2). Na micropropagação de *Mimosa caesalpinifolia*, Bezerra et al. (2014), também constataram a existência de concentrações endógenas de citocininas para induzir o brotamento de segmentos cotiledonares.

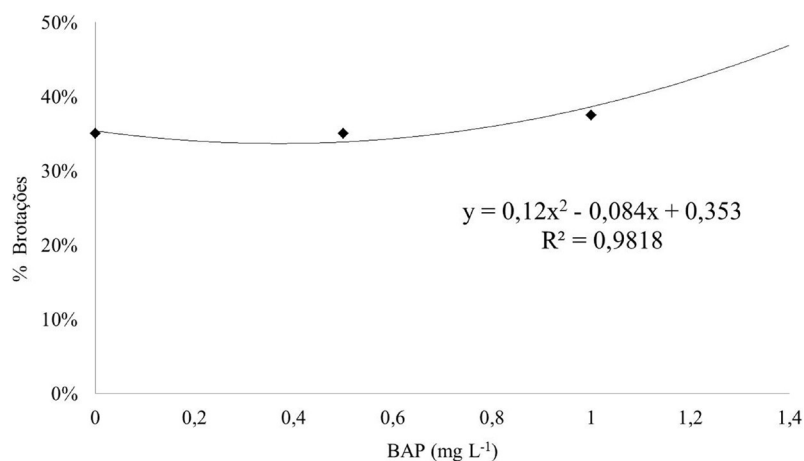


Figura 1 – Efeito das concentrações de BAP (mg L⁻¹) na porcentagem de explantes com brotações de *A. mearnsii* aos 21 dias.

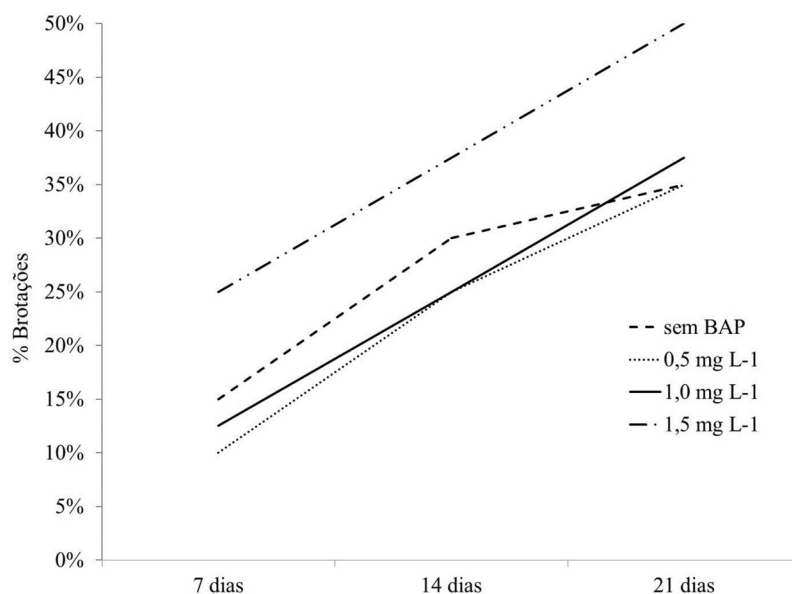


Figura 2 – Porcentagem dos explantes de *A. mearnsii* com brotações aos 7, 14 e 21 dias.

A utilização de BAP a 2 mg L⁻¹ promoveu a maior taxa de multiplicação *in vitro* de *A. mearnsii* com 3,1 gemas/explante no trabalho de Borges Junior, Soborsa e Martins-Corder (2004) utilizando meio de cultura B5. Para a mesma espécie, Correia e Graça (1995) obtiveram maior número de brotações por explante (3,51 gemas/explante) utilizando 3,0 mg L⁻¹ BA (6-benziladenosina) suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de AIB (ácido indol-butírico) em meio de cultura MS ½. Huang, Al-Khayri e Gbur (1994) também testaram a combinação de citocininas e auxinas na multiplicação *in vitro* de *A. mearnsii* e encontraram melhores resultados para 2 mg L⁻¹ de BAP combinado com 0,01 mg L⁻¹ de AIB.

A concentração ótima de BAP para multiplicação *in vitro* varia muito entre espécies. Para *Eucalyptus dunnii* a concentração 0,5 mg L⁻¹ de BAP influenciou positivamente a formação de gemas nos explantes nos genótipos testados de acordo com a análise de regressão realizada, sendo considerada a concentração que proporciona a máxima eficácia técnica (Navroski et al., 2014) e em *Mimosa caesalpinifolia*, 4 mg L⁻¹ de BAP foi a concentração que apresentou melhores resultados tanto para o número de explantes responsivos quanto para número de brotações por explante (3,3 brotações), mostrando decréscimo em concentrações maiores (Bezerra et al., 2014).

CONCLUSÕES

A adição de substâncias fungicidas e bactericidas ao meio de cultura auxilia no controle de contaminação por patógenos na micropropagação de acácia-negra. A porcentagem de explantes com brotações responde de forma crescente conforme aumento na concentração de BAP, não ocorrendo redução até a concentração de 1,5 mg L⁻¹.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à empresa Tanac S/A pelo apoio financeiro a pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2013**. Ano base 2012. Brasília: ABRAF, 2013. 148p.
- ASSOCIAÇÃO GAÚCHA DE EMPRESAS FLORESTAIS - AGEFLOR. **A indústria de base florestal no Rio Grande do Sul**. Ano base 2014. Porto Alegre, RS, 2015. 40p.
- BECK, S. L.; DUNLOP, R.; VAN STADEN, J. Meristem culture of *Acacia mearnsii*. **Plant Growth Regulation**, 32(1):49-58, 2000.
- BECK, S.; DUNLOP, R.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Acacia mearnsii* from *ex vitro* material. **Plant Growth Regulation**, 26:143-148, 1998.
- BEZERRA, R. M. de F. et al. Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, 38(5):771-778, 2014.
- BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R. de C.; MARTINS-CORDER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, 28(4):493-498, 2004.
- BORGES, S. R. et al. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, 22(3):605-616, 2012.
- BRONDANI, G. E. et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden e Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, 33(1):11-19, 2009.
- BRONDANI, G. E. et al. Desinfestação e meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. **Floresta**, 40(3):541-554, 2010.
- CORREIA, D.; GRAÇA, M. E. C. *In vitro* propagation of black wattle (*Acacia mearnsii* de Wild). **IPEF**, 48/49:117-125, 1995.
- DISARZ, R.; MARTINS-CORDER, M. P. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* de Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, 33(4):599-606, 2009.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. H.; DE KLERK, G. J. (eds.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. v.1, 501p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.
- HUANG, F. H.; AL-KHAYRI, J. M.; GBUR, E. E. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 30(1):70-74, 1994.
- LAFETÁ, B. O. et al. Assepsia de explantes caulinares de eucalipto com fungicida sistêmico. **Revista Científica Vozes dos Vales**, 8:2-14, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3):473-479, 1962.
- NAVROSKI, M. C. et al. *In vitro* establishment and multiplication of genotypes of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, 20(1):139-146, 2014.
- PELLIZA, T. R. et al. Estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro: Cultivares Bluecrop, Duke e Misty. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, 9(1-2):17-23, 2013.
- PALÚ, E. G. et al. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33(2):587-592, 2011.
- SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P. Transformação genética: Estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência rural**, 38(3):861-871, 2008.
- SCHNEIDER, P. R.; TONINI, H. Utilização de variáveis dummy em equações de volume para *Acacia mearnsii* de Wild. **Ciência Florestal**, 13(2):121-129, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 719p.