



Revista Árvore

ISSN: 0100-6762

r.arvore@ufv.br

Universidade Federal de Viçosa
Brasil

Pelegri, Luciana Luiza; Lopes Fortes Ribas, Luciana; Zanette, Flávio; Soares Koelher, Henrique
Germinação in vitro de eixos embrionários zigóticos de Imbuia (*Ocotea porosa* (Nees Ex Martius)
liberato barroso)

Revista Árvore, vol. 37, núm. 2, março-abril, 2013, pp. 231-236
Universidade Federal de Viçosa
Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48827959004>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EIXOS EMBRIONÁRIOS ZIGÓTICOS DE IMBUÍIA (*Ocotea porosa* (NEES EX MARTIUS) LIBERATO BARROSO)¹

Luciana Luiza Pelegrini², Luciana Lopes Fortes Ribas³, Flávio Zanette⁴ e Henrique Soares Koehler⁴

RESUMO – A imbuíia apresenta sementes recalcitrantes, com forte dormência tegumentar, irregularidade e baixa germinação, dificultando sua propagação natural. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de eixos embrionários de imbuíia, testando o efeito de diferentes concentrações de sacarose, de carvão ativado e de formulações salinas para acelerar a produção de mudas. Eixos embrionários zigóticos foram inoculados em meio de cultura MS/2 contendo diferentes concentrações de sacarose (15, 30, 60 ou 90 g L⁻¹), de carvão ativado (0, 1, 2 ou 3 g L⁻¹) e diferentes formulações salinas (MS, WPM, MS/2 ou WPM/2). Os resultados indicaram que a adição de 15 g L⁻¹ de sacarose foi insuficiente para promover a germinação dos eixos embrionários e as demais concentrações promoveram entre 45,5 e 59,4% de germinação. Com relação às formulações salinas, os melhores resultados foram obtidos com os meios de cultura MS e MS/2 obtendo-se 67,7 e 74,2% de germinação, respectivamente. A adição de carvão ativado favoreceu a germinação *in vitro* dos eixos embrionários, enquanto que na ausência de carvão ativado não ocorreu germinação e houve elevada porcentagem de oxidação. A germinação *in vitro* de imbuíia é viável e pode ser obtida com eixos embrionários zigóticos maduros com a formulação salina MS/2, suplementada com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de carvão ativado.

Palavras-chave: Sacarose, Meio de cultura, Carvão ativado.

IN VITRO GERMINATION OF ZYGOTIC EMBRYONIC AXES OF IMBUÍIA (*Ocotea porosa* (NEES EX MARTIUS) LIBERATO BARROSO

ABSTRACT – Imbuíia has recalcitrant seeds with strong tegumental dormancy, irregular and low germination, which impair natural propagation. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* germination of imbuíia embryonic axes by testing the effect of different concentrations of sucrose, activated charcoal and salt formulations in order to accelerate the production of plants. Zygotic embryonic axes were inoculated in MS/2 culture medium with different concentrations of sucrose (15, 30, 60 or 90 g L⁻¹), of activated charcoal (0, 1, 2 or 3 g L⁻¹) and in different salt formulations (MS, WPM, MS/2 or WPM/2). The results indicated that the addition of 15 g L⁻¹ sucrose was not enough to promote germination of embryonic axes and the other concentrations promoted between 45.5 and 59.4% germination. The best results were observed with MS and MS/2 salt formulations obtained 67.7 and 74.2% of germination respectively. The addition of activated charcoal to the media favored the *in vitro* germination of zygotic embryonic axes, while oxidation of the embryo tissues occurred in media without activated charcoal and germination did not happen. The *in vitro* germination of imbuíia can be achieved with the MS/2 salt formulation supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 1 g L⁻¹ of activated charcoal.

Keywords: Sucrose, Culture medium, Activated charcoal.

¹ Recebido em 02.02.2011 aceito para publicação em 05.04.2013.

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Pato Branco, Brasil. E-mail: <lupelegrini@hotmail.com>.

³ Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil. E-mail: <llfribas@gmail.com>.

⁴ Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Brasil. E-mail: <flazan@ufpr.br> e <koehler@ufpr.br>.

1. INTRODUÇÃO

Ocotea porosa (Nees ex Martius) Liberato Barroso é uma espécie florestal da família Lauraceae, conhecida como imbuia, de ocorrência na Floresta Ombrófila Mista (FOM) (Floresta com Araucária). Possui madeira de excelente qualidade mundialmente apreciada, sendo exportada em grande quantidade para fabricação de mobiliário de luxo, construção civil, marcenaria, carpintaria (CARVALHO, 2003). A FOM foi alvo de intensa exploração pela indústria madeireira de duas espécies a *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze e *Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso, levando à quase exaustão dos recursos naturais (CALDATO et al., 1999). Além disso, outro fator que contribuiu para a redução da FOM foi o desmatamento para a expansão da agricultura (RONDON NETO et al., 2002). Como consequência disso, essa espécie sofreu acelerada erosão genética na área de ocorrência natural, sendo incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção (CARVALHO, 2003).

A propagação natural da imbuia é difícil, pelo fato de suas sementes serem recalcitrantes e apresentarem forte dormência tegumentar, irregularidade na germinação e baixa viabilidade (CARVALHO, 2003). Outro fator limitante é a propagação via estacas. Inoue e Putton (2007) relataram que a imbuia possui pouca resposta no enraizamento de estacas (4%). Dessa forma, estudos relacionados com a germinação *in vitro* dessa espécie são importantes para maximizar a taxa de germinação superando as dificuldades naturais de propagação, bem como para obter plântulas com qualidade genética e fitossanitária adequadas.

Na literatura não há trabalhos relatando a germinação *in vitro* da imbuia. Porém, com outras espécies da família Lauraceae já foram realizados estudos com a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de pau-rosa (*Aniba roseadora* Ducke) (HANDA et al., 2005; LIMA et al., 2008) e imaturos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez) (SANTA-CATARINA et al., 2001), diminuindo com isso o tempo para obtenção de mudas quando comparado com o processo natural. Assim, devido aos problemas encontrados na propagação natural de imbuia e também pela sua importância econômica e ecológica, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de sacarose e formulações salinas, bem como a adição de carvão ativado na germinação *in vitro* de eixos embrionários de imbuia.

2. MATERIALE MÉTODOS

Foram utilizados frutos maduros (coloração violácea escura a preta) e imaturos (coloração verde), coletados na primeira semana de abril de 2006, na localidade de Colombo, PR, medindo entre 1,2 e 1,7 cm de diâmetro. Os frutos foram despulpados manualmente, as sementes foram lavadas e colocadas em local com insolação direta por cerca de 2 h para romper o tegumento (escarificação solar). Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação com solução de etanol 70% por 5 min, seguida de imersão em solução de 1,5 ou 2,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), acrescido de 0,1% de Tween® 20, por 20 min, em agitação. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes em água destilada e esterilizada.

Efeito da sacarose – os eixos embrionários imaturos foram inoculados em meio de cultura MS/2 (MS com os sais reduzidos pela metade) (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com quatro concentrações de sacarose (15, 30, 60 e 90 g L⁻¹), carvão ativado (1 g L⁻¹) e ágar Micromed® (6 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, quatro repetições e três frascos por parcela, possuindo quatro explantes cada frasco.

Efeito das formulações de sais - Os eixos embrionários maduros foram inoculados em diferentes formulações de sais de meio de cultura MS, Woody Plant Medium (WPM LLOYD; MCCOWN, 1980), MS/2 e WPM/2 (MS e WPM com os sais reduzidos pela metade), suplementados com sacarose (30 g L⁻¹), carvão ativado (2 g L⁻¹) e ágar BBL® (5,5 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições e cinco frascos por parcela, e cada frasco possuía quatro explantes.

Efeito do carvão ativado – os eixos embrionários maduros foram inoculados em meio de cultura MS/2 (MS com a concentração de sais reduzida pela metade), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), carvão ativado (0, 1, 2 e 3 g L⁻¹) e ágar BBL® (5,5 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, cinco repetições e cinco frascos por parcela, e cada frasco possuía quatro explantes.

A avaliação da porcentagem de germinação e de eixos embrionários oxidados foi realizada após 60 dias de cultivo. Os eixos embrionários contaminados por fungos ou bactérias foram descartados. Foram

considerados germinados os eixos embrionários que apresentaram emissão da radícula (0,2 a 0,4 cm de comprimento).

Condições de cultivo - O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N, antes da autoclavagem. Os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C, durante 20 min. Foram utilizados frascos com 7 cm de diâmetro e 15 cm de altura contendo 40 mL de meio de cultura e fechados com tampas de polipropileno. As culturas foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz por sete dias e, posteriormente, transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C (dia) e 18±2 °C (noite) com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 40 µmol m⁻²s⁻¹.

A análise estatística foi realizada com os dados originais, uma vez que atingiram os pressupostos de homogeneidade de variâncias. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett, seguido de análise de variância (ANOVA), e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico MSTATC.

3. RESULTADOS

As maiores porcentagens de germinação foram obtidas em meio de cultura contendo 30, 60 e 90 g L⁻¹ de sacarose, obtendo-se 45,5; 56,3; e 59,4% dos eixos embrionários germinados, respectivamente. Quando o meio de cultura foi acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose, apenas 10,4% dos eixos embrionários germinaram, o qual diferiu da maior concentração de sacarose (90 g L⁻¹) (Figura 1). Não se constatou oxidação dos eixos embrionários na maioria dos explantes, porém quando ocorreu ela foi muito baixa (5,7%) e apenas na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose (dados não apresentados).

As formulações salinas dos meios de cultura MS e MS/2 proporcionaram as maiores porcentagens de eixos embrionários germinados (67,7 e 74,2%, respectivamente), os quais foram superiores (p>0,05) às formulações dos meios de cultura WPM e WPM/2, na germinação in vitro dessa espécie (Figura 2).

A germinação in vitro dos eixos embrionários de imbuia foi favorecida pela adição de carvão ativado no meio de cultura (1, 2 ou 3 g L⁻¹), no entanto não houve diferença (p>0,05) entre as porcentagens de

germinação. No meio de cultura sem carvão ativado (controle) não houve germinação após 60 dias (Figura 3); além disso, foi constatado que 45% dos eixos embrionários oxidaram (dados não apresentados).

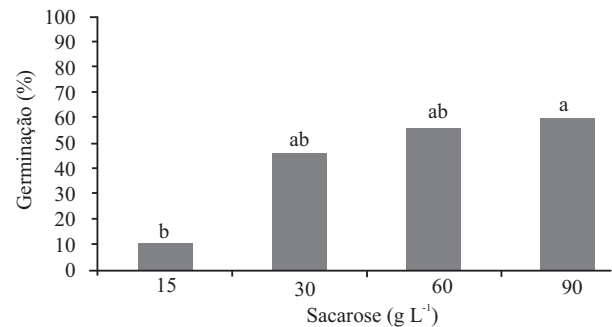


Figura 1 – Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação in vitro de eixos embrionários de imbuia (*Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso), após 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figure 1 – Effect of different concentrations of sucrose on in vitro germination of embryonic axes of Imbuia (*Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso), after 60 days of cultivation. Means followed by the same letter do not differ among each other by the Tukey test at 5% probability.

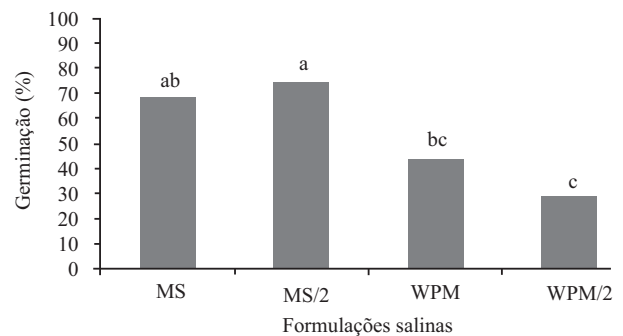


Figura 2 – Efeito de diferentes formulações salinas na germinação in vitro de eixos embrionários de imbuia (*Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso), após 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figure 2 – Effect of different salt formulations on in vitro germination of embryonic axes of Imbuia (*Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso), after 60 days of cultivation. Means followed by the same letter do not differ from each other by the Tukey test at 5% probability.

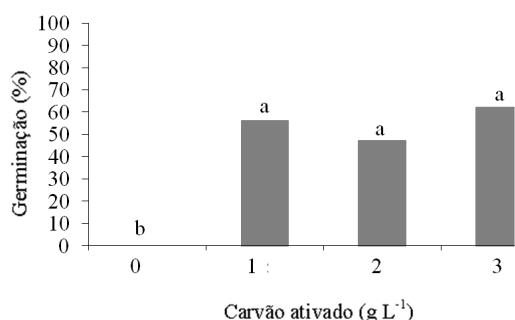


Figura 3 – Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado na germinação *in vitro* de eixos embrionários de imbuia (*Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso), após 60 dias de cultivo. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figure 3 – Effect of different concentrations of activated charcoal on *in vitro* germination of embryonic axes of Imbuia (*Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso), after 60 days of cultivation. Means followed by the same letter do not differ from each other by the Tukey test at 5% probability.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, provavelmente a baixa porcentagem de germinação obtida com 15 g L⁻¹ de sacarose tenha se devido ao fato de os eixos embrionários estarem imaturos, necessitando de concentrações mais elevadas de carboidratos no meio de cultura para favorecer a germinação (Figura 1). Essa necessidade de concentrações mais elevadas de sacarose para promover a germinação dos eixos embrionários está de acordo com o proposto por Hu e Ferreira (1998). Esses autores relataram que os embriões imaturos, por serem heterotróficos, requerem entre 8 e 12% de sacarose no meio de cultura, ao passo que embriões maduros podem germinar e crescer em meio de cultura com concentrações inferiores de sacarose (2 a 3%).

Concentrações mais elevadas de sacarose (30 a 90 g L⁻¹) promoveram maiores porcentagens de germinação de imbuia (45,5; 56,3; e 59,4%). Handa et al. (2005) relataram para o pau-rosa (*A. roseadora* Ducke), também da família Lauraceae, que com a adição de concentração mais elevada de sacarose no meio de cultura (50 g L⁻¹) proporcionou maior porcentagem de germinação (53%).

A baixa porcentagem de embriões oxidados (5,7%) se deveu, provavelmente, à adição do carvão ativado

no meio de cultura, por estar associado à adsorção de substâncias fenólicas liberadas pelo explante ou compostos do meio de cultura, as quais provocam a oxidação dos embriões, conforme citado por George et al. (2008).

No experimento em que foram testadas diferentes formulações de sais, os meios de cultura MS e MS/2 foram os mais efetivos na germinação dos eixos embrionários de imbuia, com média de 70% de germinação, após 60 dias. Resultado inferior (48% de germinação) foi obtido de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King), também cultivado em meio MS (COUTO et al., 2004). Provavelmente, a maior germinação deve-se ao fato de a formulação de sais do meio de cultura MS conter altas concentrações de amônio e nitrato (20 mM de NH₄⁺ e 40 mM de NO₃⁻) (GEORGE, 1996), enquanto a formulação do meio de cultura WPM é mais diluída e apresenta menor concentração de nitrogênio, potássio e menor força iônica total, além de conter 25% das concentrações de íons nitrato e amônio do meio de cultura MS (HARRY; THORPE, 1994). Essas diferenças nas concentrações de sais entre MS e WPM foram fundamentais, pois a germinação *in vitro* dos eixos embrionários dessa espécie foi melhor quando se utilizaram os meios de cultura MS e MS/2. Segundo Stein et al. (2007), estudos com meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* de espécies recalcitrantes são importantes, tanto para maximizar a taxa de germinação quanto para obter plântulas uniformes com qualidade genética e fitossanitária adequada. A germinação *in vitro* da imbuia também pode diminuir a irregularidade da germinação, ocasionada pela dormência e recalcitrância das sementes, uma vez que se obteve, após 60 dias de cultivo, uma porcentagem média de 74,2% em meio de cultura MS/2. Estudos realizados com a germinação *ex vitro* de imbuia evidenciaram que a porcentagem de sementes germinadas foi de 71% (KALIL-FILHO et al., 2004) e de 92,5% (TONIN; PEREZ, 2006), porém o tempo de ocorrência da germinação foi de 200 e 270 dias, respectivamente, após a semeadura. Dessa forma, esses resultados, quando comparados aos obtidos neste trabalho, indicaram que a germinação *in vitro* pode ser boa alternativa para acelerar a produção de mudas dessa espécie.

A adição de carvão ativado estimulou a germinação de eixos embrionários de imbuia, pois na sua ausência não ocorreu germinação. Santa-Catarina et al. (2001)

também obtiveram resultados positivos na germinação de embriões zigóticos de canela-sassáfras (*O. odorifera* Mez), obtendo 78,5% de germinação em meio de cultura contendo 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado. Com a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez), a adição de 2 g L⁻¹ de carvão ativado também foi eficiente na germinação *in vitro*, proporcionando 100% de germinação (LÉDO et al., 2007).

Como a imbuia é uma espécie lenhosa, a liberação dos compostos fenólicos pelos eixos embrionários no meio de cultura, sem a adição de carvão ativado, causou a oxidação desses, o que pode ter inibido a germinação e crescimento *in vitro*. Assim, pode-se considerar que a adição de carvão ativado no meio de cultura é essencial para promover a germinação dos eixos embrionários por prevenir a oxidação dos compostos fenólicos e, conseqüentemente, a sua necrose e morte.

Segundo Pan e Van-Staden (1998), o carvão ativado adsorve os exsudatos liberados pelos explantes, evitando a oxidação fenólica. Um período na ausência de luz tem sido considerado fator que pode contribuir para a prevenção da oxidação fenólica, como foi constatado por Marks e Simpson (1990). A adição de antioxidantes no meio de cultura e a redução da concentração de sais também podem minimizar os efeitos da oxidação dos explantes causados pela liberação de compostos fenólicos (CALDAS et al., 1998). No entanto, nesse experimento os eixos embrionários foram mantidos por sete dias na ausência de luz, os sais do meio de cultura foram reduzidos pela metade (MS/2) e, mesmo assim, não foi suficiente para evitar a oxidação da imbuia, salientando mais uma vez a eficiência do carvão ativado no meio de cultura, para germinação *in vitro* de eixos embrionários zigóticos de imbuia.

De forma geral, a germinação *in vitro* permite acelerar a produção de mudas dessa espécie e superar as dificuldades de germinação natural devido à dormência tegumentar que as sementes apresentam. Embora a cultura de embriões *in vitro* seja técnica já bem estabelecida, ela possibilita a obtenção de maior número de plantas em menor tempo, em comparação com a germinação natural, pois, além da dormência e recalcitrância das sementes dessa espécie, a germinação é irregular. As mudas obtidas por meio da germinação *in vitro* podem ser utilizadas como fontes de explantes para o desenvolvimento de protocolo de micropropagação dessa espécie.

5. CONCLUSÃO

A germinação *in vitro* de eixos embrionários maduros de imbuia pode ser obtida em meio de cultura MS/2 suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1 g L⁻¹ de carvão ativado.

6. AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marguerite Quoirin, pelas sugestões na redação do manuscrito; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de mestrado.

7. REFERÊNCIAS

- CALDATO, S. L.; LONGHI, S. J.; FLOSS, P. A. Estrutura populacional de *Ocotea porosa* (Lauraceae) em uma floresta ombrófila mista, em Caçador (SC). **Ciência Florestal**, v.9, n.1, p.89-101, 1999.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa, 1998. v.1. p.87-132.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v.1.
- COUTO, J. M. F. et al.. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.633-642, 2004.
- GEORGE, F. E.; HALL, M. A.; DE-KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht, The Netherlands: The Background, 2008. v.1.
- GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. London: Exegetics, 1996. v.2.
- HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba roseadora* Ducke). **Acta Amazônica**, v.35, n.1, p.29-33, 2005.
- HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p.539-560.

- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p.371-393.
- INOUE, M. T.; PUTTON, V. Macropropagação de 12 espécies arbóreas da floresta ombrófila mista. **Floresta**, v.37, n.1, p.55-61, 2007.
- KALIL-FILHO, A. N. et al. Dinâmica da Germinação de sementes de progênies de populações de imbuia (*Ocotea porosa* Nees et Martius ex. Nees, Lauraceae) do Paraná e de Santa Catarina. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.48, n.1, p.121-128, 2004.
- LIMA, R. B. S. et al. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) seeds. **Revista Árvore**, v.32, n.1, p.19-25, 2008.
- LÉDO, A. S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciências e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p.989-993, 2007.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v.30, p.421-427, 1980.
- MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, v.65, n.2, p.103-111, 1990.
- MSTAT-C. **A software program for the design, management and analysis of agronomic research experiments**. East Lansing: Michigan State University, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- RONDON NETO, R. M. et al. Análise florística e estrutural de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista Montana, situado em Crúva, RS – Brasil. **Ciência Florestal**, v.12, n.1, p.29-37, 2002.
- PAN, M. J.; VAN-STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v.26, n.3, p.155-163, 1998.
- SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S. C.; PEDROTTI, E. L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.4, p.501-510, 2001.
- STEIN, V. C. et al. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1702-1708, 2007.
- TONIN, G. A.; PEREZ, S. C. J. G. A. P. Qualidade fisiológica de sementes de *Ocotea porosa* (Nees et Martius Ex. Nees) após diferentes condições de armazenamento e semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.2, p.26-33, 2006.