

Artigos

Propagação *in vitro* de *Colubrina glandulosa* Perkins: espécie nativa com potencial para programas de reflorestamento

In vitro propagation of *Colubrina glandulosa* Perkins: a potential native species for reforestation programs

Odirlei Orlindo Hass^I, Thiago Sanches Ornellas^{II},
Ricardo Bittencourt^I

^IUniversidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brasil

^{II}Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

RESUMO

Colubrina glandulosa (sobraji) é uma espécie madeireira de rápido crescimento e tronco retilíneo, com potencial de formar reflorestamento homogêneo ou associado com outras espécies. Em vista disso, buscou-se estabelecer um protocolo de micropropagação, por meio de sementes e segmentos nodais, visando à produção de mudas em escala comercial. As sementes foram desinfestadas em NaClO 6% por 10, 20 ou 30 minutos e semeadas em meio de cultura MS suplementado, ou não, com 0,5 mL L⁻¹ de Comet[®]. Os segmentos nodais foram desinfestados em solução de NaClO 2% e de PPM™ 5%, introduzidos em meio de cultura WPM, suplementado com PPM™ (0; 0,2 ou 0,4%) e 0,5 mL L⁻¹ de Comet[®] associado com 0,75 g L⁻¹ de ampicilina sódica ou 2 mL L⁻¹ Kasumin[®]. Na multiplicação, segmentos nodais foram cultivados em meio de cultura WPM suplementado com BAP (6-benzilaminopurina) ou mT (meta-topolina) (2; 4; 8 ou 12 µM), combinados com a presença ou ausência de ANA (ácido naftalenoacético) (2 µM) em três subcultivos. No enraizamento, utilizou-se o meio de cultura WPM/2 suplementado com AIB (ácido indolbutírico) (0; 2 ou 4 µM) associado, ou não, com 0,15% de carvão ativado. As mudas enraizadas foram aclimatizadas *ex vitro*. O maior percentual de germinação (78,57%) foi observado nas sementes tratadas com NaClO 6% por 10 minutos, sem fungicida no meio de cultura. A concentração de 0,2% de PPM™ proporcionou a maior porcentagem de sobrevivência de segmentos nodais (70%). A sucessão dos subcultivos incrementa significativamente a porcentagem de indução de brotos e o maior número de brotos por explante (3,28±1,8) ocorreu na concentração de 2 µM mT. A formação do maior número de raízes observou-se na ausência do carvão ativado sem a necessidade de auxina exógena e na aclimatização, verificou-se alta porcentagem de sobrevivência das mudas. Dessa forma, foi possível obter um protocolo viável de micropropagação, constituindo-se de uma metodologia promissora na produção de mudas.

Palavras-chave: Sobraji; Micropropagação; Meta-topolina; PPM™

ABSTRACT

Colubrina glandulosa (sobraji) is a fast-growing timber species with a straight trunk, with the potential to form homogeneous reforestation, either by itself or associated with other species. In the view of this, we sought to establish a micropropagation protocol, using seeds and nodal segments, aiming at the production of seedlings on a commercial scale. The seeds were disinfected in NaClO 6% for 10, 20 or 30 minutes and sown in MS culture medium supplemented, or not, with 0.5 mL L⁻¹ of Comet®. The nodal segments were disinfected in 2% NaClO and 5% PPM™ solution, introduced in WPM culture medium, supplemented with PPM™ (0; 0.2 or 0.4%) and 0.5 mL L⁻¹ of Comet® associated with 0.75 g L⁻¹ of sodium ampicillin or 2 mL L⁻¹ Kasumin®. In multiplication, nodal segments were grown in WPM culture medium supplemented with BAP (6-benzylaminopurine) or mT (meta-topoline) (2; 4; 8 or 12 µM), combined with the presence or absence of ANA (naphthalenoacetic acid) (2 µM) in three subcultures. For rooting, the WPM/2 culture medium supplemented with IBA (indolbutyric acid) (0, 2 or 4 µM) was used, associated or not with 0.15% activated carbon. The rooted seedlings were acclimatized *ex vitro*. The highest percentage of germination (78.57%) was observed in seeds treated with 6% NaClO for 10 minutes, without fungicide in the culture medium. The 0.2% concentration of PPM™ provided the highest percentage of nodal segment survival (70%). The succession of subcultures significantly increases the rate of shoot induction and the highest number of shoots per explant (3.28 ± 1.8) occurred at a concentration of 2 µM mT. The formation of the largest number of roots was observed in the absence of activated carbon without the need for exogenous auxin and in acclimatization, there was a high percentage of seedling survival. In this way, it was possible to obtain a viable micropropagation protocol, constituting a promising methodology in the production of seedlings.

Keywords: Sobraji; Micropropagation; Meta-topoline; PPM™

1 INTRODUÇÃO

É comum encontrarem-se nas diferentes regiões do Brasil centenas de espécies de valor econômico atual ou potencial aproveitadas no âmbito local e regional. Dentre as espécies madeireiras nativas utilizadas para os mais variados fins, destaca-se a *Colubrina glandulosa* Perkins (Rhamnaceae), comumente chamada de sobraji, sobrasil ou falso-pau-brasil (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). A madeira é pesada e apresenta boa durabilidade natural, alcançando densidade de até 0,92 g.cm⁻³, o que favorece sua utilização na construção civil, naval e em obras hidráulicas. A espécie oferece também potencial para arborização urbana, sistemas agroflorestais e restauração de áreas alteradas por exibir atributos de rusticidade e fácil cultivo (BENTES-GAMA *et al.*, 2008). Apresenta ainda rápido crescimento de tronco retilíneo e o plantio pode ser realizado a sol pleno (SILVA *et al.*, 2015), o que beneficia a implantação de

reflorestamentos comerciais. Além disso, possui a característica natural de formar pequenos agrupamentos em vegetação secundária e capoeirões, o qual potencializa a formação de reflorestamentos homogêneos, ou ainda associados com outras espécies pioneiras, como a *Miconia cinnamomifolia* (jacatirão-açu) e a *Hyeronima alchorneoides* (licurana) (CARVALHO, 2005). A implantação de plantios florestais com duas ou mais espécies consorciadas e baseados em essências florestais nativas apresenta vantagens em comparação aos monocultivos, por exibir relação positiva com a produtividade (LIANG *et al.*, 2016), proporcionar a restauração de ambientes degradados, reduzir impactos ecológicos e aumentar a resiliência dos sistemas de produção frente às adversidades climáticas (ROLIM; PIOTTO, 2018).

A micropropagação de espécies florestais madeireiras é uma alternativa viável para a produção de mudas em larga escala (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013), uma vez que há uma crescente demanda de mudas para a formação de plantios florestais comerciais. Principalmente para algumas espécies florestais nativas que podem apresentar problemas quanto à propagação seminal (DIAS *et al.*, 2012), como é o caso de *Colubrina glandulosa* que apresenta dormência tegumentar (CARVALHO, 2005) e não possui metodologias estabelecidas para a produção de mudas em escala comercial.

Além disso, a micropropagação está entre as principais técnicas biotecnológicas empregadas na multiplicação de espécies vegetais, e com aplicações práticas comprovadas na micropropagação de espécies florestais madeireiras (PÉREZ FLORES; AGUILAR VEGA; ROCA TRIPEPI, 2012; CAMPOS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2016; RIBAS *et al.*, 2017; NAAZ *et al.*, 2019). Por meio desta é possível ainda realizar a conservação de germoplasma *in vitro*, a redução do tempo de programas de melhoramento genético, a produção clonal massiva em curto espaço de tempo e a obtenção de plantas livres de pragas e patógenos (PIJUT *et al.*, 2012).

Dessa forma, os estudos de propagação *in vitro* de *Colubrina glandulosa* poderão ampliar o conhecimento científico dessa espécie florestal nativa e possibilitar a obtenção de um protocolo de produção de mudas em escala comercial. O que pode

promover uma nova fonte de renda para pequenos e médios agricultores rurais, além de impulsionar a diversificação na oferta de madeira nobre no mercado. Rolim e Piotto (2018) afirmam ainda que o futuro da silvicultura está fundamentado no aumento do número de espécies florestais nativas cultivadas e na diversificação dos sistemas de produção, incluindo sistemas agroflorestais e silvipastoris. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação de *Colubrina glandulosa* por meio da introdução *in vitro* de sementes e segmentos nodais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia e Micropropagação Vegetativa da Universidade Regional de Blumenau (FURB) - *Campus I*, em Blumenau, Santa Catarina - SC. Todas as culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento com a temperatura ajustada para $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, fornecido por lâmpadas LED tubulares, branco frio, com densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ no nível das culturas. O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem a 121°C .

Sementes de *Colubrina glandulosa* foram coletadas durante o início da deiscência das cápsulas de plantas-matrizes localizadas em área florestal nativa em Blumenau ($26^{\circ}50'1.98'' \text{ S } 49^{\circ}3'13.02'' \text{ O}$). Plantas com idade de um ano e seis meses, provenientes do Viveiro Florestal Mudas do Vale, em Timbó - SC, foram cultivadas para o fornecimento dos segmentos nodais. Essas plantas foram transplantadas para vasos de polipropileno (8 L) contendo substrato Maxfertil®, acrescido de terra de subsolo argilosa peneirada (2:1 v/v) e transferidas para casa de vegetação pertencente à FURB. As plantas foram mantidas por um período de 12 meses sob sistema de irrigação por gotejamento e submetidas a aplicações mensais de 10 g por planta de fertilizante mineral misto Osmocote Plus® 15-9-12 (3M). As plantas foram pulverizadas

semanalmente com solução contendo 2,5 μM de BAP (6-benzilaminopurina), 0,5 mL L^{-1} de Comet[®] e 3 mL L^{-1} Kasumin[®]. Oito semanas antes do experimento, foram realizadas podas para estimular a formação de novas brotações. Quatro dias antes do experimento, os fungicidas Comet[®] e Kasumin[®] foram aplicados diariamente de forma alternada.

2.2 Germinação *in vitro*

Para a germinação *in vitro*, as sementes foram lavadas em água corrente e com cinco gotas de detergente neutro. Em seguida, foram imersas em etanol 70% (v/v) por três minutos, e então em solução de NaClO (hipoclorito de sódio) 6% (v/v) de cloro ativo, acrescido de 0,1% (v/v) de Tween 20[®] durante 10, 20 ou 30 minutos. Posteriormente, as sementes foram submetidas a três enxágues por um minuto em água estéril. Por fim, estas foram imersas em solução estéril de 1 mL L^{-1} de Comet[®] por 10 minutos. As sementes foram submetidas à superação de dormência de acordo com Melo Junior *et al.* (2018) e semeadas individualmente em tubos de ensaio de 55 mL de volume (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado, ou não, com 0,5 mL L^{-1} de Comet[®] e acrescido de 3% (m/v) de sacarose e 0,75% (m/v) de ágar. As culturas foram mantidas por sete dias na ausência de luz em sala de crescimento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 3 (presença ou ausência de fungicida no meio de cultura e o tempo de exposição ao NaClO), com sete repetições de dois tubos por tratamento, contendo uma semente em cada. As porcentagens de germinação e contaminação fúngica e bacteriana foram avaliadas após 30 dias de cultivo.

2.3 Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais

Para a coleta dos segmentos nodais, ramos jovens contendo gemas dormentes foram excisados das plantas na casa de vegetação e mantidos com a base imersa em solução estéril de 0,2% (m/v) PVP-40 (polivinilpirrolidona) durante duas horas. A limpeza

superficial dos ramos iniciou-se com lavagem por 10 minutos em água corrente com três gotas de detergente neutro. Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais com $1,6 \pm 0,2$ cm (tecido de reserva) foram desinfestados em etanol 70% (v/v) por um minuto, seguido de solução de NaClO a 2% (v/v) de cloro ativo, acrescido de 0,1% (v/v) de Tween 20[®], durante 10 minutos sob agitação constante, e posteriormente submetidos a cinco enxágues por um minuto em água estéril. Em seguida, metade dos segmentos nodais foram imersos em solução aquosa a 5% (v/v) de PPM[™] (*Plant Preservative Mixture*) e a outra metade em água estéril, ambos durante quatro horas. Por fim, os explantes foram introduzidos verticalmente em tubos de ensaio de 55 mL de volume (25 x 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 0,5% (m/v) de PVP-40, 2 μ M de mT (meta-topolina), 3% (m/v) de sacarose e 0,8% (m/v) de ágar; além da adição de 0,2 ou 0,4% (v/v) PPM[™] e testemunhas adicionais com a suplementação de 0,5 mL L⁻¹ de Comet[®] associado com 0,75 g L⁻¹ de ampicilina sódica ou 2 mL L⁻¹ Kasumin[®], sendo que esses últimos foram imersos apenas em água estéril durante quatro horas antes da introdução *in vitro*; e tratamento-controle (sem a imersão prévia em solução de PPM[™] e sem adição de PPM[™] em meio de cultura). Todas as soluções utilizadas na assepsia (etanol 70%, NaClO, PPM[™] e água estéril) contendo os segmentos nodais foram mantidas refrigeradas em temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até o momento da inoculação dos explantes.

As culturas foram mantidas por sete dias em ausência de luz em sala de crescimento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e organizado em arranjo fatorial 2 x 3 (imersão prévia em água ou solução de PPM[™] e diferentes concentrações de PPM[™] no meio de cultura) e testemunhas adicionais (Comet[®] e ampicilina sódica ou Kasumin[®]), com 10 repetições de três tubos por tratamento, contendo um segmento nodal por tubo. Após 28 dias de cultivo, foram avaliados os percentuais de sobrevivência, de oxidação fenólica e de contaminação fúngica e bacteriana.

2.4 Multiplicação *in vitro* de brotações

Segmentos nodais com $1 \pm 0,2$ cm de comprimento, obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, foram subcultivados em tubos de ensaio de 55 mL de volume (25 x 150 mm) contendo 15 mL de meio de cultura WPM, acrescido de 3% (m/v) de sacarose e 0,8% (m/v) de ágar, suplementado com BAP (6-benzilaminopurina) ou mT (meta-topolina) nas concentrações de 2; 4; 8 ou 12 μM , associados ou não com ANA (ácido naftalenoacético) na concentração de 2 μM ; e tratamento-controle (sem a adição dos fitorreguladores).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado organizado em arranjo fatorial 3 x 8 x 2 (subcultivos, diferentes concentrações de citocininas, e presença ou ausência de ANA no meio de cultura), com 10 repetições de três tubos por tratamento, contendo um segmento nodal por tubo. As avaliações ocorreram ao longo de três subcultivos de cinco semanas cada, com a transferência para meio de cultura fresco, com as mesmas formulações anteriores e individualização das brotações maiores de 1,5 cm. A cada subcultivo avaliaram-se o número e a altura de brotos ($>0,5$ cm), o percentual de indução de brotos por meio da contagem do número de brotos ($>0,5$ cm) por explante, considerando-se apenas brotos novos produzidos em cada subcultivo.

2.5 Enraizamento *in vitro*

Os brotos individualizados ($2 \pm 0,2$ cm) com quatro a seis gemas pertencentes aos melhores tratamentos em mT do experimento de multiplicação foram subcultivados em frascos (250 mL) contendo 40 mL de meio de cultura WPM com metade da concentração de sais e suplementado com 2% (m/v) de sacarose, 0,8% (m/v) de ágar, e AIB (ácido indolbutírico) nas concentrações de 0; 2 ou 4 μM , associado, ou não, com 0,15% (m/v) de carvão ativado. Os brotos foram introduzidos com no mínimo uma gema imergida no meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, dispostos em arranjo fatorial 2 x 3 (carvão ativado e concentrações de AIB), composto de 10 repetições, contendo dois brotos em cada frasco. Após 30 dias de cultivo, foram avaliados a porcentagem de brotos enraizados, o comprimento da raiz principal, o número de raízes por broto e o local de emissão das raízes (região do corte basal, gema lateral ou caule).

2.6 Aclimatização das mudas

Para a aclimatização, 12 mudas enraizadas ($\geq 2,5$ cm de parte aérea) obtidas do experimento de enraizamento foram transplantadas individualmente em tubetes (175 cm^3) contendo substrato Maxfertil® e casca de arroz carbonizada na proporção de 2:1 (v/v). Os tubetes foram colocados em um suporte e armazenados em caixa de acrílico (30 cm x 20 cm x 60 cm) coberta por filme de PVC (polivinilcloreto) para a manutenção da umidade relativa. As condições de cultivo foram mantidas por meio do controle de temperatura ($26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($> 60\%$) em casa de vegetação. Ao longo de 21 dias, foram realizadas perfurações no filme de PVC para promover a abertura gradativa da caixa. Após 30 dias de cultivo, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das mudas.

2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos resíduos e de Bartlett para homogeneidade das variâncias. Posteriormente, foi realizada análise de variância (ANOVA), e, quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, foi realizada a comparação de médias por meio do Teste de Duncan a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* R Studio versão 3.6.1 (RSTUDIO TEAM, 2019).

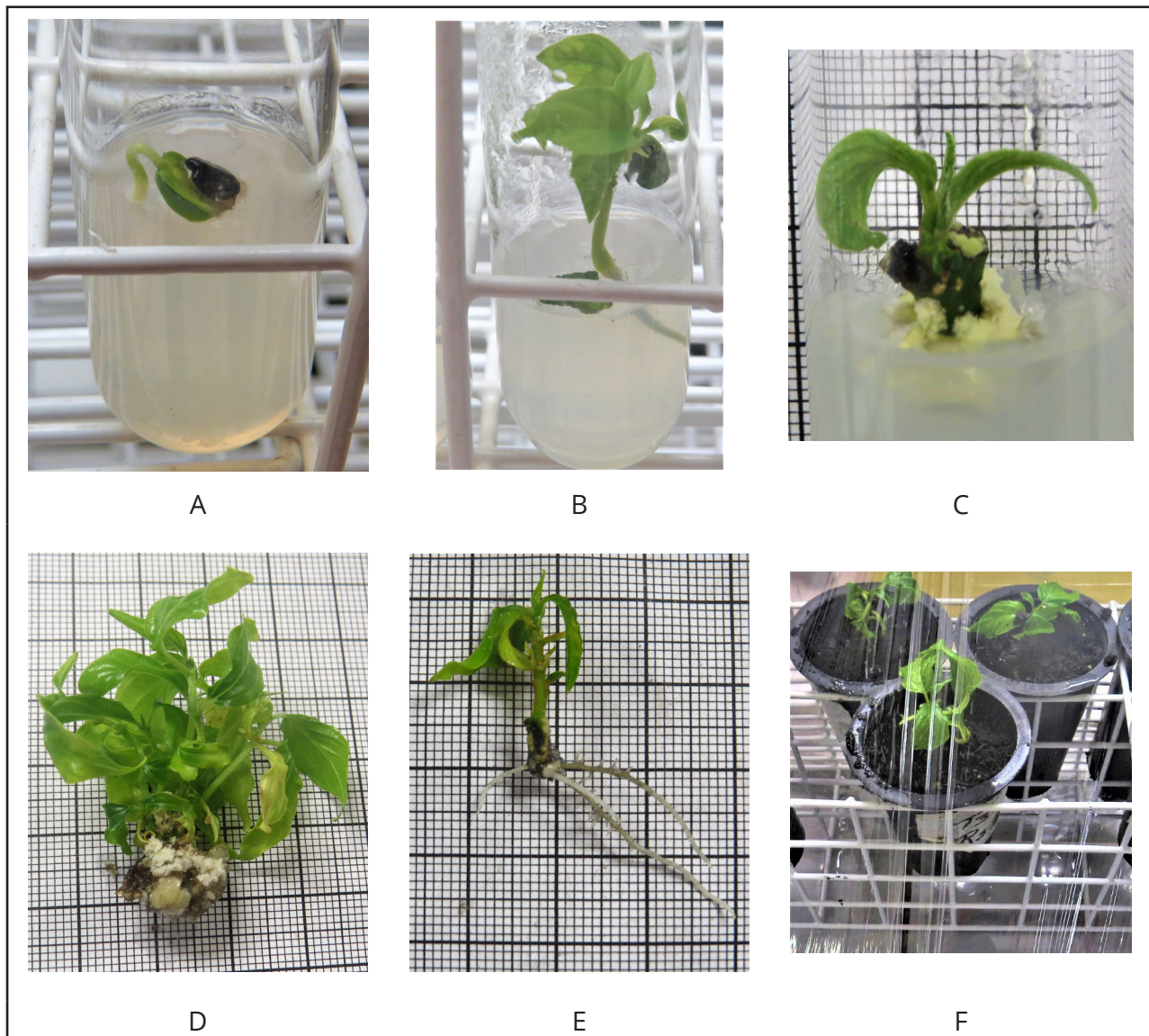
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Germinação *in vitro*

A germinação ocorreu em todos os tratamentos, iniciando três dias após a semeadura em meio de cultura MS. A análise estatística indicou que o tempo de exposição ao NaClO e a presença do fungicida no meio de cultura não resultaram em diferenças significativas ($p > 0,05$) na porcentagem de germinação das sementes.

Apesar de estatisticamente não haver diferenças, observou-se que na presença do fungicida Comet® no meio de cultura houve queda na germinação das sementes e desenvolvimento incompleto das plântulas, quando comparados aos tratamentos sem fungicida no meio de cultura e submetidos ao mesmo tempo de exposição ao NaClO. A máxima porcentagem de germinação (78,57%) ocorreu no tratamento com 10 minutos de exposição ao NaClO, na ausência de fungicida no meio de cultura. Neste tratamento, todas as plântulas obtidas desenvolveram raízes e cotilédones normais (Figura 1A e B). A maior porcentagem de contaminação das sementes foi de 14,29% por fungos no tratamento de 10 minutos à exposição em NaClO na ausência de fungicida no meio e 7,14% por bactérias no tratamento de 20 minutos à exposição em NaClO na presença de fungicida no meio e não apresentou diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Entre as substâncias empregadas na desinfestação de sementes de espécies arbóreas, destaca-se o NaClO (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013), devido à sua eficiência na eliminação de contaminantes, pela facilidade operacional e da fácil obtenção do agente desinfetante. Além disso, o NaClO pode auxiliar ou promover a quebra de dormência das sementes devido à capacidade de estimular a atividade da α -amilase, favorecendo a germinação (KANEKO; MOROHASHI, 2003). Em trabalhos anteriores, o NaClO também foi eficiente no estabelecimento de sementes *in vitro* de outras espécies florestais, como a *Amburana cearenses* (umburana-de-cheiro) (CAMPOS *et al.*, 2013), *Eugenia uniflora* (pitanga) (SILVA *et al.*, 2014) e *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) (RIBAS *et al.*, 2017). No entanto, o Comet® é um fungicida que proporciona excelente ação protetiva, devido a sua atuação na inibição da germinação dos esporos (COLOMBARI *et al.*, 2015). Porém, no presente estudo e nas condições testadas a suplementação em meio de cultura não foi eficiente e a sua adição ao meio de cultura é dispensável na maximização do cultivo de sementes *in vitro* de *Colubrina glandulosa*.

Figura 1 – Fases da propagação *in vitro* de *Colubrina glandulosa*

Fonte: Autores (2020)

Em que: semente germinada em meio de cultura MS, sete dias após a inoculação *in vitro* (A); plântula formada a partir de semente, 30 dias após a inoculação (B); segmento nodal 28 dias após a inoculação, evidenciando o alongamento da brotação (C); multiplicação de segmentos nodais estabelecidos a partir de plântula germinada *in vitro* no subcultivo 3 em meio de cultura WPM com 2 μM de mT, formando várias brotações (D); broto enraizado em meio de cultura WPM/2, na ausência de carvão ativado e sem aplicação exógena de auxina (E); aclimatização de mudas em tubetes com substrato Maxfertil® e casca de arroz carbonizada na proporção de 2:1 (v/v), armazenados em caixa de acrílico cobertas por filme de PVC (F).

3.2 Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais

Ao final de 28 dias de cultivo *in vitro*, as maiores porcentagens de estabelecimento de segmentos nodais foram obtidas em meio de cultura com 0,2%

de PPM™, atingindo até 70% de sobrevivência (Figura 1C). O uso do biocida PPM™, independentemente das concentrações em meio de cultura e a imersão prévia em solução, resultou em diferenças significativas das médias de sobrevivência em relação aos tratamentos com Comet® associado com ampicilina sódica ou Kasumin® e o tratamento-controle (sem a imersão prévia em solução de PPM™ e sem adição de PPM™ em meio de cultura) (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem de sobrevivência, oxidação fenólica e contaminação fúngica e bacteriana em segmentos nodais obtidos de mudas de *Colubrina glandulosa*, em função da concentração de PPM™ em meio de cultura e imersão prévia em solução e suplementação do Comet® associado com ampicilina sódica ou Kasumin®, em meio de cultura WPM, 28 dias após inoculação *in vitro*

Biocida no meio de cultura	Imersão prévia em PPM™ a 5%	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)	Contaminação	
				Fúngica (%)	Bacteriana (%)
0	-	30.00±9.23 ^{bc}	0.00±0.00 ^b	16.67±5.56 ^a	46.67±8.89 ^a
0	+	60.00±10.89 ^a	3.33±3.33 ^b	16.67±7.45 ^a	6.67±4.44 ^c
PPM™ (0,2%)	-	70.00±10.48 ^a	6.67±4.44 ^b	6.67±4.44 ^a	13.33±7.37 ^{bc}
PPM™ (0,2%)	+	43.33±7.11 ^{ab}	0.00±0.00 ^b	10.00±5.09 ^a	26.67±6.67 ^{ab}
PPM™ (0,4%)	-	63.33±7.78 ^a	0.00±0.00 ^b	3.33±3.33 ^a	23.33±7.11 ^{bc}
PPM™ (0,4%)	+	56.67±8.68 ^a	16.67±7.45 ^b	20.00±11.33 ^a	6.67±4.44 ^c
Comet® + Ampicilina	-	3.33±3.33 ^d	50.00±10.24 ^a	23.33±10.00 ^a	20.00±5.44 ^{bc}
Comet® + Kazumin®	-	20.00±7.37 ^{cd}	63.33±10.48 ^a	6.67±4.44 ^a	10.00±7.11 ^{bc}

Fonte: Autores (2020)

Em que: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan, a 5 % de probabilidade; Médias ± erro padrão da média.

A alta porcentagem de contaminação bacteriana dos segmentos nodais observados no tratamento-controle (46,67%) e porcentagens inferiores a 26,7% quando o uso do biocida em meio de cultura e imersão prévia em solução, indicou que o biocida PPM™ é eficiente no estabelecimento de culturas assépticas durante a fase de introdução *in vitro*. Além do mais, o uso de PPM™ resultou em baixos sinais de toxicidade e oxidação fenólica dos explantes, mesmo com o aumento das concentrações e a exposição prévia à solução deste biocida.

A eficácia do PPM™ também foi evidenciada no estabelecimento de segmentos nodais em outras espécies lenhosas. Para *Swietenia macrophylla* (mogno) e *Cedrela odorata* (cedro-rosa), a adição de 0,2% PPM™ no meio de cultura reduziu as porcentagens de contaminações e contribuiu para o aumento de sobrevivência dos explantes (PÉREZ FLORES; AGUILAR VEGA; ROCA TRIPEPI, 2012). Em *Calophyllum brasiliense* (guanandi), a concentração 0,1% de PPM™ ao meio de cultura foi suficiente para o estabelecimento da espécie *in vitro* (SILVEIRA *et al.*, 2016).

A suplementação do meio de cultura com o fungicida Comet® associado com ampicilina sódica ou com Kasumin® resultou em porcentagens médias de contaminação (fúngica e bacteriana) inferiores a 23%. No entanto, apresentou as maiores porcentagens de oxidação fenólica ($p > 0,05$), acima dos 50%, o que pode ter prejudicado na sobrevivência dos explantes. Os segmentos nodais que sobreviveram, exibiram sinais de toxicidade, evidenciada por necrose de tecidos, amarelecimento de folhas, subdesenvolvimento e a morte de todos os explantes após 45 dias de cultivo *in vitro*.

Apesar disso, a suplementação de substâncias fungicidas e bactericidas ao meio de cultura podem auxiliar no controle da contaminação por microrganismo e o estabelecimento de espécies florestais *in vitro*. Na introdução de segmentos nodais de dois clones de *Acacia mearnsii* (acácia-negra), a combinação de substâncias proporcionou os melhores resultados com 2 g L⁻¹ Cercobin® + 2 mL L⁻¹ Kasumin® (ISHIBASHI *et al.*, 2017). Porém, os mesmos autores afirmam que o tratamento isolado de 2 mL L⁻¹ de Kasumin® resultou em alta porcentagem de contaminação, ocasionada pela termossensibilidade da substância ao processo de autoclavagem, o que diminuiu o efeito do bactericida.

O uso de antibióticos no controle da contaminação *in vitro*, na maioria das vezes, é pouco eficaz e pode alterar o crescimento das plantas devido à sua fitotoxicidade,

além de combater somente as bactérias, aumentar o custo do meio de cultura e, usualmente, estes antibióticos são termossensíveis (NIEDZ, 1998). Em função disso, o uso do PPM™ torna-se uma alternativa, pois é um poderoso biocida de amplo espectro, composto de duas isotiazolonas (metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona), capazes de controlar contaminantes endofíticos, e apresentar baixa fitotoxicidade (MIYAZAKI *et al.*, 2011).

Em testes preliminares, utilizando-se segmentos nodais destas plantas, foram observadas altas porcentagens de oxidação fenólica ainda na fase de assepsia ou no decorrer do experimento, o que ocasionou necrose dos tecidos e a morte dos explantes em todos os tratamentos, mesmo com o uso de PVP-40 em solução e meio de cultura. Entretanto, manter as soluções com os segmentos nodais refrigerados em temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante todo o processo de assepsia, resultou em redução nos níveis de oxidação fenólica dos explantes, possivelmente pela redução dos processos metabólicos enzimáticos nos tecidos vegetais (Dados não publicados).

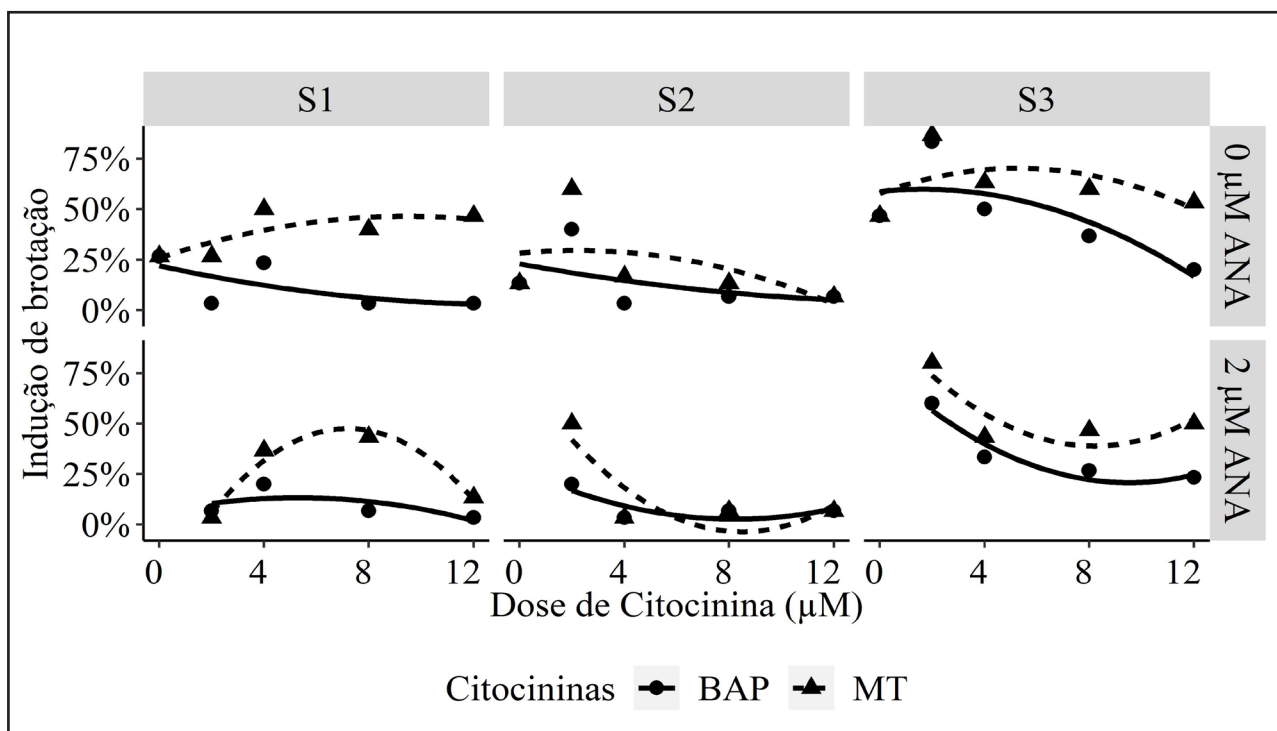
3.3 Multiplicação *in vitro* de brotações

A suplementação de diferentes reguladores de crescimento ao meio de cultura WPM promoveu a indução de brotações nos três subcultivos. Houve aumento do efeito das citocininas no incremento dos brotos à medida que foram sendo realizados os subcultivos, especialmente com a dose de $2 \mu\text{M}$ de citocininas (Figura 2). Dessa forma, verificaram-se diferenças estatísticas entre os fatores subcultivos (S1; S2 e S3), citocininas (BAP e mT) e as concentrações de citocininas ($p < 0,001$).

Dentre os subcultivos, o S3 produziu o maior número de brotos por explante, com diferenças significativas em relação aos subcultivos 1 e 2 ($p < 0,05$). No S3, as plantas cultivadas em $2 \mu\text{M}$ de mT (Figura 1D) apresentaram a maior frequência de indução de brotos (87%) com média máxima de $3,28 \pm 0,18$ brotos e altura média de

1,26 ± 0,09 cm, enquanto o uso de BAP na mesma concentração produziu 2,72 ± 0,32 brotos com uma altura média de 0,96 ± 0,05 cm (Tabela 2).

Figura 2 – Porcentagem de indução de brotações em segmentos nodais de *Colubrina glandulosa*, em função da concentração das citocininas (BAP ou mT), na ausência ou presença da auxina ANA, em meio de cultura WPM, em três subcultivos (S1; S2 e S3), após 15 semanas de cultivo *in vitro*



Fonte: Autores (2020)

A baixa formação de brotos nos explantes introduzidos em meio de cultura sem reguladores de crescimento indica que é necessária a aplicação de uma fonte exógena de citocininas para induzir respostas morfofisiológicas nos explantes. No entanto, a aplicação de auxina não aumentou as porcentagens de indução de brotação, independentemente dos subcultivos. Também não favoreceu o número e a altura de brotos regenerados. Um balanço adequado entre citocinina e auxina e as concentrações endógenas nos tecidos vegetais estabelecem um controle eficiente na morfogênese e influenciam na atividade meristemática das gemas axilares

(MAGYAR-TÁBORI *et al.*, 2010). Como foi observado no presente trabalho, o uso de auxinas também não induziu o aumento de taxas de regeneração das brotações de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa), sendo que a adição de 0,5 μM de AIB ou ANA combinada com BAP não apresentou diferenças em relação aos tratamentos sem a adição de AIB ou ANA (RIBAS *et al.*, 2017).

Tabela 2 – Efeito da concentração de citocininas e auxina em meio de cultura WPM, no número de brotos e altura de brotos em segmentos caulinares da *Colubrina glandulosa* no subcultivo 3

BAP (μM)	mT (μM)	ANA (μM)	Número de brotos (explante ⁻¹)	Altura de brotos (cm)
Controle			1,05 \pm 0,05 ^f	1,79 \pm 0,26 ^a
2			2,72 \pm 0,32 ^{abc}	0,96 \pm 0,05 ^{bcdef}
4			1,85 \pm 0,28 ^{bcdef}	1,01 \pm 0,14 ^{bcde}
8			1,93 \pm 0,38 ^{bcdefg}	0,93 \pm 0,08 ^{bcdefg}
12			1,13 \pm 0,13 ^{ef}	0,85 \pm 0,04 ^{bcdefg}
2		2	2,07 \pm 0,40 ^{bcde}	0,83 \pm 0,08 ^{cdefg}
4		2	1,69 \pm 0,25 ^{cdef}	0,62 \pm 0,08 ^{fg}
8		2	1,56 \pm 0,33 ^{def}	0,68 \pm 0,12 ^{efg}
12		2	1,63 \pm 0,24 ^{cdef}	0,59 \pm 0,06 ^g
	2		3,28 \pm 0,18 ^a	1,26 \pm 0,09 ^b
	4		2,55 \pm 0,22 ^{abc}	1,21 \pm 0,18 ^{bc}
	8		2,81 \pm 0,28 ^{ab}	0,85 \pm 0,09 ^{bcdefg}
	12		2,27 \pm 0,33 ^{abcd}	0,74 \pm 0,08 ^{defg}
	2	2	2,67 \pm 0,30 ^{abc}	1,12 \pm 0,10 ^{bcd}
	4	2	2,48 \pm 0,52 ^{abcd}	0,90 \pm 0,11 ^{bcdefg}
	8	2	2,64 \pm 0,35 ^{abc}	1,00 \pm 0,13 ^{bcde}
	12	2	1,93 \pm 0,32 ^{bcdef}	0,93 \pm 0,11 ^{bcdefg}

Fonte: Autores (2020)

Em que: Médias \pm erro padrão da média; BAP - 6-benzilaminopurina; mT - meta-topolina; ANA - ácido naftalenoacético; Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

Entre as citocininas testadas, a mT influenciou positivamente no crescimento, na qualidade dos brotos e na maior sobrevivência após a individualização, no entanto, não aumentou as porcentagens de regeneração de brotos comparativamente ao BAP. A influência positiva no crescimento e a qualidade das brotações com uso do mT

também foi relatada em espécies arbóreas por Gentile *et al.* (2014), em *Prunus domestica* e *Prunus insititia x domestica* (ameixeira-europeia). Na micropropagação de *Syzygium cumini* (jambolão), a concentração de 5 µM de mT associado com 2 µM da auxina ANA proporcionou o aumento na porcentagem de multiplicação e no comprimento dos brotos, além de melhorar a resposta das mudas ao estresse induzido por condições *ex vitro* (NAAZ *et al.*, 2019).

A superioridade da mT em comparação a outras citocininas empregadas, como BAP, pode estar relacionada ao fato de que o acúmulo das topolinas nos tecidos vegetais das plantas é impedido por sua acelerada taxa de translocação e seus metabólitos são facilmente degradáveis (KAMÍNEK; MOTYKA; VAŇKOVÁ, 1997). Por apresentar essa característica natural de menor toxicidade, a mT está se tornando uma alternativa às citocininas à base de purina como o BAP, para indução *in vitro* de brotações (AMOO; FINNIE; VAN STADEN, 2011).

3.4 Enraizamento *in vitro*

Após 30 dias de cultivo, na fase de enraizamento *in vitro*, observou-se que a adição de carvão ativado no meio de cultura influenciou negativamente nas porcentagens de enraizamento das brotações, por apresentar diferença significativa ($p > 0,01$) quando comparado aos tratamentos com ausência desta substância, independentemente do uso e das concentrações de AIB (Tabela 3). Os tratamentos com a ausência de carvão ativado obtiveram a média máxima de 40% de enraizamento, enquanto foram observados apenas 10% de enraizamento na presença de carvão ativado.

O efeito negativo do carvão ativado no enraizamento dos brotos pode ter ocorrido devido às propriedades físico-químicas capazes de promover a adsorção de componentes suplementados ao meio de cultura, como as vitaminas e as auxinas, causando efeito inibitório destes componentes para as brotações (ERIG; SCHUCH; BRAGA, 2004). Nesse sentido, pode-se observar que o aumento da concentração do AIB (4 µM) induziu a formação de raízes mesmo com a presença de carvão

ativado, reforçando a hipótese da adsorção dos componentes do meio de cultura. A suplementação do carvão ativado ao meio de cultura também não se mostrou eficiente para o enraizamento de *Pyrus communis* (pereira) como descrito por Erig, Schuch e Braga (2004), uma vez que a adição de 1% de carvão ativado no meio de cultura resultou em nenhuma das microestacas enraizadas, independentemente das concentrações (3,2 e 6,4 μM) de ANA empregadas.

Tabela 3 – Porcentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento de raízes e o local de emissão das raízes (corte basal, gema e caule) das brotações de *Colubrina glandulosa* submetidos aos tratamentos com AIB em diferentes concentrações (0; 2 ou 4 μM) e presença ou ausência de carvão ativado em meio de cultura WPM/2, após 30 dias de cultivo *in vitro*

AIB (μM)	Carvão ativado ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$)	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento de raízes (cm)	Local de emissão das raízes		
					Corte Basal (%)	Gema (%)	Caule (%)
0	-	25.00 \pm 11.18 ^a	3.00 \pm 0.52 ^{ns}	1.23 \pm 0.29 ^{ns}	25.00 \pm 11.06 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}
2	-	40.00 \pm 12.47 ^a	2.50 \pm 0.27 ^{ns}	1.57 \pm 0.11 ^{ns}	35.00 \pm 13.02 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	5.00 \pm 5.00 ^{ns}
4	-	30.00 \pm 11.06 ^a	2.00 \pm 0.32 ^{ns}	0.65 \pm 0.14 ^{ns}	10.00 \pm 10.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	15.00 \pm 7.64 ^{ns}
0	+	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}
2	+	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}
4	+	10.00 \pm 6.67 ^b	1.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.30 \pm 0.04 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	10.00 \pm 6.67 ^{ns}

Fonte: Autores (2020)

Em que: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan, a 5 % de probabilidade; Médias \pm erro padrão da média ^{ns}: não significativo.

O uso de diferentes concentrações de AIB também não influenciou significativamente sobre as médias do comprimento da raiz principal e no número de raízes mesmo nos tratamentos em ausência de carvão ativado. A suplementação de auxina exógena aos brotos causa alterações hormonais, o que pode beneficiar ou até mesmo dificultar o enraizamento de espécies florestais lenhosas. Pode estar relacionado ainda, dentre outros aspectos, ao grau de juvenildade do material vegetal empregado (DIAS *et al.*, 2012). Em um estudo com a espécie florestal lenhosa *Garcinia quaesita* (FARZANA *et al.*, 2010), foi observado que a aplicação exógena de auxina teve

um efeito negativo no enraizamento. Por outro lado, a aplicação exógena de auxina fez-se necessária para a indução de raízes em *Amburana cearenses* (umburana-de-cheiro) (CAMPOS *et al.*, 2013) e *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) (RIBAS *et al.*, 2017).

Em relação ao local de emissão das raízes nas brotações, a maior frequência foi observada na região do corte basal (35%) (Figura 1E) e do caule (15%) e não foi notada emissão de raízes na região das gemas laterais. A maior frequência de raízes observada na região do corte basal e caule pode ter ocorrido por meio do rompimento dos tecidos adjacentes ao câmbio vascular, que é uma região meristemática, o que provavelmente facilitou a formação de raízes.

3.5 Aclimatização das mudas

O procedimento utilizado na aclimatização das mudas, por meio da abertura gradativa da cobertura do filme de PVC (Figura 1F), mostrou-se adequado, uma vez que se obteve uma porcentagem média de sobrevivência de 91,7% após 30 dias de permanência em casa de vegetação. Além disso, as mudas apresentaram retomada de crescimento por meio do incremento no número de folhas, sem exibir qualquer variação ou anormalidade morfológica.

A sobrevivência das plantas na fase de aclimatização é dependente do controle de vários fatores, como a umidade, temperatura, luminosidade, composição do substrato e a disponibilidade de nutrientes (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). No entanto, a manutenção da umidade é um dos principais fatores a ser considerado durante a aclimatização *ex vitro*, pois a alta umidade do ar encontrada no interior dos frascos de cultura modifica a estrutura da cutícula e aumenta o número de estômatos por área foliar, o que reduz o controle das plantas sobre a perda de água por transpiração (COSTA *et al.*, 2009). Desse modo, o processo de aclimatização em caixa de acrílico coberta com filme de PVC auxiliou a manutenção da umidade relativa do ambiente após o transplante, o que favoreceu o estabelecimento *ex vitro*, além de evitar danos e morte de plantas principalmente durante a fase inicial de aclimatização, que é a fase em que ocorre a maior perda das mudas.

4 CONCLUSÕES

Na germinação *in vitro*, recomenda-se submeter as sementes à solução de NaClO a 6% de cloro ativo por 10 minutos, sem a necessidade de suplementação de fungicida ao meio de cultura.

Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais, a concentração de 0,2% do biocida PPM™ em meio de cultura proporciona melhor porcentagem de sobrevivência.

A sucessão dos subcultivos incrementa significativamente a porcentagem de indução de brotações, com os maiores valores obtidos no subcultivo 3. Para a produção do maior número de brotos de *Colubrina glandulosa* é recomendada a concentração de 2 µM de mT.

A ausência de carvão ativado no meio de cultura proporciona as melhores porcentagens de enraizamento, sem a necessidade de aplicação exógena de auxina para a indução satisfatória de raízes.

A aclimatização em caixa de acrílico coberto com filme de PVC promove alta porcentagem de sobrevivência das mudas obtidas *in vitro* de *Colubrina glandulosa*.

Os resultados obtidos demonstram que foi possível obter um protocolo viável para a micropropagação da espécie, constituindo-se de uma metodologia promissora na produção de mudas de *Colubrina glandulosa*. No entanto, as fases de enraizamento e aclimatização necessitam de mais estudos, a fim de garantir a eficiência do protocolo para a produção em escala comercial.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa ao primeiro e ao segundo autor, respectivamente, e à Universidade Regional de Blumenau (FURB) e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal da FURB pela disponibilização da infraestrutura laboratorial.

REFERÊNCIAS

- AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 197-206, 2011.
- BENTES-GAMA, M. D. M. *et al.* **Espécies arbóreas nativas com potencial para recuperação de paisagens alteradas em Rondônia**. [S. l.]: Embrapa Rondônia, 2008. (Documentos).
- CAMPOS, V. C. A. *et al.* Micropropagation of umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013.
- CARVALHO, P. E. R. **Sobrasil**. Colombo: Embrapa, 2005.
- COLOMBARI, L. F. *et al.* Efeito fisiológico de fungicidas sistêmicos em parâmetros agrônômicos da cenoura. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 3, p. 366-371, 2015.
- CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. p. 448-452.
- COSTA, F. H. S. *et al.* Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2009.
- DIAS, P. C. *et al.* Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 72, p. 453, 2012.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. In vitro rooting of pear tree (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 275-277, 2004.
- FARZANA, A. F. R. *et al.* In vitro regeneration of shoots from *Garcinia quaesita* leaf explants. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, [s. l.], v. 38, n. 3, 2010.
- GENTILE, A. *et al.* Effect of meta-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in Prunus rootstocks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 373-381, 2014.
- ISHIBASHI, V. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de *Acacia mearnsii* De Wild. (Fabaceae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 15-21, 2017.
- KAMÍNEK, M.; MOTYKA, V.; VAŇKOVÁ, R. Regulation of cytokinin content in plant cells. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagen, v. 101, n. 4, p. 689-700, 1997.
- KANEKO, Y.; MOROHASHI, Y. The effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. **Plant Science**, [s. l.], v. 164, n. 2, p. 287-292, 2003.
- LIANG, J. *et al.* Positive biodiversity-productivity relationship predominant in global forests. **Science**, [s. l.], v. 354, n. 6309, out. 2016.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society**, [s. l.], v. 30, p. 421-427, 1980.

MAGYAR-TÁBORI, K. *et al.* The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s. l.], v. 101, n. 3, p. 251-267, 2010.

MELO JUNIOR, J. L. D. A. *et al.* Germination and morphology of seeds and seedlings of *Colubrina glandulosa* Perkins after overcoming dormancy. **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 639, 2018.

MIYAZAKI, J. *et al.* Bacterial endophyte in *Macropidia fuliginosa*: its localisation and eradication from in vitro cultured basal-stem callus. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 59, n. 4, p. 363-368, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAAZ, A. *et al.* Meta-topolin improved micropropagation in *Syzygium cumini* and acclimatization to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 63, n. 1, p. 174-182, 2019.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **Hort Technology**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 598-601, 1998.

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.

PÉREZ FLORES, J.; AGUILAR VEGA, M. E.; ROCA TRIPEPI, R. Ensaio para o estabelecimento *in vitro* de *Swietenia macrophylla* e *Cedrela odorata*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 20-30, 2012.

PIJUT, P. M. *et al.* In vitro propagation of tropical hardwood trees species – a review (2001-2011). **Propagation of Ornamental Plants**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 25-51, 2012.

RIBAS, L. L. F. *et al.* Micropropagation of *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. From in vitro germinated seedlings. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 391-402, 2017.

ROLIM, S. G.; PIOTTO, D. **Silvicultura e tecnologia de espécies da Mata Atlântica**. Belo Horizonte: Rona, 2018. 160 p.

RSTUDIO TEAM. **RStudio**: Integrated Development for R. RStudio, Inc. Boston, 2019. Disponível em: <http://www.rstudio.com>. Acesso em: 1 out. 2019.

SILVA, K. D. A. *et al.* Semeadura direta com transposição de serapilheira como metodologia de restauração ecológica¹. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 5, p. 811-820, 2015.

SILVA, P. R. D. *et al.* A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through in vitro germination and micropropagation. **Annals of Forest Research**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 39-45, 2014.

SILVEIRA, S. S. *et al.* Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 3, p. 656-663, 2016.

Contribuição de Autoria

1 – Odirlei Orlindo Hass

Engenheiro Florestal, Me.

<https://orcid.org/0000-0001-7073-3275> • ohas@terra.com.br

Contribuição: Conceituação, Investigação, Metodologia, Curadoria de dados, Análise Formal, Visualização de dados, Escrita - primeira redação

2 – Thiago Sanches Ornellas

Engenheiro Agrônomo, Dr.

<https://orcid.org/0000-0002-6638-0937> • thisorn@gmail.com

Contribuição: Análise Formal, Investigação, Metodologia, Visualização de dados, Escrita - revisão e edição

3 – Ricardo Bittencourt

Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor

<https://orcid.org/0000-0002-6609-3372> • ricbittencourt@furb.br

Contribuição: Conceituação, Obtenção de financiamento, Supervisão, Escrita - revisão e edição

Como citar este artigo

Hass, O. O.; Ornellas, T. S.; Bittencourt, R. Propagação *in vitro* de *Colubrina glandulosa* Perkins: espécie nativa com potencial para programas de reflorestamento. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 287-308, 2022. DOI 10.5902/1980509853294. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509853294>.