

Estabelecimento in vitro de *Eremanthus incanus*

Natane Amaral Miranda¹, Miranda Titon², Israel Marinho Pereira², José Sebastião Cunha Fernandes³,
Marcone Moreira Santos⁴

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Silvicultura, Rodovia BR 465, km 07, s/n, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil

²Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Engenharia Florestal, Rodovia MGT 367, km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000, Diamantina, MG, Brasil

³Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Agronomia, Rodovia MGT 367, km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000, Diamantina, MG, Brasil

⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciência Florestal, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil

*Autor correspondente:
nataneamaral@gmail.com

Termos para indexação:

Desinfecção
Oxidação
Micropropagação

Index terms:

Disinfection
Oxidation
Micropropagation

Histórico do artigo:

Recebido em 29/10/2017
Aprovado em 03/05/2019
Publicado em 09/12/2019

Resumo - Objetivou-se avaliar procedimentos para introdução in vitro de brotações retiradas de mudas de candeia mantidas em viveiro. Para a desinfestação das brotações, testou-se tempos de imersão (5, 10, 15 e 20 min) em hipoclorito de sódio a 2,5% e a influência do uso de fungicida antes (7 e 15 dias) e após a coleta das brotações, nas concentrações de 0,5 e 1,0 g L⁻¹ respectivamente. Para o controle da oxidação dos explantes in vitro, avaliou-se a adição de polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado ao meio de cultura, ambos nas concentrações 1 e 2 g L⁻¹. O uso de hipoclorito de sódio permitiu a desinfestação das brotações introduzidas, porém não houve diferença significativa entre os tempos testados. A coleta de brotações 15 dias após a aplicação de fungicida nas mudas fornecedoras das brotações resultou em ausência de contaminação. A oxidação dos explantes atingiu altos níveis, mesmo na presença de PVP e carvão ativado no meio de cultura.

Establishment of *Eremanthus incanus* in vitro

Abstract - The objective of this study was to evaluate the procedures for introduction of shoots in vitro taken from seedlings kept in nursery. For the disinfection of the shoots, immersion times (5, 10, 15 and 20 min) in 2.5% sodium hypochlorite were tested. We also analysed the influence of using fungicide before (7 and 15 days) and after the shoots collection, in the concentrations of 0.5 and 1.0 g L⁻¹ respectively. In order to control the oxidation of explants in vitro, the addition of poly vinyl pyrrolidone (PVP) and activated charcoal to the culture medium, both at concentrations 1 and 2 g L⁻¹, were evaluated. The use of sodium hypochlorite allowed disinfection of the introduced shoots, but there was no significant difference between the times tested. The collection of shoots 15 days after the application of fungicide in the seedlings suppliers of the shoots, allowed the absence of contamination. The oxidation of the explants reached high levels even in the presence of PVP and activated charcoal in the culture medium.



Introdução

A candeia é o nome popular para algumas espécies do gênero *Eremanthus*, pertencente à família Asteraceae, que possui parte considerável de espécies endêmicas dos cerrados e campos rupestres, sendo duas delas (*Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch e

Eremanthus incanus (Less.) Less) de maior ocorrência em Minas Gerais, e com maior importância econômica pela valorização do uso da madeira e extração de óleo essencial (Scolforo et al., 2012).

E. incanus é uma espécie comum em Minas Gerais e na Bahia, ocorrendo entre 550 e 1700 m de altitude, no cerrado, na floresta secundária ou raramente

na Caatinga e restinga, sendo bastante utilizada principalmente para a produção de moirões (Scolforo et al., 2012; Loeuille, 2014). A produção comercial de mudas de candeia é realizada via seminal (Davide & Melo, 2012), porém o uso de técnicas de propagação assexuada representa importante ferramenta visando principalmente a manutenção de genótipos superiores e a produção de plantas livres de doenças (Xavier et al., 2013). A propagação assexuada por enxertia, estaquia e micropropagação são técnicas alternativas para produção de mudas de candeia (Araújo et al., 2018).

O sucesso da micropropagação depende não só dos fatores inerentes ao tecido vegetal (Schuch et al., 2008; Borges et al., 2012), como também do meio de cultura utilizado, dos reguladores de crescimento e das condições de incubação (Bassan et al., 2006; Jardim et al., 2010; Golle et al., 2012). Para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação de uma dada espécie, é necessário primeiro estabelecê-la *in vitro*. No entanto, as exigências requeridas em condições *in vitro* variam muito entre as espécies.

A introdução das culturas *in vitro* é sempre uma etapa complexa da micropropagação (Alfenas et al., 2009), especialmente para espécies nativas e lenhosas que apresentam certa dificuldade em decorrência principalmente da oxidação e da contaminação (Sato et al., 2001). A oxidação de substâncias fenólicas provoca o escurecimento do meio de cultura e a morte do explante, sendo um fenômeno que afeta a aplicação prática da cultura de tecidos (Cassells & Curry, 2001; Ahmad et al., 2013).

O estabelecimento da cultura *in vitro* inicia-se com a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adequada às condições *in vitro*, sendo que a condição da planta matriz, a descontaminação e o manejo dos explantes iniciais são os principais aspectos a serem considerados (Oliveira et al., 2013; Xavier et al., 2013). Esta fase é a mais crítica para a maioria das plantas lenhosas, pois se soma às dificuldades de resposta do propágulo vegetativo as altas taxas de contaminação apresentadas (Xavier et al., 2013).

Porém, mesmo com toda importância e ampla utilização do gênero *Eremanthus*, há carência de metodologias eficientes para propagação vegetativa das plantas. Assim, estudos relacionados à produção de mudas

são importantes, tendo em vista um melhor planejamento de futuros programas de melhoramento genético e conservação, sendo a técnica de micropropagação uma das alternativas possíveis.

Neste sentido este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de hipoclorito de sódio e fungicida na descontaminação, e polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado no controle da oxidação de explantes introduzidos de *E. incanus*.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no viveiro do Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF) e Laboratório de Melhoramento Florestal, do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, em Diamantina, MG, entre maio de 2013 e dezembro de 2014.

As fontes dos propágulos utilizados nos experimentos foram mudas de candeia, com cerca de dois anos de idade, produzidas via seminal em viveiro, em tubetes de 180 cm³, e mantidas em casa de vegetação sobre bandejas contendo água para molhamento apenas no substrato. Para a indução e crescimento de brotações, efetuou-se a poda do ápice caulinar das mudas. Os explantes utilizados tinham entre 1 e 2 cm, retirados a partir das brotações emitidas, sendo desfolhadas e mantidas as gemas axilares.

O meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) com 50% dos sais e vitaminas, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 15 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 0,5 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) foi utilizado como meio básico. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,80 ± 0,02, antes da inclusão do ágar, e foi autoclavado por 15 min à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm e resfriado antes da inoculação do material vegetal.

Após inoculação em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio de cultura e vedados com tampas plásticas, os explantes foram transferidos para a sala de cultura com temperatura de 25 ± 2 °C, onde permaneceram no escuro por um período inicial de sete dias e, logo após, transferidos para condições de fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹.

Tempos de imersão em hipoclorito de sódio

Os explantes, retirados das mudas mantidas no viveiro, foram desinfestados superficialmente antes de serem inoculados em meio de cultura. Para tanto, fez-se a imersão em solução de fungicida composto por captana (1 g L^{-1}), durante 15 min. Em câmara de fluxo laminar realizou-se o enxágue em água deionizada e autoclavada, imersão em álcool 70% por 30 s e desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 5, 10, 15 e 20 min, sendo adicionadas quatro gotas de tween 20 para cada 100 mL de solução. As brotações foram novamente enxaguadas em água deionizada e autoclavada. Antes da inoculação, os explantes tiveram as extremidades dos segmentos nodais cortadas, visando remover o tecido danificado.

Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (tempos de imersão), quatro repetições e cinco explantes por repetição, com um explante por tubo de ensaio. Após 30 dias, foram avaliados os percentuais de contaminação e oxidação do material vegetal.

Uso de fungicida

Mudas de candeia mantidas sob as condições citadas anteriormente receberam aplicação de fungicida composto por carbendazim, na concentração de $0,5 \text{ mL L}^{-1}$. Após 7 e 15 dias da aplicação, explantes foram retirados e levados ao laboratório. Inicialmente, fez-se uma separação entre o material coletado, onde apenas a metade foi desinfestada com fungicida composto por oxicloreto de cobre (1 g L^{-1}), durante 15 min.

Em câmara de fluxo laminar, realizou-se o mesmo procedimento para todos os explantes: enxágue em água deionizada e autoclavada, imersão em álcool 70% por 30 s e desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 5 min, sendo adicionadas quatro gotas de tween 20 para cada 100 mL de solução. As brotações foram novamente enxaguadas em água deionizada e autoclavada. Os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio previamente preparado e autoclavado, sendo usado o meio básico.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2 , sendo o primeiro fator o tempo decorrido após a aplicação de fungicida nas mudas (7 e 15 dias) e o segundo fator a presença e a ausência da etapa de imersão das brotações em solução de fungicida em laboratório. Aos 30 dias foram registrados os percentuais de contaminação e oxidação do material vegetal.

Uso de PVP e carvão ativado

Os explantes, retirados a partir das mudas mantidas no viveiro, foram desinfestados superficialmente seguindo a metodologia citada no item “tempos de imersão em hipoclorito de sódio”, utilizando-se 5 min de imersão em solução de hipoclorito. Os segmentos foram inoculados no meio básico, alterando-se apenas o antioxidante.

Testou-se a presença de dois antioxidantes no meio de cultura, polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado, ambos nas concentrações 1 e 2 g L^{-1} . Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos, quatro repetições e cinco plantas por repetição, com um explante por tubo de ensaio. Aos 30 dias registrou-se o percentual de contaminação e de oxidação do material vegetal.

Análise de dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com o auxílio do software R versão 3.0.1 (R Core Team, 2013) utilizando os pacotes ExpDes.pt (Ferreira et al., 2014) e Stats (R Core Team, 2013).

Resultados

Os tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% não influenciaram a contaminação dos explantes aos 30 dias, e também não foi observada diferença significativa quando analisada a oxidação dos mesmos (Figura 1). Os coeficientes de variação para as variáveis contaminação e oxidação foram, respectivamente, 33% e 18%. O percentual médio de contaminação foi de 55%.

Apesar de a contaminação ter sido observada em todos os tratamentos, variando de 44% a 72%, a desinfestação dos explantes com hipoclorito a 2,5% foi satisfatória, pois permitiu obter propágulos assépticos. Embora não encontrada diferença estatística, o tempo de imersão 5 min pode ser destacado entre os demais, por demandar menor tempo no processo de desinfestação.

Observou-se efeito significativo do tempo decorrido após aplicação do fungicida nas plantas fornecedoras dos explantes sobre a contaminação do material introduzido (Tabela 1). Porém, não houve diferença significativa quanto ao uso de fungicida na desinfestação por meio de imersão de brotações em laboratório. Também não foi observada interação significativa entre os fatores testados.

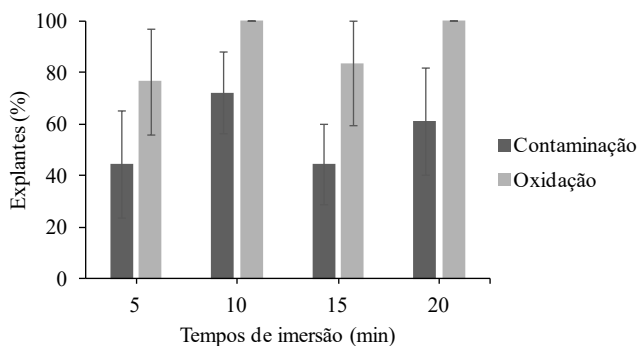


Figura 1. Médias percentuais de contaminação e oxidação dos explantes de *Eremanthus incanus* introduzidos, submetidos a diferentes tempos de desinfestação em hipoclorito de sódio a 2,5%. As barras de erro representam o desvio padrão.

Figure 1. Percentages of contamination and oxidation of introduced *Eremanthus incanus* explants submitted to different disinfection times in 2.5% sodium hypochlorite. The error bars represent the standard deviation.

Tabela 1. Médias e desvios padrões para as variáveis contaminação e oxidação observados com o uso de fungicidas antes e após a coleta de explantes de *Eremanthus incanus*.

Table 1. Averages and standard deviations for the variables contamination and oxidation observed with the use of fungicides before and after the collection of *Eremanthus incanus* explants.

| FV | Contaminação | Oxidação |
|-------|-------------------------|---------------------------|
| A | 45,0 ± 20,7 * | 85,0 ± 22,6 ^{ns} |
| B | 0,0 ± 0,0 ^{ns} | 95,0 ± 14,1 ^{ns} |
| CV(%) | 60,18 | 20,29 |

FV: Fonte de variação; CV: Coeficiente de variação; * Diferença significativa a 5% de significância; ns Diferença não significativa a 5% de significância; A: Dias após aplicação de fungicida nas plantas fornecedoras de explantes; B: Uso de fungicida em laboratório.

Observou-se ausência de contaminação quando a coleta foi realizada 15 dias após a aplicação de fungicida nas plantas fornecedoras de brotações, e 45% de contaminação quando se realizou a coleta 7 dias após aplicação. A oxidação dos explantes foi, em média, de 90% e não sofreu influência dos tratamentos testados.

O uso de fungicida para imersão de explantes, após sua coleta, antes da desinfestação em hipoclorito de sódio mostrou-se desnecessário. Ao retirar esta etapa do processo de desinfestação, não houve diminuição das taxas de contaminação e oxidação.

Os efeitos de polivinilpirrolidona (PVP) e carvão

ativado sobre a taxa de oxidação dos explantes não foram significativos. As altas taxas de oxidação observadas (Figura 2) indicam a ineficiência do uso de PVP e carvão ativado, nas concentrações utilizadas, para a inibição da oxidação do material vegetal.

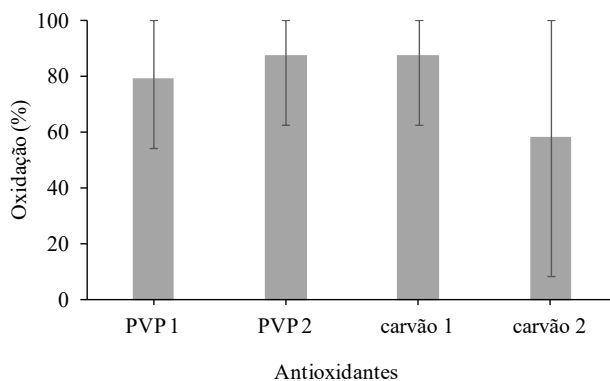


Figura 2. Percentuais médios de oxidação dos explantes de *Eremanthus incanus* introduzidos, em resposta aos antioxidantes polivinilpirrolidona (PVP) nas concentrações 1 (PVP 1) e 2 g L⁻¹ (PVP 2) e carvão ativado nas concentrações 1 (carvão 1) e 2 g L⁻¹ (carvão 2). Barras de erro indicam desvio padrão.

Figure 2. Percentages of oxidation of *Eremanthus incanus* explants introduced in response to poly vinyl pyrrolidone (PVP) antioxidants at concentrations 1 (PVP 1) and 2 g L⁻¹ (PVP 2) and activated charcoal at concentrations 1 (carvão 1) and 2 g L⁻¹ (carvão 2). The error bars represent the standard deviation.

Discussão

Os altos percentuais de contaminação observados (Figura 1) são justificados pela complexidade desta etapa, em razão da proliferação de bactérias e fungos difíceis de serem eliminados (Alfnas et al., 2009) e pelo fato das brotações coletadas terem ficado expostas às condições naturais, que são fontes de microrganismos (Xavier et al., 2013).

A esterilização de material vegetal introduzido in vitro é comumente realizada por meio da destruição química dos microrganismos, utilizando-se compostos esterilizantes como álcool, óxido de etileno, hipoclorito de sódio ou cálcio, peróxido de hidrogênio, fungicidas, dentre outras (Pasqual et al., 2010). Para o estabelecimento in vitro de mirtileiro, Pelizza et al. (2013) consideraram o uso

de solução de álcool 70% (por 1 min) ou hipoclorito de sódio 2% (por 10 min) como procedimentos adequados para desinfestação, observando baixa oxidação in vitro dos explantes. No trabalho desenvolvido por Costa et al. (2007), taxas de contaminação entre 33,7 a 50,6% foram obtidas ao utilizarem diferentes concentrações de hipoclorito e tempos de imersão durante o processo de estabelecimento in vitro de alecrim-pimenta. No entanto, Brondani et al. (2010) observaram altas taxas de contaminação na introdução de brotações de *Liquidambar styraciflua*, mesmo utilizando soluções desinfestantes, o que indicou, segundo os autores, necessidade de maior prudência no controle asséptico utilizado.

Apesar do uso de hipoclorito de sódio a 2,5% nos diferentes tempos de imersão proporcionar, em diferentes taxas, a descontaminação de explantes, as altas taxas de oxidação dos mesmos (variação entre 76,7 e 100%) impossibilitaram a continuidade das etapas do processo de micropropagação. Segundo Sato et al. (2001), alguns dos principais problemas no estabelecimento in vitro de espécies nativas são a oxidação e contaminação dos explantes. A imersão de explantes em soluções desinfestantes pode ocasionar injúrias e estresse que estimulam atividade de enzimas relacionadas à formação de compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2013).

A oxidação de substâncias fenólicas, encontradas em altas concentrações em algumas plantas, especialmente espécies tropicais, ocorre quando há injúria ou senescência do tecido isolado, que se torna escurecido e não consegue se desenvolver (George et al., 2008), sendo este um dos fenômenos que afetam a aplicação prática da cultura de tecidos vegetais na produção de mudas e na manipulação genética de plantas (Cassells & Curry, 2001).

Para controle da oxidação, algumas propostas já foram relatadas, como a lavagem do material em água corrente antes da desinfestação para lixiviação de compostos fenólicos (Sato et al., 2001), utilização dos antioxidantes ácido ascórbico, polivinilpirrolidona (PVP), carvão ativado, cisteína (Camolesi et al., 2007; Costa et al., 2007; Sartor et al., 2013), entre outros. Os explantes de candeia, no presente trabalho, não foram lavados em água corrente, mas foram cultivados em meio contendo antioxidantes. A lavagem prévia dos explantes e o uso de novos antioxidantes podem ser alternativas para o controle da oxidação, devendo ser testadas.

Alfenas et al. (2009) indicam, além do uso de antioxidantes, a incubação dos explantes no escuro por 5-7 dias. Segundo Termignoni (2005), plantas que tendem a oxidar devem ser mantidas no escuro, logo após a inoculação no meio de cultura, onde devem permanecer por uma semana antes de serem submetidas às condições de luz. Porém, no presente trabalho, a manutenção dos explantes em condição de escuro por sete dias não impediu sua oxidação.

Os resultados obtidos neste experimento indicam que o uso de PVP (0,8 g L⁻¹) no meio de cultura e a incubação no escuro por 7 dias são procedimentos insuficientes para controlar a oxidação fenólica para a espécie.

O estado fisiológico e fitossanitário da planta, cujos explantes são retirados, tem grande influência no posterior comportamento das culturas, sendo que a sanidade da planta mãe determinará a facilidade de desinfestar o explante durante o isolamento, pois, apesar de se realizar desinfestação dos explantes, diversos microrganismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfestantes e devem ser controlados na planta matriz (Xavier et al., 2013).

A diferença observada na contaminação dos explantes em resposta aos dias entre a aplicação de fungicida até a coleta das brotações pode ser devido ao tempo que decorre entre aplicação do fungicida sistêmico e a ação do mesmo na planta. Segundo o fabricante, o fungicida com ingrediente ativo carbendazim é um fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazóis com ação preventiva, curativa e erradicativa.

Sato et al. (2001) concluíram que o tratamento de ramos fornecedores de explantes com fungicida composto por benomil, de ação sistêmica, três dias antes da coleta, é importante para o estabelecimento in vitro de brotações de *Celtis* sp., pois possibilita a diminuição da contaminação. O tempo decorrido entre a aplicação e a coleta de explantes não é determinado pelo fabricante, devendo assim ser testado para cada situação. No presente trabalho, o tempo decorrido entre a aplicação do fungicida e a coleta de explantes de candeia foi fator importante para a obtenção de explantes livres de microrganismos in vitro.

As altas taxas de oxidação observadas no experimento não permitiram a continuidade do processo de micropropagação da espécie a partir de segmentos introduzidos, mostrando a necessidade de se desenvolver, uma metodologia que permita o estabelecimento e

desenvolvimento da cultura de *Eremanthus incanus* in vitro.

A variabilidade genética existente entre as mudas fornecedoras de explantes podem justificar os altos valores dos coeficientes de variação observados, já que estas foram obtidas via seminal. Outro fator que pode ter contribuído é a existência de possíveis diferenças nas condições fisiológicas dos explantes. Segundo Werner et al. (2016), a variabilidade do material genético, uso de culturas não clonais, estágio fisiológico do doador do explante, tipo de explante, características do meio e condições de cultivo são alguns dos fatores que contribuem para altos coeficientes de variação em estudos de cultura de tecidos de plantas.

Tecidos recém-excisados de espécies lenhosas, principalmente as folhosas, tendem a secretar pigmentos escuros no meio de cultura, sobretudo polifenóis oxidados e taninos, em resposta ao ferimento sofrido (Xavier et al., 2013). Fagundes et al. (2017), estudando a adição de carvão ativado ao meio de cultivo de framboeseira, observaram correlação negativa entre oxidação e sobrevivência, o que, segundo os autores, evidenciou que o incremento de oxidação entre os explantes acarreta em redução do percentual de sobrevivência dos mesmos. Para a candeia, o escurecimento do meio de cultura, provavelmente devido à liberação de compostos fenólicos, promove a necrose do material vegetal introduzido. A lixiviação de compostos fenólicos dos explantes de espécies lenhosas para o meio de cultura é o que provoca seu escurecimento, provocando a morte do explante e a impossibilidade de regeneração in vitro (Ahmad et al., 2013).

Tratamentos com PVP e cultivo de explantes em meios de cultura suplementado com elemento adsorvente (carvão ativado) e antioxidante (ácido ascórbico, cisteína e nitrato de prata) são alguns dos métodos indicados para o controle da oxidação, especialmente em espécies lenhosas (Ahmad et al., 2013). Para *Eremanthus incanus* alguns destes aditivos também foram relatados como importantes na fase de multiplicação da espécie (Miranda et al., 2018).

Algumas substâncias com características antioxidantes têm sido adicionadas ao meio de cultura, por auxiliarem a adaptação e melhor desenvolvimento das brotações, aumentando as taxas de sobrevivência, como o ácido ascórbico, cisteína e ácido cítrico (Concepción et al., 2005; Paiva et al., 2007; Anicezio, 2012).

Concepción et al. (2005) concluíram que, para a introdução de brotações de *Psidium guajava*, o antioxidante mais adequado foi o PVP, pois permitiu menores taxas de oxidação quando comparado ao ácido ascórbico+ácido cítrico e à L-cisteína. No entanto, Sartor et al. (2013), observaram que o uso de PVP como antioxidante para o jacarandá da Bahia proporcionou maior oxidação dos explantes.

Para a candeia, a oxidação representou um entrave para o estabelecimento de uma metodologia de micropropagação a partir de material introduzido in vitro, já que as elevadas taxas de oxidação impossibilitaram a continuidade do processo.

Conclusões

A desinfestação de brotações com hipoclorito de sódio a 2,5% por 5 min, a aplicação de fungicida sistêmico nas plantas fornecedoras de brotações e a coleta das brotações após 15 dias, são procedimentos indicados para a obtenção de segmentos assépticos na introdução in vitro de *Eremanthus incanus*.

Os antioxidantes polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado não foram eficientes no controle da oxidação de explantes introduzidos de candeia, sendo importante o estudo de outras metodologias para o controle mais eficaz na oxidação fenólica da espécie.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- Ahmad, I. et al. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013. <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.ajeas.2013.13.04.1975>.
- Alfnas, A. C. et al. *Clonagem e doenças de eucalipto*. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 500 p.
- Anicezio, L. C. Efeito de antioxidantes e descontaminantes no estabelecimento de explantes de bananeira (*Musa spp*) in vitro. *Uniciências*, v. 16, n. 1, p. 9-16, 2012. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-5141.2012v16n1p%25p>.

- Araújo, E. J. G. de et al. Sustainable management of *Eremanthus erythropappus* in Minas Gerais, Brazil: a review. **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 3, e20160516, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.051616>.
- Bassan, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006. <http://dx.doi.org/10.5902/198050981919>.
- Borges, S. R. et al. Estabelecimento in vitro de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012. <http://dx.doi.org/10.5902/198050986626>.
- Brondani, G. E. et al. Desinfestação e meio de cultura para o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. **Floresta**, v. 40, n. 3, p. 541-554, 2010. <http://dx.doi.org/10.5380/RF.V40I3.18916>.
- Camolesi, M. R. et al. Redução da oxidação na propagação in vitro da bananeira 'maçã'. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000400044>.
- Cassells, A. C. & Curry, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 145-147, 2001. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010692104861>.
- Concepción, O. et al. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo in vitro de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.): relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. **Cultivos Tropicales**, v. 26, n. 2, p. 145-157, 2005.
- Costa, A. S. da et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 68-72, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362007000100013>.
- Davide, A. C. & Melo, L. A. Produção de mudas de candeia. In: Scolforo, J. R. S. et al. **O manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Lavras: Ed. da UFLA, 2012. p. 43-60.
- Fagundes, C. de M. et al. Carvão ativado no estabelecimento in vitro de cultivares de framboeseira. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 4, p. 406-413, 2017. <http://dx.doi.org/10.5965/223811711642017406>
- Ferreira, E. B. et al. ExpDes: an R Package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952-2958, 2014. <http://dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280>
- George, E. F. et al. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 5001 p.
- Golle, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento in vitro de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012. <http://dx.doi.org/10.5902/198050985092>.
- Jardim, L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração in vitro de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672010000200005>.
- Loeuille, B. *Eremanthus*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, [2014]. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5316>>. Acesso em: 8 dez. 2014.
- Miranda, N. A. et al. Antioxidants, sucrose and agar in the in vitro multiplication of *Eremanthus incanus*. **Floresta**, v. 48, n. 3, p. 311-320, 2018. <http://dx.doi.org/10.5380/RF.V48.I3.51365>.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Oliveira, L. S. de. et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013. <http://dx.doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>.
- Paiva, P. D. de. O. et al. Controle de oxidação no cultivo in vitro de embriões de estrelícia (*Strelitzia reginae*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, n. 2, p. 107-112, 2007. <http://dx.doi.org/10.14295/rbho.v13i2.213>.
- Pasqual, M. et al. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: Scherwinski-Pereira, J. E. **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 61-161.
- Pelizza, T. R. et al. Estabelecimento in vitro de mirtilheiro: cultivares Bluecrop, Duke e Misty. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 9, n. 1-2, p. 17-23, 2013.
- R Core Team. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>> Acesso em: 21 Jul. 2013.
- Sartor, F. R. et al. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento in vitro do jacarandá da bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.
- Sato, A. Y. et al. Micropropagação de *Celtis sp*: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-23, 2001.
- Schuch, M. W. et al. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar Climax. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000300017>.
- Scolforo, J. R. S. et al. Caracterização da candeia. In: Scolforo, J. R. S. et al. **O manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Lavras: Ed. da UFLA, 2012. p. 19-27.
- Taiz, L. & Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- Termignoni, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2005. 182 p.
- Xavier, A. et al. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.
- Werner, E. T. et al. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 8, n. 1-2, p. 27-36, 2016.