

**REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE LOURO-PARDO (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel)*****IN VITRO* REGENERATION OF LOURO-PARDO (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel)**Nilton César Mantovani<sup>1</sup> Elci Terezinha Henz Franco<sup>2</sup> Silvane Vestena<sup>3</sup>**RESUMO**

A regeneração *in vitro* foi desenvolvida para louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). Segmentos nodais foram desinfestados e inoculados em dois meios básicos de cultura: WPM (Wood Plant Médium, 1981) e MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementados com BAP (6-Benzilaminopurina), TDZ (Thidiazuron), ANA (Ácido-1-Naftaleno Acético), GA<sub>3</sub> (Ácido Giberélico), AIB (Ácido Indol-3-Butírico) e CA (Carvão Ativado) em diferentes combinações e concentrações para cada fase de desenvolvimento. As maiores taxas de multiplicação e alongamento de brotações foram obtidas com o meio WPM acrescido de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP e GA<sub>3</sub>. O melhor enraizamento das brotações foi obtido com AIB (0,5 mg.l<sup>-1</sup>) combinado ao Carvão Ativado (1,5 g.l<sup>-1</sup>) acrescidos ao meio de cultura.

**Palavras-chave:** *Cordia trichotoma*; regeneração *in vitro*; meio MS; meio WPM, reguladores de crescimento.

**ABSTRACT**

This study was carried out aiming at evaluating the *in vitro* regeneration of louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). Nodal segments were desinfested and innoculated in two basal media: WPM (Wood Plant Médium, 1981) and MS (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with BAP (6-Benzylaminopurine), TDZ (Thidiazuron), NAA (Naphthaleneacetic Acid), GA<sub>3</sub> (Gibberellic Acid), IBA (Indole-3-Butyric Acid) and A.C. (Activated Charcoal) in different combinations and concentrations for each developmental step. The regeneration rate and the shoot elongation were higher in the WPM medium containing 0,1 mg.l<sup>-1</sup> of BAP and GA<sub>3</sub>. The rooting of regenerated shoots was observed in IBA (0,5 mg.l<sup>-1</sup>) and Activated Charcoal (1,5 g.l<sup>-1</sup>).

**Key words:** *Cordia trichotoma*; *in vitro* regeneration; basal media MS; basal media WPM, regulators of growth.

1. Engenheiro Florestal, MSc. Professor do Departamento de Biologia, Universidade Regional Integrada, Rua Euclides Maragno, 88, Bairro Cerâmica, CEP 99700-000, Erechim (RS)
2. Bióloga, Dr<sup>a</sup>., Professora do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS). [elci@ccne.ufsm.br](mailto:elci@ccne.ufsm.br)
3. Bióloga, MSc., Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa (MG)

## INTRODUÇÃO

O louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vellozo Arrabida ex Steudel) é uma espécie florestal nativa no Rio Grande do Sul. Apresenta crescimento relativamente rápido, e a madeira adquire um interessante valor comercial pelas suas boas propriedades físicas e mecânicas. A propagação do louro-pardo dá-se naturalmente por sementes; mas essa forma de propagação apresenta certas restrições para a produção de mudas, basicamente, em consequência da variabilidade que a propagação sexuada confere aos novos descendentes, dificultando os plantios comerciais nos quais a homogeneidade é característica importante.

Muitas espécies lenhosas também têm sido propagadas vegetativamente por meio do enraizamento de estacas ou da enxertia. No entanto, as maiores dificuldades encontradas para a aplicação dessas técnicas se referem à rápida perda da capacidade morfogênica dos tecidos com o seu envelhecimento, dificultando, dessa forma, o processo de enraizamento (THORPE *et al.*, 1991).

Técnicas de propagação vegetativa *in vitro*, como a micropropagação, têm possibilitado a reprodução de espécies lenhosas recalcitrantes ao enraizamento, com inúmeras vantagens em relação às técnicas *ex vitro*. Um dos maiores benefícios da micropropagação bem como das outras técnicas de propagação assexuada, refere-se à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não-aditivos da variância genética por meio da propagação clonal, tornando-se uma ferramenta poderosa associada aos programas de melhoramento florestal para a propagação massal de genótipos superiores (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Além desta, a micropropagação possibilita a manipulação e propagação de plantas de forma contínua, independentemente da época do ano, e de forma mais rápida que os métodos convencionais de propagação vegetativa e, ainda, a possibilidade de obtenção e manutenção de estoques de plantas livres de doenças, e o intercâmbio de germoplasma (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990; THORPE *et al.*, 1991).

A micropropagação, segundo THORPE *et al.* (1991), pode ser manipulada por meio da embriogênese somática, proliferação de gemas axilares pré-formadas e mediante a indução e proliferação de gemas adventícias. Segundo BONGA (1985), por ser relativamente fácil na sua manipulação, principalmente por causa do tamanho do explante utilizado, e por originar plantas em geral geneticamente mais estáveis, provavelmente por não passar pela fase de calos, a proliferação de gemas axilares é a técnica mais utilizada para a micropropagação de plantas lenhosas em larga escala. A utilização de segmentos nodais como explantes permite a regeneração de plantas pela indução de crescimento e proliferação de gemas vegetativas axilares pré-formadas.

Segmentos nodais foram também utilizados para a micropropagação de várias espécies, como *Maytenus ilicifolia* (FLORES *et al.*, 1998) e *Feijoa sellowiana* (DAL VESCO & GUERRA, 1999), para *Didymopanax morototoni* (MANTOVANI *et al.*, 1999; FRANCO, 2000). Tecidos jovens, como aqueles presentes em segmentos nodais, possuem um alto grau de atividade meristemática e, por isso, maior plasticidade *in vitro* (MURASHIGE & SKOOG, 1977). MANTOVANI *et al.* (1996), em testes preliminares, estabeleceram um protocolo regenerativo para *Cordia trichotoma* com base em segmentos nodais, em que aqueles explantes se mostraram mais responsáveis no meio de cultura MS acrescido de BAP e ANA.

A indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas em culturas de células, tecidos e órgãos *in vitro*, são dependentes de fatores externos, químicos e físicos, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais (VASIL, 1987), e também de fatores inerentes ao material vegetal, como fatores hereditários, estado fisiológico do explante e da planta que lhe deu origem (THORPE *et al.*, 1991). Dos fatores externos, pode-se destacar a utilização dos reguladores de crescimento como as citocininas que são indispensáveis à divisão celular, quebra da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias (PREECE, 1995); e as auxinas, outro grupo de reguladores de crescimento fundamentais na indução da divisão celular e diferenciação de raízes, muitas vezes utilizadas nas fases de multiplicação para favorecer o crescimento das culturas, como a caixeta (MANTOVANI & FRANCO, 1998). Destaca-se mais uma vez o trabalho clássico de SKOOG & MILLER (1957) sobre a importância do balanço entre citocininas e auxinas na determinação das respostas morfogênicas *in vitro*.

Os meios de cultura, segundo CALDAS *et al.* (1990), além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*. A grande variedade de meios de cultura que tem sido utilizada para a regeneração de espécies de diferentes gêneros foi relatada por THORPE *et al.* (1991) entre diversos outros pesquisadores. Alguns desses meios foram especificamente desenvolvidos para fornecer os requisitos particulares à espécie trabalhada, como o meio básico de cultura de MURASHIGE & SKOOG (MS, 1962), desenvolvido inicialmente para tecido medular de *Nicotiana tabacum*, e o Woody Plant Medium (WPM) elaborado por LLOYD & McCOWN (1981), para propagação de plantas lenhosas.

Neste trabalho, avaliou-se um procedimento básico para o estabelecimento do cultivo *in vitro* e micropropagação do Louro-pardo (*Cordia trichotoma*) valendo-se de segmentos nodais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia (Centro de Ciências Naturais e Exatas) da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Utilizou-se como explantes segmentos nodais com, aproximadamente, 2 cm de comprimento, excisados de plantas de *Cordia trichotoma* com seis meses de idade produzidas com base em sementes, e mantidas em ambiente de casa de vegetação. O controle fitossanitário e nutricional foi feito por meio de pulverizações semanais de solução contendo fungicidas sistêmico e de contato e, quinzenalmente, mediante regas com solução nutritiva ouro-verde.

Para a desinfestação, os segmentos nodais permaneceram em recipiente com água corrente por 30 minutos e, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em soluções de álcool 70% durante 30 segundos e hipoclorito de sódio (10%, pH 6,5) durante 5 minutos e, posteriormente, lavados em água destilada e autoclavada.

Testou-se os meios de cultura WPM (Wood Plant Medium, elaborados por LLOYD & MCCOWN, 1981) e MS (elaborado por MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescidos de sacarose (30 g.l<sup>-1</sup>), agar (5,8 g.l<sup>-1</sup>) e 6,0 g.l<sup>-1</sup> mais carvão ativado (1,5 g.l<sup>-1</sup>) para a fase de enraizamento das

brotações. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os meios de cultura foram suplementados com BAP (6-Benzilaminopurina), TDZ (Thidiazuron), ANA (Ácido-1- - Naftaleno Acético), GA<sub>3</sub> (Ácido Giberélico), AIB (Ácido Indol-3-Butírico) e CA (Carvão Ativado) em diferentes combinações e concentrações para cada fase de desenvolvimento.

As culturas foram mantidas em sala de incubação, por um período inicial de sete dias no escuro e, posteriormente, sob fotoperíodo de 16 horas sob intensidade luminosa de, aproximadamente, 2000 lux à temperatura de 25°C (±2°C).

O delineamento experimental utilizado, em todos os experimentos, foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento e 5 frascos por parcela, com 5 explantes por frasco. Os tratamentos aplicados são específicos para cada experimento. A comparação entre as médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Experimento 1 – Para a indução de crescimento de gemas axilares, testaram-se os meios básicos de cultura WPM e MS completo, na presença de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, e na ausência da citocinina. Após 30 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de gemas axilares induzidas e o comprimento médio das brotações.

Experimento 2 – Para a fase de multiplicação de brotações, foi testado o potencial indutivo das citocininas BAP e o TDZ na concentração de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> e em combinação com a auxina ANA e a giberelina GA<sub>3</sub> 0,1 mg.l<sup>-1</sup> acrescidos ao meio de cultura WPM. Utilizou-se brotações com, aproximadamente, 1,5 cm de comprimento provenientes da fase de indução sem reguladores de crescimento. A taxa de multiplicação e o crescimento das brotações foram avaliados após três subcultivos no mesmo meio de cultura (1 subcultivo a cada 30 dias).

Experimento 3 – Para avaliar a capacidade de enraizamento, escolheu-se as brotações com, aproximadamente, 2 cm de altura que foram inoculadas em meio WPM acrescido de AIB e ANA (0,5 mg.l<sup>-1</sup>) isoladamente e na presença de carvão ativado (1,5 g.l<sup>-1</sup>). Aos 30 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de brotações enraizadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução de crescimento de gemas axilares em segmentos nodais está demonstrada na Tabela 1. Após 30 dias de cultivo, o desenvolvimento de gemas axilares, formando brotações, e o comprimento destas foram influenciados pela composição do meio de cultura e também pela presença do BAP.

O meio WPM proporcionou um maior estímulo ao desenvolvimento das gemas axilares, tanto em número de brotações formadas (63,3 % de gemas induzidas desenvolveram brotações), quanto no comprimento destas (2,19 cm de comprimento em média), quando comparado ao meio MS. O meio WPM produziu melhores resultados do que o meio MS também para a micropropagação da caixeta (MANTOVANI *et al.* 1999). A baixa concentração iônica do meio WPM foi benéfica no processo de indução de gemas nos segmentos nodais dessas espécies. Por outro lado, nessa fase inicial de cultura, o BAP não favoreceu a emissão de brotações nem o comprimento destas.

DESCHAMPS (1993) observou que as brotações de sarandi apresentaram um maior desenvolvimento em meio WPM sem reguladores de crescimento, e que a adição de BAP foi responsável pela redução do número de folhas por explante e também pela redução do comprimento das brotações. Embora o BAP seja utilizado na maioria dos sistemas experimentais *in vitro*, verifica-se que as culturas apresentam diferentes sensibilidades a essa citocinina dependendo do meio de cultura utilizado e da fase de cultivo.

TABELA 1: Porcentagem de gemas axilares induzidas em segmentos nodais de louro-pardo (*Cordia trichotoma*), e comprimento médio das brotações, em função da composição do meio de cultura e do BAP (1,0 mg.l<sup>-1</sup>), após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Porcentagem de gemas axilares induzidas (%)	Comprimento médio das brotações (cm)
MS	39,7b	0,98bc
WPM	63,3a	2,19a
MS + BAP	20,3c	0,79c
WPM + BAP	58,6a	1,10b
CV (%)	13,8	11,5

Em que: MS = meio de cultura básico elaborado por MURASHIGE & SKOOG (1962); WPM = Wood Plant Medium, elaborado por Lloyd & McCown (1981); BAP = 6-Benzilaminopurina; CV = Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na comparação entre diferentes diluições do meio MS com o meio WPM acrescidos de diferentes reguladores de crescimento RAGHAVA *et al.* (1992), observaram que a composição e a concentração dos nutrientes no meio de cultura influenciaram no requerimento de diferentes concentrações de reguladores de crescimento para a mesma espécie. Segundo PREECE (1995), no meio MS completo foi necessário somente um quarto da concentração de TDZ para induzir o mesmo resultado que foi obtido com MS diluído à metade das suas concentrações de sais. Dessa forma, o meio nutritivo pode afetar a resposta do explante ao regulador de crescimento

Segmentos nodais originaram a formação de brotações múltiplas em resposta à presença dos reguladores de crescimento. O BAP, quando comparado ao TDZ, proporcionou uma maior taxa de multiplicação, ou seja, maior número de brotações formadas por explante, e também maior comprimento destas após três subcultivos (Tabela 2). A maior média de brotações (6,85) foi obtida com a adição de BAP na concentração de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> em combinação com o GA<sub>3</sub>.

Inicialmente, o TDZ proporcionou uma grande proliferação de brotações, porém ao longo da cultura essas brotações se apresentaram malformadas, com caules curtos e retorcidos e folhas atípicas. Resultados semelhantes foram encontrados por NANNETTI & PINTO (1995) na multiplicação de *Heliconia*. O thidiazuron é uma feniluréia com ação citocinínica de forte efeito fisiológico na micropropagação de espécies lenhosas podendo substituir o BAP, como demonstram BHAGWAT *et al.* (1996) em brotações múltiplas de *Manihot sculent*, e em *Feijoa sellowiana* por DAL VESCO & GUERRA (1999). Segundo ALVES *et al.* (1995), o TDZ é mais ativo na multiplicação que outras citocininas, por causa do aumento da atividade da enzima fosfatase ácida que promove a interconversão nucleotídeo-nucleosídeo da estrutura de citocininas endógenas,

tornando-as biologicamente mais ativas, e dessa forma, podendo tornar-se inibidor do crescimento, quando utilizado na mesma concentração de outras citocininas.

TABELA 2: Multiplicação de brotações de louro-pardo (*Cordia trichotoma*), e comprimento médio das brotações, em resposta a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, TDZ, ANA e GA<sub>3</sub>, após 90 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM.

Tratamentos (0,1 mg.l <sup>-1</sup> )	Taxa média de Multiplicação	Comprimento médio das brotações (cm)
BAP	5,30 B	1,45 b
BAP + ANA	2,20 C	0,98 c
BAP + GA <sub>3</sub>	6,85 A	2,18 a
TDZ	2,50 C	0,78 c
TDZ + ANA	2,00 C	0,65 c
TDZ + GA <sub>3</sub>	4,80 B	1,35 bc
CV (%)	11,60	24,18

Em que: WPM = Wood Plant Medium, elaborado por Lloyd & McCown (1981); BAP = 6-Benzilaminopurina; TDZ = Thidiazuron; ANA = Ácido-1-Naftaleno Acético; GA<sub>3</sub> = Ácido Giberélico; CV = Coeficiente de Variação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Após três subcultivos, a combinação de GA<sub>3</sub> com a citocinina BAP promoveu a melhor taxa de multiplicação (6,85 brotações formadas por explante) e também maior comprimento destas (2,18 cm). A presença de GA<sub>3</sub> no meio de cultura promoveu um melhor desenvolvimento dos eixos caulinares e das folhas o que tornou mais fácil a individualização, aproveitamento e contagem das brotações de louro-pardo. Segundo DEBERGH & READ (1991), as giberelinas têm ação no alongamento celular, provocando o alongamento dos eixos caulinares e a redução dos efeitos residuais das citocininas, também demonstrado no crescimento das plântulas de caixeta obtidas da embriogênese somática (FRANCO, 2000).

O ANA provocou excesso de calosidade inibindo a multiplicação e o desenvolvimento das brotações do louro-pardo. Resultados similares à ação calogênica do ANA também foram observados em goiabeira serrana por DAL VESCO & GUERRA (1999). A superioridade do BAP, isoladamente ou em combinação com o GA<sub>3</sub>, em relação ao TDZ e ao ANA, na multiplicação e qualidade das brotações, foram também registrados por MANTOVANI (1997) na regeneração *in vitro* de caixeta.

O AIB induziu melhores resultados de enraizamento, quando comparado com o ANA. A maior porcentagem de brotações de louro-pardo enraizadas (73%) foi obtida com a combinação de AIB e Carvão Ativado (Figura 1).

A presença do AIB no meio de cultura, quando comparado com outras auxinas, tem aumentado o índice de enraizamento em brotações de *Didymopanax morototoni* (MANTOVANI, 1997), e *Feijoa sellowiana* (DAL VESCO & GUERRA, 1999) e tem sido preferido para estimular o enraizamento de várias espécies. Por outro lado, o ANA no meio de cultura provocou excesso de calosidade na base das brotações, dificultando o enraizamento e desenvolvimento do sistema radicular. O Carvão Ativado favoreceu o enraizamento das brotações e o alongamento das raízes por

causa das suas propriedades de adsorção de substância tóxicas como os fenóis, reguladores de crescimento em excesso de que se acumulam no meio de cultura e também pela redução da incidência de luz na zona de crescimento ativo do sistema radicular (BONGA, 1985).

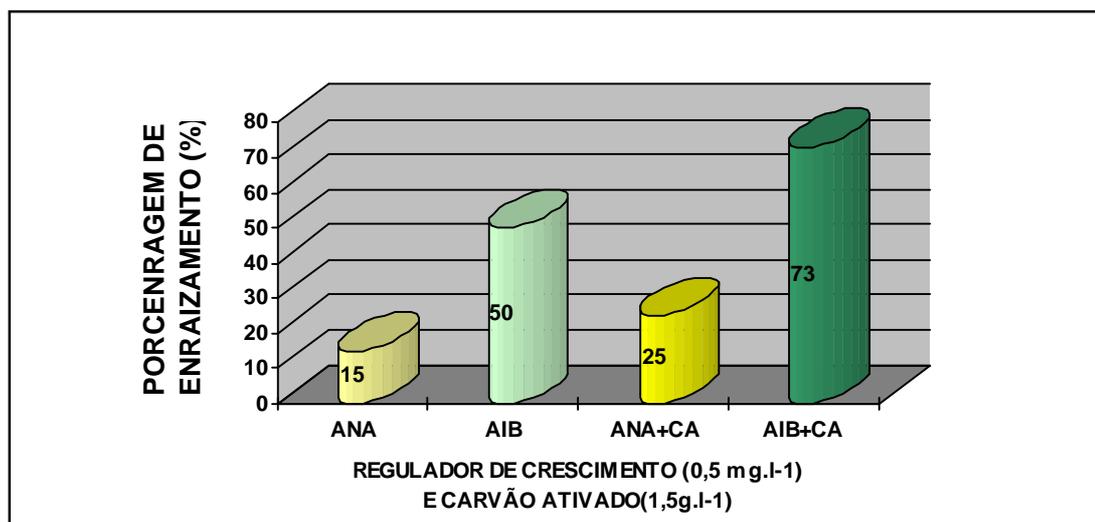


FIGURA 1: Porcentagem de enraizamento de brotações de louro-pardo (*Cordia trichotoma*), após tratamento com AIB (Ácido Indol-3-Butírico  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) e ANA (Ácido-1-Naftaleno Acético  $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) e CA (Carvão Ativado  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ ) aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

## CONCLUSÃO

O meio basal WPM, suplementado com BAP e  $\text{GA}_3$ , promoveu as melhores taxas de multiplicação e o alongamento das brotações, permitindo a regeneração *in vitro* de Louro-pardo;

A presença de ANA, combinada com TDZ ou BAP, produziu as menores taxas de multiplicação;

O enraizamento das brotações foi estimulado com a adição de AIB combinado com o Carvão Ativado, produzindo plantas completas;

Esses resultados indicam o sucesso do cultivo *in vitro* para o Louro-pardo, como uma forma alternativa de multiplicação e ainda com a possibilidade futura de incrementar o seu cultivo.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, aos bolsistas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, e à CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALVES, R. M. M.; LEMOS, G. B.; COSTA, M. P. *et al.* Efeitos do thidiazuron na atividade da fosfatase ácida durante a micropropagação da arnica (*Solidago microglosa*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais ...** Lavras, 1995. p. 196.
- BHAGWAT, B.; VIEIRA, L.G.E.; ERICKSON, L.R. Stimulation of in vitro shoot proliferation from nodal explants of Cassava by Thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n.46, p.1-7, 1996.
- BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M., DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 4-35.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 37-70.
- DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Organogênese e micropropagação de goiabeira serrana. **Rev. Bras. de Frutic.**, v. 21, p.60-64, 1999.
- DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 1-13.
- DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa in vitro de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), espécie florestal de mata ciliar**. Lavras: ESAL, 1993. 128p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1993.
- FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H. et al. Regeneração *in vitro* de Espinheira Santa (*Maytenus Illicifolia* Mart. **Revista Brasileira de Agrociência.**, Pelotas, v.4, n.3, p.201-205, set./dez., 1998
- FRANCO, E.T.H. **Embriogênese somática de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne et Planch**. Porto Alegre: UFRGS, 2000. 123p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-169.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Eastern Press, 1984. 709p.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v.30, p.421-327, 1981.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; ANGONESI, L. *et al.* Resultados preliminares da micropropagação de louro-pardo *Cordia trichotoma* (VELLOZO) ARRABIDA EX STEUDEL. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 470, 1996, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo, 1996. p. 445.
- MANTOVANI, N.C. **Estudo da regeneração in vitro de caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne et Planch)**. Santa Maria: UFSM, 1997. 106p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) -

Universidade Federal de Santa Maria, 1997.

- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, CEPEF, FATEC, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. **Bot. Bull. Academia Sinica**, v. 18, p.1-24, 1977.
- NANNETTI, D. C.; PINTO, J. E. B. P. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio e cálcio combinados com BAP e TDZ no desenvolvimento de *Heliconia* sp. *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995a, Lavras. **Anais ...** Lavras, 1995. p. 144.
- PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.1, n. 1, p.26-37, 1995.
- RAGHAVA SWAMY, B. V.; HIMABINDU, K.; LAKSHMI SITA, G. In vitro micropropagation of elite rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 126-131, 1992.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. **Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-130, 1957.
- THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.
- VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grap crops. **Journal of Plant Physiology**, Stultgart, v. 128, p. 193-218, 1987.