

# MICROPROPAGAÇÃO DO ABACATEIRO 'OURO VERDE' A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS<sup>1</sup>

LUIZ ANTONIO BIASI<sup>2</sup>, OTTO CARLOS KOLLER<sup>3</sup> e ATELENE NORMANN KÄMPF<sup>4</sup>

**RESUMO** - Foram realizados diversos experimentos visando solucionar problemas de contaminação, oxidação e propagação na cultura "*in vitro*" do abacateiro 'Ouro Verde', a partir de segmentos nodais. Uma eficiente assepsia externa foi obtida pela imersão em álcool 70%, por um minuto, seguida de hipoclorito de sódio 1%, por dez minutos. A indução da brotação das gemas axilares dos segmentos nodais foi obtida pelo uso de 3 mg/l de BAP, sendo benéfica, nesta fase inicial de cultura, a redução, pela metade, da concentração de sais do meio MS para evitar a oxidação dos explantes. O enraizamento das brotações foi favorecido pela indução durante três dias num meio com 25 mg/l de AIB e transferência para outro meio mais diluído, isento de reguladores e adicionado de 1 g/l de carvão ativado, que proporcionou uma taxa de enraizamento de 45%.

Termos para indexação: cultura de tecidos, oxidação, contaminação, propagação.

## MICROPROPAGATION OF THE AVOCADO 'OURO VERDE' THROUGH CULTURE OF NODAL SEGMENTS

**ABSTRACT** - The present work was carried out in order to solve problems about contamination, oxidation and propagation in "*in vitro*" cultures of avocado 'Ouro Verde' nodal segments. The surface plant was sterilized with ethanol (70%) for 1 min followed by sodium hypochlorite (1%) for 10 min. The axillary buds growth was induced in growth medium supplemented by 3 mg/l of BAP. The explants oxidation was avoided by inorganic salts reduction at one-half strength in growth medium. The rate of 45% of rooting shoots occurred after three days of growth in a medium containing 25 mg/l of AIB and subsequently change to an auxin-free medium with salts diluted and 1 mg/l of activated charcoal.

Index terms: tissue culture, oxidation, contamination, propagation.

## INTRODUÇÃO

A micropropagação através da proliferação de ápices caulinares e gemas axilares é o processo mais utilizado para a multiplicação "*in vitro*" de plantas, por ser um método de propagação vegeta-

tiva que apresenta grande estabilidade genética (Amato, 1977; Krikorian, 1991).

Alguns trabalhos utilizando este processo já foram realizados com o abacateiro, visando principalmente a propagação vegetativa de porta-enxertos, necessária para a manutenção de características importantes como a resistência à salinidade e à podridão-de-raízes (Harty, 1985; Pliego-Alfaro et al., 1987; Pliego-Alfaro, 1988). No entanto, os resultados, apesar de promissores, ainda não permitem a utilização do processo em escala comercial.

Para a formação de novas partes aéreas, as gemas axilares são estimuladas a crescer através da quebra da dominância apical, principalmente pela aplicação de citocinina exógena (Nel et al., 1982; Schall, 1987).

Durante a fase de multiplicação podem ocorrer alguns problemas que reduzem a eficiência do processo, principalmente pela redução da taxa de

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 27 de janeiro de 1994.

Extraído da Dissertação de Mestrado apresentada à UFRGS para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia pelo primeiro autor. Trabalho financiado pela FAPERGS, CNPq e FINEP.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., M.Sc., Dep. Hortic., Esc. Sup. de Agric. Luiz de Queiroz/USP, Caixa Postal 9, CEP 13400-970 Piracicaba, SP.

<sup>3</sup> Eng. - Agr., Dr., Prof. - Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFRGS e Bolsista Pesquisador IA do CNPq. Fac. de Agron./UFRGS, Dep. de Hortic. e Silvíc., Caixa Postal 776, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS.

<sup>4</sup> Biol., Dra., Profa. - Adjunta da Fac. de Agron. da UFRGS e Bolsista do CNPq.

multiplicação (Nel et al., 1982). Assim, as sucessivas subculturas em meios com citocininas aumentam o número de brotações vitrificadas (Schall, 1987). Também são verificados problemas de necrose apical (Pliego-Alfaro et al., 1987) e pouca expansão foliar (Harty, 1985).

Outra fase crítica é o enraizamento das brotações. Nas espécies lenhosas, o enraizamento é mais difícil, e se agrava à medida que se utiliza material menos juvenil, uma vez que a capacidade de formação de raízes adventícias diminui ao aproximar-se da fase adulta da planta (Kadman, 1976; Huang et al., 1990).

Sucessivas subculturas podem rejuvenescer os tecidos, tornando a cultura mais reativa, num fenômeno chamado rejuvenescimento "*in vitro*", a partir do qual as culturas passam a apresentar resposta mais uniforme de crescimento e multiplicação (Grattapaglia & Machado, 1990).

A utilização de dois meios de cultura para a fase de enraizamento, sendo o primeiro rico em auxina para favorecer a indução; e o segundo, isento de reguladores de crescimento, para permitir a emergência e o crescimento das raízes, é outra forma de aumentar o enraizamento das brotações de abacateiro (Pliego-Alfaro et al., 1987; Pliego-Alfaro, 1988).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a propagação clonal, "*in vitro*", do abacateiro, visando solucionar principalmente os problemas de oxidação, contaminação e regeneração das novas plantas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, no período de julho de 1991 a maio de 1993.

Os explantes foram retirados de mudas de abacateiros 'Ouro Verde' mantidas em casa de vegetação, que foram podadas regularmente para a emissão de brotações novas, e pulverizadas freqüentemente com fungicidas sistêmicos.

Em todos os experimentos, o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), com pH 5,8, acrescido de 30 g/l de sacarose e solidificado com 7 g/l de ágar.

O AG3 (ácido giberélico), os antioxidantes (ácido ascórbico e ácido cítrico) e os antibióticos (ácido nalidíxico e cloranfenicol) foram esterilizados a frio, através de filtros de membrana ("millipore") com 0,45 µm de diâmetro e adicionados ao meio de cultura quando em processo de resfriamento. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 120°C e 1 atm, por quinze minutos.

Devido à elevada incidência de contaminação bacteriana ocorrida em experimentos anteriores, foi realizada a identificação do agente causal. A seguir, foi realizado um antibiograma com diversos antibióticos, dentre os quais foram escolhidos os mais eficientes (ácido nalidíxico e cloranfenicol), que passaram a ser utilizados na composição dos meios de cultura nos demais experimentos (Biasi, 1993).

### Experimentos de assepsia

Foram realizados dois experimentos com delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e dez frascos por parcela.

Após a coleta, as brotações permaneceram 30 minutos num recipiente com água corrente, sendo aplicados em seguida os tratamentos, que para o primeiro experimento foram as seguintes concentrações de hipoclorito de sódio (dez minutos): 0, 0,5, 1 e 1,5%. No outro experimento, foram combinadas a imersão em álcool 70% por um minuto, seguida, ou não, da imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por dez minutos.

Após a assepsia, os brotos foram lavados três vezes em água deionizada e autoclavada e divididos em segmentos nodais, sendo, então, isolados individualmente em frascos contendo meio MS, com a concentração dos sais reduzida à metade, 3 g/l de BAP (6-benzilaminopurina) e 50 mg/l de cloranfenicol.

Após quinze dias foi realizada a avaliação dos experimentos pela percentagem de contaminação fúngica.

### Experimentos de oxidação

Em ambos os experimentos a assepsia foi realizada pela imersão das brotações em álcool 70% por um minuto, e em hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos, seguida de três lavagens em água deionizada e autoclavada.

Os explantes foram colocados individualmente nos frascos, e os experimentos foram avaliados após 40 dias, classificando-se os explantes em três níveis de oxidação: 1) baixo: caule e gema verdes; 2) médio: caule escurecido e gema verde; 3) alto: caule e gema escurecidos.

Para realizar a análise estatística, os dados de percentagem foram transformados em  $\arcsin \sqrt{X/100}$ .

#### a. Influência de concentrações de sais do meio de cultura

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e cinco explantes por parcela.

Os tratamentos foram quatro concentrações dos sais do meio MS: 1/4MS, 1/2MS, 1/1MS e 2/1MS.

#### b. Influência de antioxidantes

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições em esquema fatorial (2x3), resultando em seis tratamentos com dez explantes por parcela.

Os tratamentos compreenderam a combinação de dois agentes antioxidantes – ácido ascórbico e ácido cítrico –, com três concentrações: 0, 100 e 200 mg/l.

O meio de cultura foi o MS adicionado de 50 mg/l de cloranfenicol.

### Experimentos de indução

Em ambos os experimentos, a concentração de sais do meio de cultura foi reduzida à metade.

#### a. Teste com BAP

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e cinco frascos por parcela. Cada frasco recebeu um explante.

Os tratamentos foram as seguintes concentrações de BAP: 0, 1,5, 3 e 4,5 mg/l.

O experimento foi avaliado após 45 dias.

#### b. Teste com AG3

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e dez frascos por parcela. Cada frasco recebeu um explante.

Os tratamentos foram as seguintes concentrações de AG3: 0, 1, 2 e 3 mg/l.

O meio de cultura foi acrescido de 50 mg/l de cloranfenicol e 3 mg/l de BAP, e o experimento foi avaliado após 43 dias. Para realizar a análise de variância, os dados de percentagem foram transformados em  $\arcsin \sqrt{X/100}$ .

### Experimentos de multiplicação

Foram instalados dois experimentos com delinea-

mento em blocos ao acaso, com quatro repetições e dez explantes por parcela. Em cada frasco foram colocadas cinco brotações. Cada experimento foi constituído pelas citocininas, BAP e cinetina, nas seguintes concentrações: 0, 1, 2, 3, e 4 mg/l.

O meio de cultura foi acrescido de 30 mg/l de ácido nalidixico e os experimentos foram avaliados após 40 dias.

### Experimento de enraizamento

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e dez explantes por parcela.

Brotações com 2 a 3 cm de comprimento foram colocadas em meio MS, com 25 mg/l de AIB e 30 mg/l de cloranfenicol por diferentes períodos de tempo, que constituíram os seguintes tratamentos: 0, 3, 6 e 9 dias.

Após este período, as brotações foram transferidas para frascos com meio MS com a concentração de sais reduzida à metade, isento de reguladores de crescimento e adicionado de 1 g/l de carvão ativado.

Após 50 dias foi realizada a avaliação do experimento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Assepsia

O aumento da concentração de hipoclorito de sódio promoveu uma redução da percentagem de contaminação fúngica dos segmentos nodais (Fig. 1).

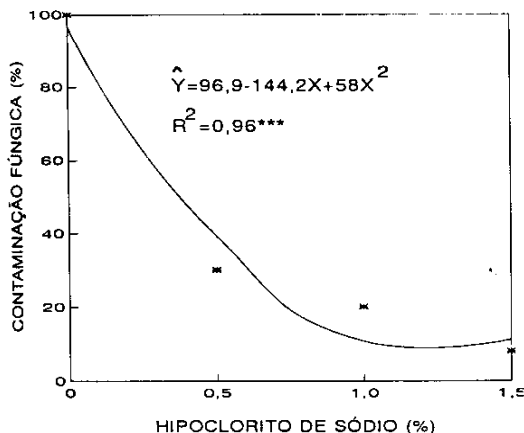


FIG. 1. Percentagem de segmentos nodais do abacateiro 'Ouro Verde' contaminados por fungos após tratamento com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

As concentrações de 0,5 e 1% de hipoclorito de sódio também foram utilizadas por Harty (1985), Nel et al. (1982), Pliego-Alfaro et al. (1987) e Schroeder (1980) em abacateiro.

O baixo índice de contaminação ocorrido com o uso de 1 a 1,5% de hipoclorito de sódio revelou que não havia necessidade de utilizar soluções mais concentradas, as quais poderiam causar danos aos explantes.

O uso do álcool e do hipoclorito, sozinhos ou combinados, promoveram uma redução significativa da contaminação fúngica dos explantes. Os tratamentos com hipoclorito de sódio, e deste, combinado com álcool, foram superiores ao uso apenas do álcool, e não diferiram entre si (Tabela 1).

### Oxidação

Os meios de cultura com concentração de sais reduzida foram superiores aos demais, apresentando as maiores percentagens de explante no nível baixo de oxidação e ausência de explantes no nível alto (Tabela 2). Werner & Boe (1980) também encontraram menores índices de oxidação na cultura "in vitro" do porta-enxerto de macieira 'M 7' utilizando meio de cultura mais diluído.

Quanto ao uso de antioxidantes, não foi verificada interação entre eles e as concentrações utilizadas, em relação aos três níveis de oxidação de segmentos nodais. O ácido cítrico apresentou maior percentagem de explantes no nível baixo do que o ácido ascórbico, sendo que, quanto aos dois

**TABELA 1. Percentagem de segmentos nodais do abacateiro 'Ouro Verde' contaminados por fungos após tratamento com álcool e hipoclorito de sódio.**

Tratamentos	Explantes contaminados (%)
Testemunha	100,0 a
Álcool 70%	57,5 b
Hipoclorito de sódio 1%	10,2 c
Álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%	5,7 c

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

C.V. (%) = 27,8

antioxidantes, ambas as concentrações utilizadas (100 e 200 mg/l) foram superiores à testemunha e não diferiram entre si (Tabela 3).

No nível alto, o comportamento dos antioxidantes foi semelhante; mas para ambos, o uso de 100 mg/l foi superior à testemunha (Tabela 3).

Resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho et al. (1990) com segmentos nodais de *Eucalyptus grandis*, e por Siqueira & Inoue (1991) na cultura "in vitro" de coqueiro.

**TABELA 2. Percentagem de segmentos nodais do abacateiro 'Ouro Verde' em três níveis de oxidação: baixo (caule e gema verdes), médio (caule escurecido e gema verde), alto (caule e gema escurecidos) de acordo com a concentração do meio de cultura.**

Tratamentos	Níveis de oxidação		
	Baixo	Médio	Alto
¼ MS	91,9 a	8,1 b	0 b
½ MS	68,3 a	31,7 ab	0 b
MS	24,7 b	68,6 a	6,6 b
2 MS	0 b	66,0 a	34,0 a
C.V. (%)	55,3	58,6	83,1

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

**TABELA 3. Percentagem de segmentos nodais do abacateiro 'Ouro Verde' em três níveis de oxidação: baixo (caule e gema verdes); médio (caule escurecido e gema verde); alto (caule e gema escurecidos) em meio com diferentes concentrações de ácido ascórbico e cítrico.**

Antioxidante	Nível baixo	Nível médio	Nível alto
Ác. ascórbico	38,2 b	34,7 a	27,0 a
Ác. cítrico	49,3 a	33,4 a	17,6 a
Concentração (mg/l)			
0	26,3 b	39,4 a	34,1 a
100	55,2 a	33,1 a	11,9 b
200	49,7 a	29,6 a	20,9 b
C.V. (%)	15,7	22,3	44,0

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

A adição de antioxidantes ao meio de cultura não é vantajosa, pois melhores efeitos foram alcançados pela simples diminuição da concentração de sais do meio de cultura.

### Indução

A adição de BAP ao meio de cultura até 2,7 mg/l promoveu um aumento na percentagem de brotação das gemas axilares dos segmentos nodais, a partir do qual passou a diminuir (Fig. 2). Resultados semelhantes, com o abacateiro 'Fuerte', foram obtidos por Schall (1987). Este efeito é característico das citocininas, promotoras da quebra da dominância apical e estimuladoras do crescimento das gemas laterais (Grattapaglia & Machado, 1990).

O comprimento das brotações, de modo semelhante à percentagem de gemas brotadas, aumentou com a concentração de BAP até o valor de 2,3 mg/l, quando passou a sofrer uma redução (Fig. 2).

Por sua vez, o uso de AG3 não estimulou o crescimento das brotações, demonstrando, ao contrário, uma tendência prejudicial nas doses mais altas (Tabela 4). Estes resultados discordam do trabalho de Young (1983) com o abacateiro 'Lula', no qual o alongamento das gemas axilares foi promovido pelo uso de 1 mg/l de AG3.

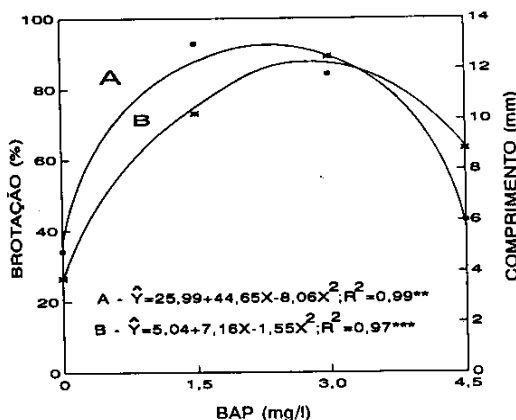


FIG. 2. Percentagem de gemas axilares brotadas (A) e comprimento das brotações (B) do abacateiro 'Ouro Verde', em meios de cultura com diferentes concentrações de BAP.

Além disso, a adição de AG3 ao meio de cultura aumentou significativamente a percentagem de brotações anormais, com folhas alongadas, retorcidas, cloróticas, quebradiças, pouco expandidas e de fácil abscisão, que na sua ausência não ocorriam (Tabela 4).

### Multiplicação

Ambas as citocininas exerceram efeito semelhante sobre a multiplicação de brotações, que aumentou linearmente com o aumento de sua concentração até atingir os valores máximos de 2,7 brotações em relação à cinetina, e 2,4 para o BAP (Fig. 3). Solorzano-Vega (1989), usando 2 mg/l de BAP e AG3, obteve três e quatro brotações, respectivamente para a cultivar Colin-V-33 e uma seleção da raça antilhana. Já Pliego-Alfaro et al. (1987) conseguiram uma taxa de multiplicação de  $2 \pm 0,6$  para o porta-enxerto de abacateiro 'GA-13', utilizando 1 mg/l de BAP e  $2,2 \pm 0,4$  para o 'IV-8' com 0,65 mg/l de BAP.

Com o porta-enxerto 'Duke-7' e usando 10 mg/l de cinetina, Harty (1985) obteve 6,1 brotos por explante, após nove semanas de cultura. Entretanto, este autor utilizou explantes juvenis, provenientes de plântulas, que são muito mais

TABELA 4. Percentagem de gemas brotadas, tamanho das brotações e percentagem de brotações anormais de segmentos nodais do abacateiro 'Ouro Verde' em meio com diferentes concentrações de AG3.

AG3 (mg/l)	Brotação (%)	Tamanho (mm)	Brotações anormais (%)
0	100 <sup>1</sup>	10,3 <sup>1</sup>	0 b <sup>2</sup>
1	100	10,6	26,7 a
2	100	9,2	49,2 a
3	97,5	8,6	23,9 a
C.V. (%)			
	2,8	31,0	41,2

<sup>1</sup> Médias não diferem significativamente pelo teste F a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

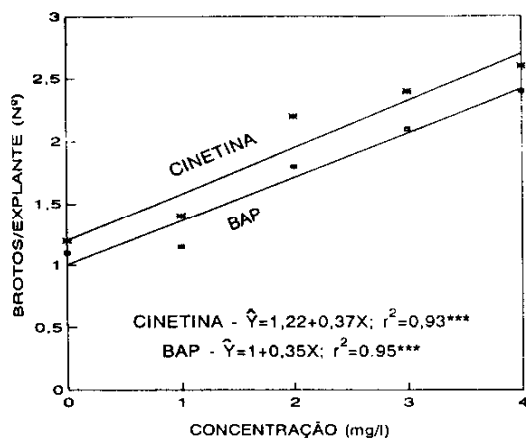


FIG. 3. Número de brotações do abacateiro 'Ouro Verde' emitidas por explante em meio de cultura com diferentes concentrações de BAP e cinetina.

reativas do que tecidos adultos (Huang et al., 1990).

Apesar do efeito benéfico das citocininas, no aumento da taxa de multiplicação das brotações, houve um incremento da vitrificação que atingiu 63 e 55% das brotações cultivadas em meio com 4 mg/l de cinetina e BAP, respectivamente (Fig. 4). Este problema também foi observado por Schall (1987) na micropropagação do abacateiro 'Fuerte', usando 10 mg/l de BAP. Por outro lado, com apenas 5 mg/l de BAP, a taxa de multiplicação foi menor, mas com brotações da boa qualidade e crescimento.

A vitrificação é um distúrbio fisiológico que provoca a perda da capacidade de propagação e dificuldades na aclimação das plantas afetadas (Fiorino & Loreti, 1987), por isso ela deve ser evitada.

Neste trabalho com o abacateiro 'Ouro Verde', a expansão foliar foi muito pequena, em todas as concentrações de reguladores de crescimento utilizadas. Este fato também foi observado por Harty (1985), no abacateiro 'Duke-7'. Entretanto, ele estimulou o crescimento do limbo foliar, adicionado ao meio de cultura a L-glutamina e a L-arginina, ambas na concentração de 40 mg/l.

A dificuldade de multiplicação e o reduzido crescimento das brotações podem estar associados

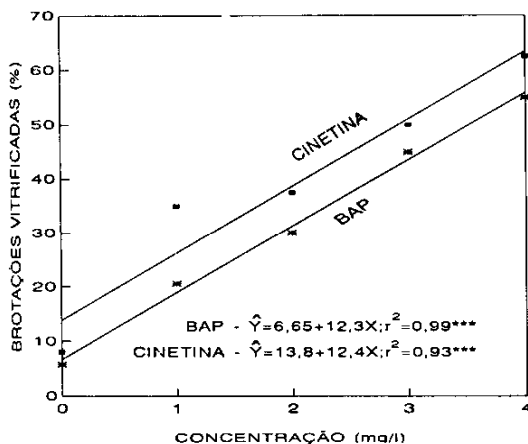


FIG. 4. Porcentagem de brotações vitrificadas do abacateiro 'Ouro Verde' em meio de cultura com diferentes concentrações de BAP e cinetina.

com o meio de cultura, pois Harty (1985) observou que o meio de cultura MS foi tóxico para o abacateiro 'Duke-7', pois os explantes tornavam-se necróticos e morriam antes de completar uma semana de isolamento. O referido autor apenas obteve melhores resultados utilizando o meio de cultura sugerido por Dixon & Fuller (1976), que também foi utilizado por Mooney & Staden (1987) na embriogênese somática em explantes dos abacateiros 'Fuerte' e 'Duke-7'.

A cultura em meio com antibiótico pode ter contribuído também para a redução do crescimento das brotações. Entretanto, os poucos explantes descontaminados, cultivados em meio sem antibiótico, também emitiram poucas brotações e apresentaram os mesmos problemas.

### Enraizamento

O aumento do tempo de permanência dos explantes no meio com 25 mg/l de AIB, até 3,5 dias, proporcionou um incremento na taxa de enraizamento, a partir do qual houve um decréscimo acentuado (Fig. 5). Resultados semelhantes foram obtidos por Pliego-Alfaro (1988) na micropropagação do abacateiro 'Topa-Topa', cuja permanência por três dias num meio com 100 mg/l de

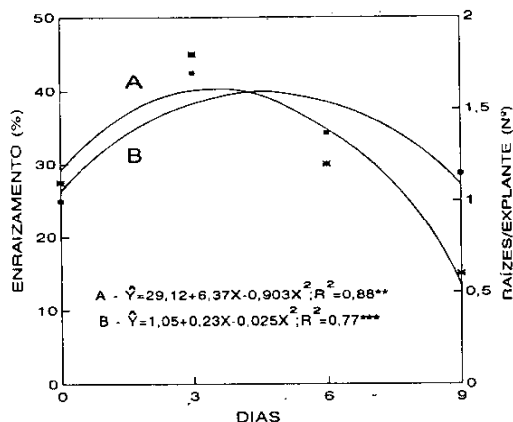


FIG. 5. Percentagem de brotações enraizadas (A) e número médio de raízes por explante (B) do abacateiro 'Ouro Verde', após a permanência por diferentes períodos de tempo em meio de cultura com 25 mg/l de AIB.

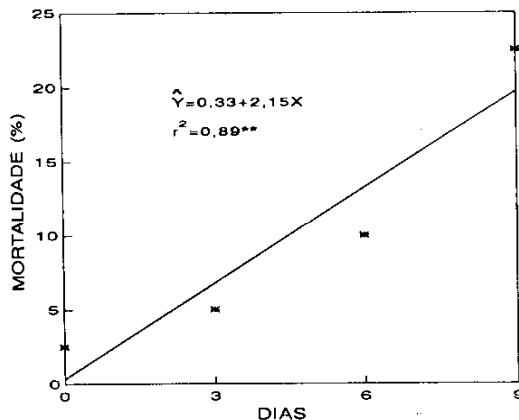


FIG. 6. Mortalidade das brotações do abacateiro 'Ouro Verde', após a permanência por diferentes períodos de tempo em meio de cultura com 25 mg/l de AIB.

AIB e transferência para outro isento de reguladores e adicionado de 1 g/l de carvão ativado, resultou em 100% das brotações enraizadas, superior ao tratamento com AIB durante 12 dias e à testemunha. Ele também verificou que poderia obter resultados semelhantes utilizando concentrações menores de AIB, sendo que a de 25 mg/l foi a mais eficiente.

Esta técnica também foi utilizada por Pliego-Alfaro et al. (1987) com explantes adultos de dois porta-enxertos de abacateiro, 'GA-13' e 'IV-8', nos quais obteve 5 e 30% de enraizamento, respectivamente. Mas, neste caso, o meio de indução possuía apenas 1 mg/l de AIB.

Os resultados destes trabalhos confirmam requerimentos diferenciados de auxina nas fases da rizogênese, pois enquanto a indução depende da presença de auxina, o crescimento e alongamento das raízes pode ser inibido pela sua presença (Debergh & Maene, 1981; Grattapaglia & Machado, 1990).

Pode-se verificar, na Fig. 5, que o aumento do tempo de permanência no meio indutor com AIB até quatro dias contribuiu para o aumento do número de raízes emitidas por explante. Entretanto, o aumento do período de indução com AIB aumentou a mortalidade das brotações, chegando próximo de 20% após nove dias (Fig. 6). Isto pode

ter ocorrido pelo fato de a concentração de AIB utilizada ter sido muito alta, prejudicando a sobrevivência dos explantes cultivados por maior período.

## CONCLUSÕES

1. Uma eficiente assepsia externa dos explantes pode ser obtida pela imersão em álcool 70% por um minuto, seguida de hipoclorito de sódio 1% por dez minutos.

2. A adição de 3 mg/l de BAP ao meio de cultura é uma forma de induzir a brotação das gemas axilares dos segmentos nodais.

3. Na fase inicial de cultura, a oxidação dos explantes pode ser controlada reduzindo-se em 50% a concentração de sais do meio de cultura MS.

4. Para melhorar o enraizamento das brotações, elas devem permanecer aproximadamente durante três dias num meio com 25 mg/l de AIB e depois ser transferidas para outro meio isento de reguladores de crescimento e adicionado de 1 g/l de carvão ativado.

## REFERÊNCIAS

AMATO, F.d'. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ,

- Y.P.S., (Eds.). **Plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.343-357.
- BIASI, L.A. **Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' através da cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de discos foliares**. Porto Alegre: UFRGS, 1993. 163f. Dissertação de Mestrado.
- CARVALHO, D. dc; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. **Uso de fungicida e antioxidantes em cultura "in vitro" de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden**. *Ciência e Prática*, Lavras, v.14, n.1, p.97-106, 1990.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.T. **A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture**. *Scientia Horticulturæ*, Amsterdam, v.14, p.335-345, 1981.
- DIXON, R.A.; FULLER, K.W. **Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L.** *Physiological Plant Pathology*, v.9, p.299-312, 1976.
- FIORINO, P.; LORETI, F. **Propagation of fruit trees by tissue culture in Italy**. *HortScience*, Alexandria, v.22, n.3, p.353-358, 1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.
- HARTY, P.A. **Propagation of avocados by tissue culture: development of a culture medium for multiplication of shoots**. *South African Avocado Grower's Association Yearbook*, v.8, p.70-71, 1985.
- HUANG, L.; CHIU, D.; MURASHIGE, T.; GUNDY, R. van; MAHDI, E.F.M.; NAGAI, K.; PLIEGO-ALFARO, F. **Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.251-264.
- KADMAN, A. **Effect of the age of juvenile stage avocado seedlings on the rooting capacity of their cuttings**. *California Avocado Society Yearbook*, Saticoy, v.59, p.58-60, 1976.
- KRIKORIAN, A.D. **Propagación clonal in vitro**. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A., (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.95-125.
- MOONEY, P.A.; STADEN, J. van. **Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana***. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.65, p.622-626, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NEL, D.D.; KOTZÉ, J.M.; SNYMAN, C.P. **In vitro propagation of *Persea indica***. *California Avocado Society Yearbook*, Saticoy, v.66, p.167-168, 1982.
- PLIEGO-ALFARO, F. **Development of an in-vitro rooting bioassay using juvenile-phase stem cuttings of *Persea americana* Mill.** *The Journal of Horticultural Science*, Ashford Kent, v.63, n.2, p.295-301, 1988.
- PLIEGO-ALFARO, F.; ENCINA, C.L.; BARCELO-MUÑOZ, A. **Propagation of avocado rootstocks by tissue culture**. *South African Avocado Grower's Association Yearbook*, v.10, p.36-39, 1987.
- SCHALL, S. **La multiplication de l'avocatier (*Persea americana* Mill. cv. Fuerte) par microbouturage in vitro**. *Fruits*, Paris, v.42, n.3, p.171-176, 1987.
- SCHROEDER, C.A. **Avocado tissue in vitro**. *California Avocado Society Yearbook*, Saticoy, v.64, p.139-141, 1980.
- SIQUEIRA, E.R. de; INOUE, M.T. **Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.26, n.7, p.949-953, 1991.
- SOLORZANO-VEGA, D.E. **Propagation in vitro of rootstocks of avocado**. *California Avocado Society Yearbook*, Saticoy, v.73, p.149-151, 1989.
- WERNER, E.M.; BOE, A.A. **In vitro propagation of malling 7 apple rootstocks**. *HortScience*, Alexandria, v.15, n.4, p.509-510, 1980.
- YOUNG, M.J. **Avocado callus and bud cultured**. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Tallahassee, v.96, p.181-182, 1983.