

Germinação *in vitro* de sementes de *Hippeastrum hybridum*

Resumo

Aline Machado Rodrigues¹
Tereza Cristina de Carvalho²
Ricardo Antônio Ayub³

Pertencente à família *Amaryllidaceae*, a *Amarílis*, como é popularmente chamada, apresenta valor diferenciado no mercado de flores. Seus bulbos são produzidos principalmente para exportação, girando capital para o Brasil. No entanto, o transporte destas estruturas requer mais cuidado e espaço, além da maior dificuldade de manter a alta qualidade sanitária por meio da macropropagação. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *Amarílis*, com e sem tegumento, nos meios de cultura Murashigue e Skoog e Wood Plant Medium. Para tanto, as sementes foram analisadas quanto a germinação, e por meio dos testes de comprimento da maior raiz e da folha, a massa fresca e o número de folhas. O experimento foi avaliado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo dois fatores avaliados, a condição da semente (com e sem tegumento) e os meios de cultivo (MS/2 e WPM), com cinco repetições cada. Por meio dos resultados obtidos verificou-se que, o meio de cultivo com formulação Wood Plant Medium proporcionou a melhor germinação. Já para o desenvolvimento das plantas os melhores resultados foram obtidos em meio Murashigue e Skoog.

Palavras chave: *Amarílis*, meios de cultura, planta ornamental.

In vitro germination of *Hippeastrum hybridum*

Abstract

Belonging to the family *Amaryllidaceae*, the *Amaryllis*, as it is popularly called, presents different value in the flower market. Its bulbs are mainly produced for export, turning capital to Brazil. However, transportation of these structures requires more care and space, besides the greater difficulty of maintaining high sanitary quality through macropropagation. In this way, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* germination of *Amarílis* seeds, with and without integument, in the Murashigue and Skoog and Wood Plant Medium media. For this, the seeds were analyzed for germination, and through the tests of length of the largest root and leaf, fresh mass and number of leaves. The experiment was evaluated in a completely randomized design, in a factorial scheme, with two factors being evaluated, the condition of the seed (with and without tegument) and the culture media (MS / 2 and WPM), with five replicates each. By means of the obtained results it was verified that, the culture medium with Wood Plant Medium formulation provided the best germination. For the development of the plants, the best results were obtained in Murashigue and Skoog medium.

Keywords: *Amaryllis*, culture medium, ornamental plant.

Germinación *in vitro* de semillas de *Hippeastrum hybridum*

Resumen

Pertenciente a la familia *Amaryllidaceae*, *Amarílis*, como se le llama popularmente, presenta un valor diferente en el mercado de las flores. Sus bombillas se producen principalmente para la exportación, convirtiendo capital en Brasil. Sin embargo, el transporte de estas estructuras requiere más cuidado y espacio, además de la mayor dificultad de mantener una alta calidad sanitaria a través de la macropropagación. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la germinación *in vitro* de semillas de *Amaryllis*, con y sin tegumento, en los medios de cultivo Murashigue y Skoog y Wood Plant Medium. Para eso, las semillas fueron analizadas para la germinación, y a través de las pruebas de longitud de la raíz y la hoja más grandes,

1 - Eng. Agrônoma. Departamento de Fitotecnia e Fitopatologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa. Email: alineamr@hotmail.com

2 - Engenheira agrônoma pela Universidade Federal do Paraná - UFPR, Mestre em Fitotecnia e Doutora em Produção vegetal. Email: tcscarva@gmail.com

3 - Eng. Agrônomo, Prof. Doutor. Departamento de Fitotecnia e Fitopatologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas. Email: rayub@uepg.br

la masa fresca y el número de hojas. El experimento se evaluó en un diseño completamente al azar, en un esquema factorial, con dos factores evaluados, la condición de la semilla (con y sin tegumento) y los medios de cultivo (MS / 2 y WPM), con cinco repeticiones cada uno. A través de los resultados obtenidos se verificó que el medio de cultivo con formulación Wood Plant Medium proporcionó la mejor germinación. En cuanto al desarrollo de plantas, los mejores resultados se obtuvieron en Murashigue y Skoog.

Palabras clave: Amarilís, medios de cultivo, plantas ornamentales.

Introdução

A Amarilís (*Hippeastrum hybridum*) pertence à família Amaryllidaceae que compreende cerca de 80 espécies de flores, cujas formas exóticas e variedades de tamanhos e cores impressionam (ILCZUK et al., 2005). As flores desta espécie apresentam valor ornamental, como flor de corte, para cultivo em vasos, podendo ser utilizada também para jardinagem e paisagismo (LORENZI e SOUZA, 1999) ou para fins medicinais e aromatizantes (MEEROW et al., 2000).

Espécies do gênero *Hippeastrum* propagam-se principalmente de forma assexuada, por meio de bulbo (AMARAL, 2007). O bulbo da Amarilís é um importante produto do ramo da floricultura no comércio mundial, girando capital de exportação e importação principalmente para o Brasil (TOMBOLATO et al., 2006). Em 2017, o setor de floricultura movimentou R\$ 6,9 bilhões, com um crescimento de pouco mais de 6% em relação ao ano anterior, sustentando um desempenho econômico favorável (JUNQUEIRA e PEETZ 2018). Do ponto de vista do mercado internacional, a floricultura empresarial brasileira vem se especializando na multiplicação de material de propagação, que são exportados em quantidades significativas. Nesse contexto, destaca-se a Amarilís, em que grande parte de sua produção é destinada à exportação e ao consumo doméstico (TOMBOLATO et al., 2013; JUNQUEIRA e PEETZ, 2018).

A propagação assexuada ou vegetativa adotada normalmente para a Amarilís é vantajosa, considerando a fidelidade genética dos novos indivíduos. Porém apresenta como limitações o tempo necessário para o processo de propagação e a qualidade fitossanitária das plantas; principalmente em relação à incidência de vírus, que é um dos principais problemas para o desenvolvimento desse setor no Brasil (AMARAL, 2005; AMARAL, 2007).

A micropropagação de *Hippeastrum puniceum* para definir, a regeneração dos bulbos *in vitro* com o uso

de citocinina (AMARAL, 2007) e a propagação *in vitro* dos bulbos de *Hippeastrum hybridum* (SULTANA et al., 2010; AMARAL, 2005; ILCZUK et al., 2005), foram relatados.

Embora existam vírus que sejam transmitidos por sementes a probabilidade de transmissão é relativamente baixa, já que isso depende da capacidade do patógeno invadir o embrião e, entre outros fatores, da disponibilidade do hospedeiro no momento da infecção (SALAS et al., 2010). Nesse sentido, a germinação de sementes tem sido utilizada como uma alternativa para redução da contaminação por vírus. Especialmente, por ser adotado condições assépticas, utilizando meios nutritivos, que fornecem as substâncias necessárias para que este processo ocorra (SOUZA e JUNGHANS, 2006); de forma a permitir um crescimento e desenvolvimento das plântulas de forma rápida e sadia.

Levando em conta, a crescente expansão do mercado de plantas ornamentais no Brasil e a necessidade de se produzir mais e com maior qualidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação *in vitro* de sementes de Amarilís, com e sem tegumento, nos meios de cultura Murashigue e Skoog e Wood Plant Medium.

Materiais e métodos

As sementes de Amarilís para o estudo foram obtidas de produtor de mudas da região dos Campos Gerais, Paraná. Para realização do teste de germinação *in vitro*, as sementes foram esterilização por meio da imersão em álcool 70% durante 20 segundos; seguido de imersão, sob agitação, em hipoclorito 2% e mais duas gotas de Tween 20 por 10 minutos; seguidos de três lavagens em água autoclavada com 0,033g L⁻¹ de cisteína.

Após a assepsia das sementes, foram instalados os tratamentos estabelecidos na pesquisa, à saber: sementes de Amarilís sem tegumento e com tegumento, cultivadas em dois meios de cultura, meio MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) e meio WPM - Wood Plant Medium (LLOYD e MCCOWN,

1981), com cinco repetições cada. Em cada placa de Petri semeou-se cinco sementes, sendo que cada repetição foi composta por cinco placas de Petri.

Para o preparo dos meios de cultura, adotaram-se os seguintes procedimentos: MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) com 50% da concentração de sais minerais e vitaminas (MS/2), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 0,1 g L⁻¹ de mio inositol e pH ajustado para 5,8 e WPM - Wood Plant Medium (LLOYD e MCCOWN, 1981) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 0,1 g L⁻¹ de mio inositol e pH ajustado para 5,2.

As sementes, nas placas de Petri, foram incubadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 °C e umidade controlada. Foi avaliada a porcentagem de germinação aos 30 e 60 dias após a semeadura, por meio da contagem de plântulas normais em cada tratamento; sendo os resultados expressos por meio da média de plântulas normais encontradas em cada repetição. As plantas obtidas aos 60 dias após a semeadura, foram avaliadas quanto aos seguintes critérios: comprimento da maior raiz (cm), de acordo com adaptação da metodologia descrita por Nakagawa (1999), comprimento da maior folha (cm), massa fresca das plântulas (g), de acordo com metodologia de Nakagawa (1999) e número de folhas por planta, sendo os resultados expressos por meio da média de folhas obtidas entre as plantas avaliadas de cada repetição.

O delineamento experimental usado foi inteiramente aleatorizado, em esquema fatorial 2x2 (duas condições de sementes - presença e ausência de tegumento e dois meios de cultura - MS/2 e WPM), com cinco repetições. Os dados obtidos foram avaliados através de análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (ESTAT, 1992).

Resultados e discussão

Aos 30 dias, as avaliações realizadas, demonstraram que não houve interação entre os meios de cultura utilizados para a germinação de sementes de *Amarílis* (Tabela 1). Já para as sementes sem tegumento, verificou-se uma maior porcentagem de germinação, de 90% (Tabela 1); em comparação as sementes com tegumento, em que a germinação foi de 28%.

Para que a germinação ocorra de forma adequada, é fundamental que a semente não esteja dormente e que os principais fatores envolvidos no processo de germinação, como disponibilidade de

água, temperatura e oxigênio, estejam em condições favoráveis a espécie (MARCOS-FILHO, 2015; TAIZ e ZEIGER, 2013; KERBAUY, 2008). Um dos fatores que pode interferir na germinação das sementes, pode ser seu revestimento. O tegumento por exemplo, pode conter agentes inibidores da germinação ou atuarem como barreira física que dificulta a embebição de água pelas sementes ou bloquear as trocas gasosas (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; MARCOS-FILHO, 2015). Nesse caso, por mais que a semente seja viável, ocorre redução na porcentagem de germinação das mesmas.

Tabela 1. Porcentagem de germinação in vitro das sementes de *Amarílis* com e sem o tegumento, aos 30 dias para os meios de cultura WPM e MS/2.

Tratamento	Médias	Tratamento	Médias
WPM	65% A	Sem tegumento	90% A
MS/2	53% A	Com tegumento	28% B

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey, $P \leq 0,05$.

Como a germinação das sementes de *Amarílis* ocorreu aos 30 dias após a semeadura (Tabela 1), verifica-se que é possível conduzir o teste de germinação até este período, especialmente para sementes sem tegumento. O término desta avaliação, está de acordo com o recomendado por Brasil (2009), que indica a contagem final de plântulas no teste de germinação para a espécie botânica *Hippeastrum hybrids* aos 28 dias após a semeadura.

Aos 60 dias após a semeadura fez-se uma nova avaliação da germinação das sementes de *Amarílis* (Tabela 2), no qual verificou-se que houve interação significativa entre os meios de cultura e as condições de semente. Pelos resultados obtidos (Tabela 2), as sementes sem tegumento, independentemente do meio de cultivo, foi a melhor condição para alcançar as melhores porcentagens de germinação. Assim, foi possível distinguir a eficiência dos meios de cultivo para o crescimento das plantas, de forma que a formulação WPM, proporcionou 100% da germinação destas sementes, se diferindo estatisticamente das sementes germinadas em meio MS/2, que germinaram 80% (Tabela 2). Apesar do meio MS/2 ter proporcionado a melhor porcentagem de germinação para sementes com tegumento (60%), seus resultados estão abaixo dos obtidos no meio de cultura WPM, quando se trabalha com sementes sem o tegumento (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de germinação *in vitro* das sementes de Amarílis com e sem o tegumento, aos 60 dias para os meios de cultura WPM e MS/2.

Condição das sementes \ Meio de Cultura	MS/2	WPM
Sem tegumento	80% Ab	100% Aa
Com tegumento	60% Ba	35% Bb

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey, $P \leq 0,05$.

Diversos fatores podem influenciar a germinação de sementes. Em mangabeira, por exemplo, houve melhor germinação com a remoção do tegumento, usando o meio nutritivo MS/2, em relação ao uso de água de coco e água destilada (PINHEIRO et al., 2001). Em trabalho que avaliou a germinação *in vitro* de

sementes de calêndula, os melhores resultados foram obtidos com o meio MS/2 (COSTA e AYUB, 2001).

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados da massa fresca, do número de folhas e o comprimento da maior folha das plantas de Amarílis aos 60 dias após a semeadura. Pelos resultados obtidos, verifica-se que, independentemente da presença ou ausência do tegumento, o meio de cultura MS/2, comparando-se ao meio de cultura WPM (Tabela 3), proporcionou as melhores condições nutricionais para o desenvolvimento das plantas. Tais resultados são indicativos que o meio de cultura MS/2 supre melhor a demanda metabólica das plantas jovens de Amarílis (até os 60 dias), fornecendo condições básicas para o desenvolvimento vegetal.

Tabela 3. Dados médios de massa fresca (g), número de folhas e comprimento da maior folha de plantas de Amarílis, oriundas de sementes cultivadas *in vitro*, com e sem o tegumento, aos 60 dias de cultivo nos meios de cultura WPM e MS/2.

Meio de cultura	Massa fresca (g)	Número de folhas	Comprimento da maior folha (cm)
MS/2	0,6745 A	1,7183 A	6,0576 A
WPM	0,3086 B	0,8500 B	2,5646 B
Condição das sementes	Massa fresca	Número de folhas	Comprimento da maior folha
Sem tegumento	0,4479 A	1,2350 A	4,5319 A
Com tegumento	0,5352 A	1,3333 A	4,0904 A

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey, $P \leq 0,05$.

Aos 60 dias de cultivo de Amarílis (Tabela 3), não há diferenças significativas de ganho de massa fresca, número de folhas ou comprimento da maior folha para plantas oriundas de sementes com a presença ou ausência de tegumento. No entanto, vale ressaltar que a ausência de tegumento (Tabelas 1 e 2) proporcionam as melhores porcentagens de germinação das sementes, o que é um fator interessante ao produtor de mudas desta espécie. Pois ao produzir mudas por meio de semente, altas taxas de produção são alcançadas no meio de cultura WPM.

Quando se trabalha com obtenção de plantas por micropropagação, faz parte da rotina a substituição dos meios de cultivo a medida que as plântulas vão crescendo até formarem as plantas. Durante este processo de substituição dos meios, é interessante a germinação ocorrer num meio WPM, por proporcionar a melhor germinação (Tabelas 2 e 3), e após este período, haver a substituição do meio

de cultivo para aquele que proporcione as condições nutricionais mais adequadas as necessidades da planta, o qual seria o meio MS/2 (Tabela 3).

Em estudos com a germinação *in vitro* de sementes de orquídea epífita testando-se diferentes meios de cultura, Silva et al. (2017), verificaram que aos 60 dias de cultivo, o meio Knudson C modificado, em comparação aos meios MS e MS ½, proporcionou condições que favoreceu o aumento do número de folhas e brotações bem como o tamanho da parte aérea.

Aos 60 dias após a semeadura, fez-se a avaliação do comprimento da maior raiz (Tabela 4), no qual verificou-se interação entre os fatores. Observa-se, que para as sementes sem tegumento, os dois meios de cultivo, MS/2 e WPM, podem ser utilizados para a germinação *in vitro*, pois não diferiram entre si. Para as sementes com tegumento, o meio de cultivo MS/2 proporcionou o maior comprimento de raiz (Tabela 4).

Tabela 4. Dados médios do comprimento da maior raiz (cm) de plantas de *Amarílis*, oriundas de sementes cultivadas *in vitro*, com e sem o tegumento, aos 60 dias de cultivo nos meios de cultura WPM e MS/2.

Condição das sementes \ Meio de Cultura	MS/2	WPM
Sem tegumento	5,5388 Ba	3,3100 Aa
Com tegumento	10,6825 Aa	2,4918 Ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si segundo o teste de Tukey, $P \leq 0,05$.

Quando se compara a presença ou ausência do tegumento em sementes de *Amarílis*, verifica-se que as sementes sem tegumento cultivadas em meio de cultivo MS/2, foram as que formaram a maior raiz (Tabela 4). Provavelmente este meio de cultura pode permitir uma condição nutricional e hormonal que favoreça o crescimento mais rápido da raiz. O fato da raiz crescer mais, pode estar relacionado também, a maior dificuldade de absorção de água pelas sementes com tegumento (Tabela 4), o que gera um maior estímulo ao crescimento radicular quando se compara as sementes sem o tegumento.

Entretanto, numa análise geral do benefício dos meios de cultivo ao crescimento da raiz (Tabela 4) e da parte aérea da planta (Tabela 3), o meio de cultivo MS/2 proporcionou os melhores resultados de crescimento da planta de *Amarílis*. Já Werner et al. (2017), verificaram que o meio WPM permitiu um melhor crescimento da parte aérea de crame, e os comprimentos das raízes foram significativamente maiores nos meios MS.

Nota-se que para o desenvolvimento das plântulas, o meio WPM obteve, em sua maioria, resultados inferiores ao MS/2, muito provavelmente devido ao baixo pH empregado neste meio. Trabalhos que visam à propagação *in vitro* de *Amarílis* utilizam meios de cultura com pH entre 5,7 e 5,9 (ILCZUK et al., 2005; SULTANA et al., 2010).

Existem trabalhos na literatura que estudaram o cultivo do bulbo de *Amarílis* por meio da micropropagação (SULTANA et al., 2010; TOMBOLATO et al., 2001). Entretanto, o cultivo *in vitro* de *Amarílis* por meio de sementes pode ser um diferencial, pela variabilidade genética que a semente ocasiona, e também por ser uma ferramenta que pode auxiliar na multiplicação massal desta espécie por pesquisadores e produtores. O cultivo *in vitro* das sementes também possui um diferencial que é a redução do desenvolvimento e disseminação de alguns fungos que causam a deterioração das sementes durante o período que estas permanecem na câmara de germinação (FERREIRA, 1989; NERY et al., 2008), especialmente em espécies que requerem um período maior de germinação das sementes. A redução da disseminação de patógenos no meio de cultivo ocorre especialmente pela adoção no meio de cultivo de produtos que inibem o desenvolvimento destes microrganismos patogênicos.

Conclusões

Para a germinação *in vitro* de sementes de *Amarílis*, é recomendada a utilização de sementes sem tegumento em meio WPM. Já para o desenvolvimento das plantas é indicado o meio MS/2.

Referências

- AMARAL, A. *Amaryllidaceae* Jaume St.-Hil.: levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil, e estudos de multiplicação *in vitro*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília. 115p. 2007.
- AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de *Amarílis***. Dissertação de mestrado. Instituto Agrônomo de Campinas. 93 p. 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária, MAPA/ACS, 2009.398p.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.
- COSTA, C.M.; AYUB, R.A. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Calendula officinalis* germinadas *in vitro* com substrato de algodão ou meio de MS. **Revista Ceres**, v.48, p.609-613.2001.
- ESTAT. **Sistema para análises estatísticas**. versão 2.0, Unesp – Jaboticabal. 1992.

- FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570 p.
- ILCZUC, A.; WINKELMANN, T.; RICHARTZ, S.; WITOMZKA, M.; SEREK, M. *In vitro* propagation of *Hippeastrum 3 chmielii* Chm. – influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, p. 339–346, 2005.
- JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Sustainability in Brazilian floriculture: introductory notes to a systemic approach. **Ornamental Horticulture**, v.24, n.2, p.155-162, 2018.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431p.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, **Kalmia latifolia**, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327. 1981.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas ornamentais no Brasil, arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2ª Ed. São Paulo, **Instituto Plantarum de plantas da flora**. 1999. 927 p.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 659p.
- MEEROW, A.W.; GUY, C.L.; LI, Q.B.; YANG, S.L. The New Phylogeny of the Amaryllidaceae. **Herbertia**, v. 54, p. 180-203. 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 437-496, 1962.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: Conceitos e Testes**. Londrina: ABRATES, cap. 2, p.1-24. 1999.
- NERY, M.C.; CARVALHO, M.L.M.; OLIVEIRA, L.M.; NERY, F.C.; SILVA, D.G. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (VAHL) NICH. **Cerne**, v.14, n.1, p.1-8, 2008.
- PINHEIRO, C.S.R.; MEDEIROS, D.N.; MACÊDO, E.C.; ALLOUFA, M.A.I. Germinação *in vitro* de mangabeira (**Hancornia speciosa** Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 413-416. 2001.
- SALAS, F.J.S.; CHAVES, A.L.R.; GONÇALVES, M.C.; EIRAS, M.; BARRADAS, M.M. Princípios de vírus em plantas. In: Scherwinski-Pereira, JE (Eds.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, EMBRAPA. p. 347-392. 2010.
- SILVA, C.S.; ARAÚJO, L.G.; SOUSA, K.C.I.; SILVA, D.M.; SIBOV, S.T.; FARIA, P.R. Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado. **Ornamental Horticulture**, v.23, n.1, p.96-100, 2017.
- SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2006. 152 p.
- SULTANA, J.; SULTANA, N.; SIDDIQUE, M. N. A.; ISLAM, A.K.M.A.; HOSSAIN, M.M.; HOSSAIN, T. *In vitro* bulb production in hippeastrum (*Hippeastrum hybridum*). **Journal Central European Agriculture**, v.11, n.4, p.469-474, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed Editora, 2013. 918p.
- TOMBOLATO, A.F.C. 'IAC Neblina': Nova cultivar de açucena para o Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 12, p. 67-70, 2006.
- TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S.; STANCATO. Geophyte research and production in Brazil. In: KAMENETSKY, R.; OKUBO, H. **Ornamental geophytes: from basic science to sustainable production**. Boca Raton, FL, EUA: CRC Press, p.435-448, 2013.
- TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M.; EGLIT, A.C. Micropropagação de *Hippeastrum hybridum* 'apple blossom', mediante escamas duplas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.7, n.1, p.35-40, 2001.
- WERNER, E.T.; GOMES JÚNIOR, R.G.; LUBER, J.; MALAQUIAS, J.O.S.; GONTIJO, A.B.P.L.; AMARAL, J.A.T. Germinação *in vitro* de *Crambe abyssinica* Hochst. **Nucleus**, v.14, n.1, p.153-164, 2017