

ASPECTOS DO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae) PARA A PRODUÇÃO DE MUDAS

Marta Ribeiro Barbosa¹
Lindomar Maria Souza¹
Robson Antonio de Souza¹
Laureen Michelle Houllou¹

RESUMO

Handroanthus chrysotrichus é uma espécie arbórea utilizada na arborização e que apresenta dificuldades na reprodução sexuada. O objetivo do trabalho foi avaliar aspectos do estabelecimento *in vitro* de *H. Chrysotrichus* em meio alternativo. O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica do Centro de Tecnologias Nordeste. Sementes *Handroanthus chrysotrichus* foram desinfestadas e inoculadas em frascos contendo os diferentes tipos de meio de cultivo: sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose e inositol; fertilizante comercial Kristalon[®] laranja e meio sem sais (apenas com água destilada). Em seguida os meios foram gelificados com 5,5 g.L⁻¹ de ágar. Os meios de cultura com ausência de sais ou com o fertilizante Kristalon[®] laranja foram mais efetivos no controle da contaminação *in vitro* de *H. Chrysotrichus*. Os meios supracitados influenciaram positivamente o percentual de germinação e de emergência, provavelmente pela redução no potencial osmótico do meio de cultura. As sementes inoculadas no meio contendo Kristalon[®] laranja apresentaram maior velocidade de germinação e de emergência, além originar plântulas com maior altura. As plântulas cultivadas nos meios com sais MS e Kristalon[®] apresentaram maior produção de folhas. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que o meio alternativo contendo o fertilizante comercial Kristalon[®] proporcionou bons resultados, podendo ser indicado para a simplificação do meio de cultivo na fase de estabelecimento *in vitro* de *H. chrysotrichus*.

Palavras-chave: Ipê-amarelo, germinação, cultivo *in vitro*, reflorestamento, poliembrionia.

INTRODUÇÃO

Dentre as espécies que apresentam interesses diversificados e utilização em programas de reflorestamento, encontram-se as do gênero *Handroanthus*, cuja principal forma de propagação é realizada por sementes (FANTINEL et al. 2013). A espécie *Handroanthus chrysotrichus*, conhecida popularmente como ipê-amarelo ou ipê peludo, é uma espécie arbórea pertencente à família Bignoniaceae (LUCINI & PUTZKE, 2015) e apresenta reprodução com baixa produtividade, provavelmente em função da grande queda de flores da planta, não apresentando autopolinização, mas sim autoincompatibilidade. Essa espécie é

¹Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), martaribeiro21@hotmail.com; lindomarsouza.ufrpe@gmail.com; robson.souza@cetene.gov.br; laureen.houllou@cetene.gov.br.

comumente utilizada na arborização urbana e em projetos paisagísticos, principalmente em função da beleza de suas flores de coloração amarela e seu porte mediano (PEREIRA et al. 2015; ACRA et al. 2012).

A poliembrião é o fenômeno caracterizado pela ocorrência de mais de um embrião no interior da semente, podendo ser zigóticos ou apomíticos (MARCOLIN, et al. 2013). A ocorrência de poliembrião nessa espécie é bem documentada na literatura (LEITE et al. 2017; SAMPAIO et al. 2013; MENDES-RODRIGUES et al. 2012; BITTENCOURT JR & MORAES, 2010). Estudo realizado por Sampaio et al. (2013) revelam que a germinação de sementes dessa espécie pode ser comprometida com o aumento da temperatura, reforçando a importância de estudos voltados para a propagação desta espécie frente aos eventos de aumento da temperatura global.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais como a micropropagação são consideradas alternativas econômicas adequadas para espécies florestais nativas pela possibilidade de propagação de árvores selecionadas, além da obtenção de plantas livres de fitopatógenos (WATT, 2012).

Dentre as diferentes fases da propagação *in vitro*, o “estabelecimento *in vitro*” representa uma das mais críticas para grande parte das espécies lenhosas, pela ocorrência de altos índices de contaminação dos propágulos por microorganismos. Esse fato acontece com frequência principalmente quando as matrizes utilizadas para coleta são plantas adultas localizadas no campo (OLIVEIRA, et al. 2013).

A importância de estudos voltados para o desenvolvimento de métodos de propagação para esta espécie é ressaltada por Rabaiolli et al. (2017). A porcentagem de germinação da mesma pode chegar em torno de 65,0 % em sementes não armazenadas e esse percentual é reduzido a cada ano em sementes armazenadas, podendo ser nula ao terceiro ano de armazenamento (MARCOLI et al. 2013).

Diante da necessidade de pesquisas que retratem a propagação vegetativa por estaquia com de *H. Chrysotrichus*, Pereira et al. (2015) reforçam que a propagação *in vitro* também pode constituir uma alternativa adequada em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas, pois eleva a taxa de multiplicação.

Na micropropagação, o sucesso de um protocolo depende de todas as fases, iniciando pela fase de estabelecimento *in vitro*, multiplicação, alongamento (pode não ser necessária), enraizamento e aclimatização (PEREIRA et al. 2015).

A utilização de meios alternativos, com o intuito de simplificar as técnicas de cultura de tecidos vegetais, têm sido praticada com sucesso no cultivo *in vitro* de espécies de

interesse como as orquídeas *Laeliocattleya schilleriana* (CUNHA et al. 2011) e *Cattleya amethystoglossa* (CORDEIRO et al. 2011). Dentre os meios de cultivo *in vitro* convencionais mais utilizados estão os MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (Wood Plant Medium) (LLOYD & McCOWN, 1981). Pereira et al. (2018) avaliando diferentes tipos e concentrações de meio no desenvolvimento *in vitro* de *H. chrysotrichus*, verificaram que o meio com os sais WPM completo ou diluído (1/2; 1/4) são eficazes no estabelecimento *in vitro* de espécie. Em *Handroanthus impetiginosus* Bassegio et al. (2017) concluíram que os meios de cultura MS e WPM proporcionaram resultados semelhantes para germinação de sementes.

Em virtude da importância dessa espécie e dos fatores que podem afetar a reprodução, fazem-se necessários novos estudos que viabilizem a produção de mudas e manutenção da variabilidade genética de *H. Chrysotrichus*. Nesse sentido, estudos a cerca de meios alternativos, que possam otimizar o cultivo *in vitro*, são de grande importância para a melhor aplicação das técnicas de cultura de tecidos vegetais na espécie. Nesse contexto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar os aspectos do estabelecimento *in vitro* de *H. Chrysotrichus* em meio alternativo.

METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica (LAPAB) do Centro de Tecnologias Nordeste (CETENE).

Sementes *Handroanthus chrysotrichus* foram utilizadas como explantes para o início do cultivo *in vitro* da espécie e coletadas na área do parque tecnológico do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), localizado em Recife (PE) à latitude 8° 04' 03" Sul e longitude 34° 55' 00" Oeste.

As sementes foram desinfestadas em álcool (70%) por um minuto e em seguida em hipoclorito de sódio (2,5%) por 10 minutos. Após essa etapa, as sementes foram inoculadas em frascos contendo 30 mL cada tipo de meio de cultivo: sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) como meio convencional; 0,84 g.L⁻¹ do fertilizante comercial Kristalon® laranja (NPK 6-12-36) como meio alternativo e meio sem sais (apenas com água destilada) como testemunha. Apenas o meio MS foi acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 0,1 g.L⁻¹ de inositol. O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8 ± 0,2 e em seguida gelificados com 5,5 g.L⁻¹ de ágar.

Posteriormente, os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, com lâmpadas LED branca ($42\text{ }\mu\text{mol m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). O experimento foi mantido sob essas condições por 21 dias.

Foram realizadas avaliações da contaminação, percentuais de germinação (G %) e de emergência (E %), índice da velocidade de germinação (IVG), índice de velocidade de emergência (IVE), altura da planta, número de folhas e de sementes poliembriônicas.

Os índices de velocidade de germinação (IVG) e de emergência foram calculados de acordo com Maguire (1962). A germinação foi considerada a protrusão da raiz primária e para a emergência foram consideradas as plântulas contendo as folhas cotiledonares abertas, em que as contagens foram realizadas de dois em dois dias até o 21º dia. A altura da planta foi obtida pela medição direta com régua graduada e a contaminação, a germinação, o número de folhas e de sementes poliembriônicas, foram obtidas por contagem direta no 21º dia após a semeadura.

As plantas obtidas da introdução *in vitro* foram aclimatizadas em estufa com 50 % de sombrite e sistema de microaspersão. Os recipientes utilizados foram sacos de polietileno com capacidade para aproximadamente 0,5 L, contendo o substrato comercial Basaplant®.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições e três tratamentos (meios contendo os sais do MS, Kristalon® e apenas água sem sais), onde cada unidade experimental constou de um frasco contendo o meio e cinco sementes. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5,0 % de probabilidade utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio MS promoveu maior percentual de contaminação (68,7 %) no estabelecimento *in vitro* de *H. chrysotrichus* seguido do meio sem sais (12,5 %) e com Kristalon® (5,0 %), os quais não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 1A).

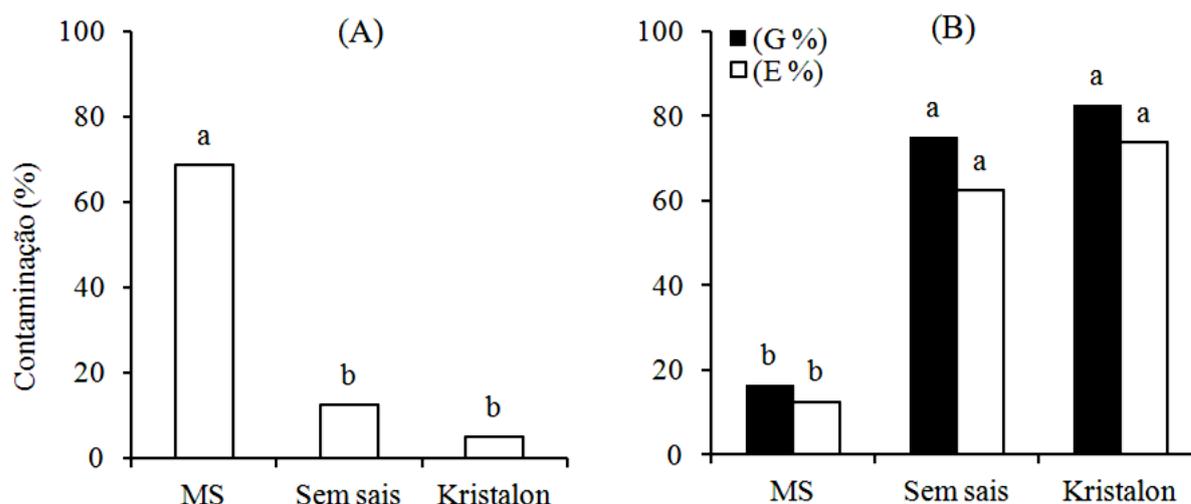


Figura 1. (A) - Percentual de contaminação (CV% = 21,4); (B) – Percentuais de germinação (G %) e de emergência (E %) (CV % = 10,2 e 12,6 respectivamente) em sementes de *Handroanthus chrysotrichus* inoculadas *in vitro* em diferentes meios de cultivo. Barras seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Um dos principais fatores que limitam o estabelecimento *in vitro* de plantas é o alto percentual de contaminação por microorganismos (OLIVEIRA et al. 2013). A contaminação no meio de cultivo é estimulada pela quantidade de sais, assim como pela adição de açúcar ao meio. Batista et al. (2017) observaram que o meio MS proporcionou maiores contaminações tanto em explante foliar como em embriões, quando comparado com o meio B&G.

Maiores percentuais de germinação (G %) foram observados quando os meios continham sais do fertilizante Kristalon® ou não continham sais (82,5 e 75,0 % respectivamente) em comparação com o meio MS (16,2 %) (Figura 1B).

O meio MS é considerado rico em sais, o que pode gerar maior efeito osmótico (QUISEN & ANGELO, 2008). Meios que apresentam maior potencial osmótico tendem a dificultar a germinação de sementes, uma vez que a disponibilidade de água encontra-se reduzida nesses meios (LEMES et al. 2016). Fabris et al. (2016), observaram menor percentual de germinação *Apuleia leiocarpa*, quando foram cultivadas em meio MS em comparação ao meio WPM, o qual é composto por menor concentração de sais. Nesta pesquisa, os autores atrelaram o maior percentual de germinação à menor concentração de sais no meio. Na germinação *in vitro* de paineira rosa, Prudente et al. (2015), obtiveram maior percentual de germinação em meio com redução da sacarose.

Resultado semelhante ao da germinação foi obtido na avaliação de percentual de emergência (E %) no presente experimento, onde foram observados maiores percentuais

médios nos tratamentos com meio contendo Kristalon[®] ou sem sais (73,7 e 62,5 % respectivamente), enquanto no meio MS o resultado obtido foi o menor (12,5 %) (Figura 1B). A emergência das plântulas é considerada um dos principais indicativos do vigor das sementes. Contudo, o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* são influenciados pelos componentes do meio de cultivo, bem como pelas concentrações de sacarose, que provocam efeito osmótico afetando negativamente o crescimento, por reduzir a disponibilidade de água para a planta (LEMES et al. 2016).

As sementes que apresentaram maior IVG foram as inoculadas no meio contendo Kristalon[®] (10,5) seguidas das semeadas em meio sem adição de sais (8,0) (Figura 2A).

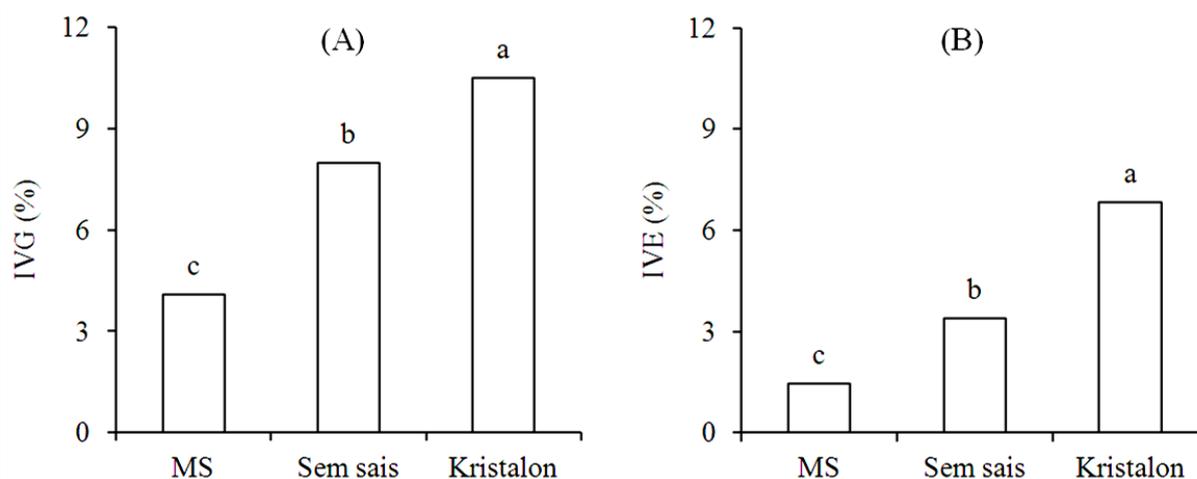


Figura 2. (A) - Índice de velocidade de germinação (IVG) (CV % = 18,7) e (B) - Índice de velocidade de emergência (IVE) (CV % = 27,7) de sementes de *Handroanthus chrysotrichus* inoculadas *in vitro* em diferentes meios de cultivo. Barras seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Segundo Oliveira et al. (2009), quanto maior o IVG, maior será a velocidade de germinação das sementes o que indica um maior vigor da semente. Na presente pesquisa as sementes expressaram maior potencial para melhor vigor quando semeadas em meio contendo os sais do fertilizante Kristalon[®]. O menor IVG apresentado nas sementes do meio MS pode ter sido efeito da maior contaminação ocorrida no meio, assim como o efeito do potencial osmótico, já que esse meio apresenta maior concentração de sais. Menor velocidade de emergência foi encontrada por Winhelmann et al. (2019), durante a germinação *in vitro* de *Angelonia integerrima* em meio com maior concentração de sais MS.

Comportamento semelhante ao do IVG foi observado para o IVE, no qual as sementes do meio contendo Kristalon[®] proporcionaram maior velocidade de emergência, seguida do meio sem sais e com menor velocidade para as sementes do meio MS (Figura 2B).

Os tratamentos contendo o fertilizante Kristalon[®] e os sais do meio MS proporcionaram maior número médio de folhas (2,0 folhas/planta), enquanto no meio sem sais esse número foi inferior (1,0 folha/planta) (Figura 3A).

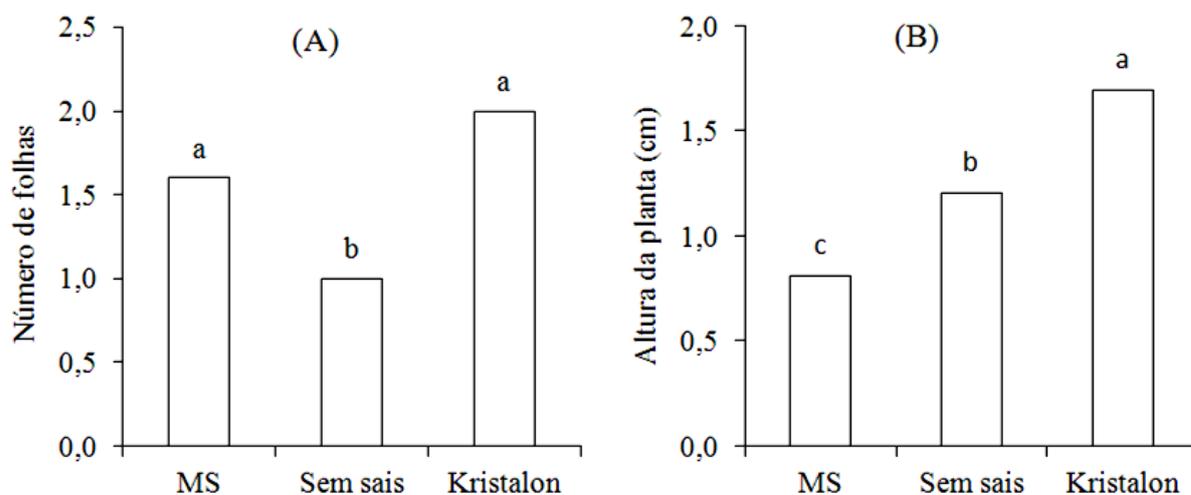


Figura 3. (A) - Número de folhas (CV % = 20,6); (B) - Altura da planta (CV % = 13,7) e (C) - Número de plantas poliembriônicas de *Handroanthus chrysotrichus* cultivadas *in vitro* em diferentes meios. Barras seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Tanto os sais dos meios de cultivo quanto a sacarose estimulam o crescimento de plantas, por essa razão os meios contendo sais e/ou sacarose (MS e Kristalon[®]) foram mais efetivos na emissão de folhas. Golle et al. (2012) avaliando a influência de diferentes meios nutritivos no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*, verificaram que o meio MS com metade da concentração dos sais favoreceu a emissão de folhas em explantes da região apical, entretanto não diferiu em explantes da região mediana. As respostas morfogênicas das plantas *in vitro* dependem, em última instância, da interação com os componentes do meio de nutritivo (Grattapaglia e Machado 1988), bem como da espécie e do órgão utilizado no cultivo.

As plântulas cultivadas em meio com Kristalon[®] alcançaram maior altura média (1,7 cm), seguidas das cultivadas em meio sem sais (1,2 cm). Menor valor médio foi obtido pelas

plântulas cultivadas em meio MS (0,8 cm) (Figura 3B), demonstrando que apesar da variável altura ter sido estimulada pela presença dos nutrientes minerais, a sacarose presente no meio MS pode ter causado efeito osmótico, bem como estimulado a contaminação por microorganismos, os quais competem pelos nutrientes do meio. Lemes et al. (2016) afirmam que o aumento da sacarose no meio de cultivo propicia o aumento do potencial osmótico, o que interfere no comprimento da parte aérea. Bassegio et al. (2017), observaram maior altura das plantas de *Handroanthus impetiginosus* cultivado *in vitro* em meio WPM em comparação com o meio MS. Já com relação ao número de folhas, os mesmos autores não observaram diferença significativa entre os dois tipos de meio de cultivo.

O número médio de plantas poliembriônica não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, demonstrando que os diferentes meios de cultivo não influenciaram essa variável, a qual alcançou número médio de 2 a 3 plantas emergidas/semente. Esse resultado pode ter base no fato da poliembrionia ser um fenômeno relacionado ao genótipo das plantas. Marcolin et al. (2013) destacaram as altas variações existentes nas taxas de poliembrionia entre matrizes de *H. chrysotrichus*. As plantas obtidas da introdução *in vitro* e aclimatizadas sobreviveram, inclusive as originadas por poliembria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente pesquisa, o meio alternativo composto de sais do fertilizante comercial Kristalon proporcionou bons resultados podendo ser indicado para a simplificação do meio de cultivo na fase de estabelecimento *in vitro* de *H. chrysotrichus*. Contudo, recomenda-se a ampliação de novos estudos acerca do assunto, envolvendo outras concentrações e tipos de meios de cultivo *in vitro* para a espécie.

REFERÊNCIAS

ACRA, L. A.; CARVALHO, S. M.; CERVI, A. C. Biologia da polinização e da reprodução de *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. exDC) mattos (Bignoniaceae Juss.). ISSN 0102-2067 / doi: 10.7213/estud.biol.6122. **Estudos de Biologia**, v. 34, n. 82, p. 45-49, 2012.

BASSEGIO, C.; FOGAÇA, L. A.; BALTAZAR, P.; EMMEL, E. Desenvolvimento de ipê-roxo em meios de cultura e concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 1, p. 72-80, 2017.

BATISTA, B. N.; RAPÔSO, N. V. M.; LIBERATO, M. A. R. Determinação do protocolo de assepsia para reprodução *in vitro* de *Euterpe precatoria* MART. **Revista Fitos**, v. 11, n. 1, p. 1-118, 2017.

BITTENCOURT J. R., N. S.; MORAES, C. I. G. Self-fertility and polyembryony in South American yellow trumpet trees (*Handroanthus chrysotrichus* and *H. ochraceus*, Bignoniaceae): a histological study of postpollination events. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, p. 59–76, 2010.

CORDEIRO, G. M.; MORAES, C. P.; MASSARO, R.; CUNHA, T. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley) em diferentes meios de cultura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 18, n. 1, p. 22-28, 2011.

CUNHA, T; CORDEIRO, G. M.; MASSARO, R.; DEZAN, L.F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v. 7, n. 8, p. 1-5, 2011.

FABRIS, D.; GERBER, T.; SARTORETTO, L. M. Desinfestação, germinação e micropropagação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride. **Scientific Electronic Archives**, v. 9, n. 3, p. 17-26, 2016.

FANTINEL, V. S.; OLIVEIRA, L. M.; MUNIZ, F. B.; ROCHA, E. C. Detecção de fungos e transmissão de alternaria alternata via sementes de ipê-amarelo, *Handroanthus chrysotrichus* (mart. Exdc) mattos. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 7, n. 2, p. 05-14, 2013.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia** [online], Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1. p. 183-260.

LEITE, D. M.; DAMASIO, J. F.; MELLO, V. S.; FERNANDES, L.; Karsburg, I. V. Determinação do número cromossômico de *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae) . **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 15, n. 1, 2017.

LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 499-505, 2016.

LLOYD, G; McCOWN, B. Micropropagação comercialmente viável do louro da montanha, *Kalmia latifolia* , pelo uso da cultura de ponta de broto. **Proc. In. Plant Prop. Soc.** v. 30, p.421–427, 1981.

LUCINI, F.; PUTZKE, J. Fungos fitopatogênicos em *Handroanthus chrysotrichus* (ipê amarelo – Bignoniaceae) cultivadas nos municípios de Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires – RS. **Caderno de Pesquisa, série Biologia**, v. 27, n. 1, p. 49-55, 2015.

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

MARCOLIN, G.; NAGAOKA, R. E.; PERES, F. S. B. Germinação e poliembrionia em sementes de ipê-dourado armazenadas. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 17; p. 1539-1547, 2013.

MENDES-RODRIGUES, C.; SAMPAIO, D. S.; COSTA, M. E.; CAETANO, A. P. S.; RANAL, M. A.; BITTENCOURT JÚNIOR, N. S.; OLIVEIRA, P. E. Polyembryony increases embryo and seedling mortality but also enhances seed individual survival in *Handroanthus* species (Bignoniaceae). **Flora**, v. 207, n. 265, 264–274, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-479, 1962.

OLIVEIRA, C. S.; MARTINS, G. N.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. **Revista Científica Internacional**, v. 2, n. 4, p. 1-21, 2009.

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

PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C.; MENEGUZZI, A.; MARCON FILHO, J. L.; REINIGER, L. R. S. Establishment and initial development *in vitro* of Yellow Ipe. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 5, 2018.

PEREIRA, M. O. P.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). **Nativa, Sinop**, v. 3, n. 1, p. 59-63, 2015.

PRUDENTE, D. O.; NERY, F. C.; SILVA, L. S.; PAIVA, R.; REIS, M. V.; NERY, M. C. Germinação *in vitro* e criopreservação de sementes de paineira-rosa. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 3, p. 272-276, 2016.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. **Documentos**, 61. ISSN: 1517-3135, 2008.

RABAIOLLI, S. M. S.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; SILVA, K. B.; PAIM, A. F.; ZIEGLER, A. C. F. Agar does not affect *in vitro* rhizogenesis and *ex vitro* acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. **CERNE**, v. 23, n. 2, p. 185-192, 2017.

SAMPAIO, D. S.; COSTA, M. E.; MENDES-RODRIGUES, C. Temperature effect in the number of seedlings per seed in cultivated specimens of *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae). **IHERINGIA**, v. 68, n. 2, p. 279-283, 2013.

WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 76, p. 14025-14035, 2012.

WINHELMANN, M. C.; TEDESCO, M.; LUCCHESI, J. R.; FIOR, C. S.; SCHAFFER, G. Propagação *in vitro* de *Angelonia integerrima*. **Rodriguésia** v. 70, e02232017, p. 1-12, 2019.