

ESTABELECIMENTO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE LOURO-PARDO
***IN VITRO* ESTABLISHMENT AND GROWTH OF LOURO-PARDO (*Cordia trichotoma*) SEEDLINGS**

Tiago Antonio Fick¹ Dilson Antônio Bisognin² Kenia Michele de Quadros³
Micheli Horbach⁴ Lia Rejane S. Reiniger⁵

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo de estabelecimento e quantificar o crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. Ex Steud.) oriundas de sementes, para a produção de explantes assépticos. Para o estabelecimento *in vitro*, estudou-se o efeito do tempo de embebição e de diferentes protocolos de desinfestação das sementes. A embebição fez-se em água destilada e autoclavada por 0, 24, 48, 72, 96 ou 120 horas. Para a desinfestação de sementes sem tegumento, testou-se a imersão em álcool etílico 70% por 30 segundos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% ou 5% por 0, 5, 10, 15 ou 20 minutos. Foram avaliadas as percentagens de desinfestação e germinação e o tempo médio de germinação. O crescimento de explantes de louro-pardo foi quantificado nos meios de cultura 1/2MS e WPM, através do número de folhas e raízes emitidas e do comprimento da parte aérea e da raiz primária aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. A embebição das sementes de louro-pardo por até 24 horas favoreceu a retirada do tegumento sem afetar a desinfestação e germinação. A retirada do tegumento e a imersão das sementes em solução de álcool etílico 70% por 30 segundos foram suficientes para a produção *in vitro* de plântulas assépticas. Plântulas de louro-pardo apresentaram melhor crescimento em meio de cultura WPM, sem a adição de reguladores de crescimento.

Palavras-chaves: *Cordia trichotoma*; cultura de tecidos; micropropagação.

ABSTRACT

The objectives of this work were to develop an *in vitro* establishment protocol and to quantify growth of louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arráb. Ex Steud.) seedlings to produce aseptic explants. Seed imbibition and disinfection were studied for *in vitro* seedling establishment. Seeds were imbibed in distilled and autoclaved water for 0, 24, 48, 72, 96 or 120 h. Seeds without tegument were submerged in a 70% alcohol solution for 30 s and in a hypochloride solution of 2% or 5% for 0, 5, 10, 15 or 20 min. Percentages of disinfection and germination and mean germination time were evaluated. Seedling growth of louro-pardo was quantified in 1/2MS and WPM culture mediums. Number of emerged leaves and roots and length of shoot and primary root were evaluated at 7, 14, 21 and 28 days after inoculation. Imbibition of louro-pardo seeds until 24 hours made easy tegument excision without affecting disinfection and germination. Seed-tegument excision and immersion in a 70% alcohol solution for 30 s were enough for an acceptable production of *in vitro* aseptic seedlings. Louro-pardo seedlings grow satisfactorily in a WPM culture medium without growth regulators.

Keywords: *Cordia trichotoma*, tissue culture; micropropagation.

1. Engenheiro Florestal, Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Campus, CEP 97.105-900, Santa Maria (RS). tafllorestal@yahoo.com.br
2. Engenheiro Agrônomo, PhD., Professor do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Campus, CEP 97.105-900, Santa Maria (RS). Pesquisador do CNPq. dilsonb@smail.ufsm.br
3. Acadêmica do Curso de Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Campus, CEP 97.105-900, Santa Maria (RS). kenia_m_quadros@yahoo.com.br
4. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Campus, CEP 97.105-900, Santa Maria (RS). micheliorbach@yahoo.com.br
5. Engenheira Agrônoma, Dr^a., Professora do Departamento de Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Campus, CEP 97.105-900, Santa Maria (RS). lia_reiniger@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 7/11/2005 e aceito em 29/08/2007.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por madeira vem aumentando a pressão sobre espécies florestais remanescentes. Os grandes plantios comerciais, constituídos essencialmente de espécies exóticas de rápido crescimento, têm grande importância na moderação da exploração e manutenção das espécies nativas (FERREIRA, 2000). Contudo, a produção de tais plantios não atende à demanda, especialmente da indústria de madeiras nobres, o que justifica investimentos em pesquisa e produção comercial de espécies nativas.

O louro-pardo (*Cordia trichotoma*) (Boraginaceae) é uma das espécies mais típicas e comuns nas florestas do Alto Uruguai, ocorrendo naturalmente do Rio Grande do Sul ao Ceará. É uma espécie bastante promissora para o emprego em reflorestamentos puros ou mistos (CARVALHO, 2003). A espécie apresenta florescimento entre os meses de fevereiro e abril e maturação dos frutos entre maio e julho. A semente possui dormência tegumentar e comportamento recalcitrante ao armazenamento, podendo perder a viabilidade já aos 60 dias. A germinação é do tipo epigea, geralmente irregular e com percentuais que variam entre 14% e 80% (CARVALHO, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2001). Devido à grande aceitabilidade da madeira no mercado, o louro-pardo tem sido muito explorado, o que vem reduzindo sua disponibilidade (REITZ *et al.*, 1988; LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003).

O louro-pardo apresenta alta variabilidade genética nos plantios existentes (CARVALHO, 2003). A seleção e multiplicação de indivíduos adultos de alta produtividade e qualidade é vantajosa para o melhoramento genético da espécie (BHOJWANI e RAZDAM, 1983). Entretanto, a propagação vegetativa de plantas selecionadas é dificultada pela baixa capacidade morfogenética dos tecidos (NOLETO e SILVEIRA, 2004). Assim, a cultura de tecidos constitui-se em uma alternativa para a propagação de plantas selecionadas, por proporcionar o rejuvenescimento dos tecidos adultos e facilitar a multiplicação massal (HANDA *et al.*, 2005; XAVIER, 2002; MANTOVANI e FRANCO, 1998). Além disso, a cultura de tecidos permite a propagação contínua, independente de fatores ambientais e inerentes às diferentes épocas do ano (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Devido à dificuldade de se estabelecer em laboratório indivíduos adultos, pesquisas em cultura de tecidos podem ser desenvolvidas com plântulas obtidas em condições assépticas, por meio de semeadura *in vitro* (NOLETO e SILVEIRA, 2004; ANDRADE *et al.*, 2000).

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo de estabelecimento e quantificar o crescimento *in vitro* de plântulas oriundas de sementes, para a produção de explantes assépticos de louro-pardo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos, pertencente ao Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria - RS, no período de setembro de 2005 a março de 2006. As sementes, coletadas no município de Cachoeira do Sul, RS, foram fornecidas pelo Banco de Sementes da Associação de Fumicultores do Brasil (AFUBRA). O lote de sementes foi recebido em agosto de 2005, com teor de umidade de 8,2%.

Para o estabelecimento *in vitro*, foram realizados experimentos de embebição e desinfestação das sementes. Nos experimentos de embebição, as sementes foram imersas em água destilada por 0, 24, 48, 72, 96 ou 120 horas e, posteriormente, em uma solução contendo 5% de hipoclorito de sódio (NaOCl) por 30 minutos. Após a retirada do tegumento, as sementes foram imersas em solução contendo 70% de álcool etílico e três gotas de tween 20 por 100 mL de solução durante 30 segundos e inoculadas em meio de cultura. Entre cada procedimento, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

No experimento de desinfestação, as sementes foram imersas em água destilada por 12 horas e, posteriormente, em uma solução contendo 5% de NaOCl por 30 minutos. Após a retirada do tegumento, as sementes foram imersas em solução contendo 70% de álcool etílico e três gotas de tween 20 por 100 mL de solução durante 30 segundos. As sementes sem tegumento foram então imersas em solução contendo 2% ou 5% de NaOCl por 0, 5, 10, 15 ou 20 minutos e inoculadas em meio de cultura. Entre cada procedimento, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Em ambos os experimentos, as sementes sem tegumento foram inoculadas em meio de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g L⁻¹ de agar e pH ajustado para 5,8. As unidades experimentais, frascos de 10 mL contendo 3 mL de meio de cultura e uma semente, foram expostas ao escuro

por sete dias, seguido de fotoperíodo de 16 horas, sob densidade média de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por lâmpadas fluorescentes brancas, na temperatura de $25^\circ \pm 3^\circ\text{C}$. Foram avaliadas as percentagens de desinfestação e germinação em intervalos de três dias durante um período de 30 dias após a inoculação, possibilitando o cálculo do tempo médio de germinação (TMG) através da fórmula: $TMG = \frac{\sum_{n+1}^n N_n T_n}{\sum_{n+1}^n N_n}$, onde N

é o número de sementes germinadas e T o tempo em dias (HARRINGTON, 1972). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições de cinco sementes.

O crescimento dos epicótilos *in vitro* foi quantificado em dois meios de cultivo. A parte aérea de plântulas com 30 dias após a inoculação das sementes foi transferida para o meio MS com metade da concentração de sais – 1/2MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) ou Woody Plant Medium - WPM (LLOYD e McCOWN, 1981), os quais foram acrescidos de 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da esterilização. Foram avaliados o número médio de folhas, número médio de raízes emitidas, comprimento da parte aérea e da raiz primária aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições de quatro explantes.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias, comparadas por regressão polinomial a 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A embebição prolongada das sementes de louro-pardo afetou a desinfestação, o percentual de germinação e o tempo médio de germinação *in vitro* (Figura 1). Os melhores resultados foram obtidos com 24 horas de embebição, com percentagens de desinfestação e germinação superiores a 85% e 77%, respectivamente, aos 30 dias após a inoculação. O tempo médio de germinação foi de 13 dias com 24 horas de embebição. A embebição facilitou a retirada do tegumento das sementes, em que estão concentrados os microorganismos que infectam as sementes. No entanto, a embebição por mais de 24 horas afetou negativamente a germinação e aumentou a contaminação, sendo que a embebição por 120 horas inibiu completamente a germinação até os 30 dias após a inoculação.

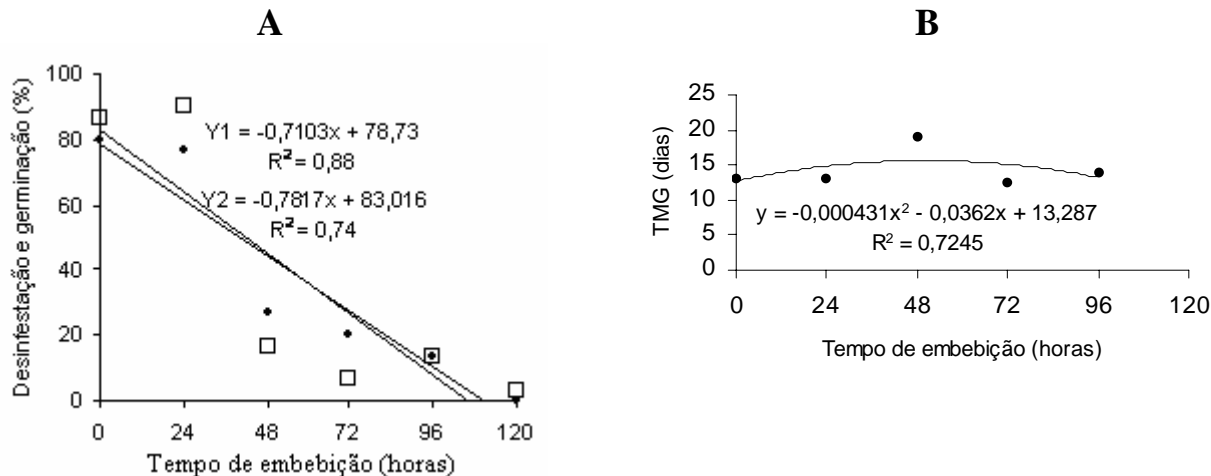


FIGURA 1: Percentagens de desinfestação (□ e y2) e germinação (□ e y1), aos 30 dias após a inoculação (A), e tempo médio de germinação (TMG) (B) de sementes de louro-pardo submetidas a diferentes tempos de embebição em água destilada antes da retirada do tegumento. Santa Maria, RS, 2006.

FIGURE 1: Percentage of disinfection (□ and y2) and germination (□ and y1) at 30 days after inoculation (A) and mean germination time (TMG) (B) of *Cordia trichotoma* seeds submitted to different times of imbibition in distilled water before tegument excision. Santa Maria, RS, 2006.

Os resultados deste trabalho concordam com os obtidos por Mendonça *et al.* (2001), que observaram percentagens de 75% em teste de germinação de sementes de louro-pardo. Neste experimento, foram observadas percentagens de germinação superiores (85 a 100%) com embebição de até 24 horas e retirada do

tegumento, o que indica alta qualidade fisiológica das sementes utilizadas. A maior contaminação observada em embebição prolongada deveu-se, provavelmente, ao aumento da permeabilidade das membranas, levando à perda de soluto e favorecendo a proliferação de contaminantes no meio de cultivo (BEWLEY e BLACK, 1994). A embebição de sementes de tamboril-da-mata (*Platymiscium pubescens*) em água por até 300 minutos aumentou proporcionalmente a percentagem de germinação (LIMA e BORGES *et al.*, 2002), o que não foi observado neste experimento.

Não se observou diferença significativa, pelo teste F, nas percentagens de desinfestação e germinação; tanto para tempo de imersão no hipoclorito de sódio quanto para a concentração da solução desinfetante (Tabela 1). A percentagem de desinfestação variou entre 90% a 100% e a de germinação de 85% a 100%. O tempo médio de germinação foi similar entre os diferentes tratamentos. Esses resultados mostram que a retirada do tegumento e a imersão das sementes em solução de álcool etílico 70% por 30 segundos foram suficientes para uma efetiva desinfestação, visando o estabelecimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo.

TABELA 1: Percentagens de desinfestação e germinação e tempo médio de germinação (TMG¹) de sementes de louro-pardo submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação. Santa Maria, RS, 2006.

TABLE 1: Percentage of disinfection and germination and mean germination time of *Cordia trichotoma* seeds submitted to different disinfection treatments. Santa Maria, RS, 2006.

Tempo de imersão (min.)	Desinfestação (%)	Germinação (%)	TMG ¹ (dias)
Solução de NaOCl a 2%			
0	95,0 a ²	90,0 a	20,0
5	90,0 a	100,0 a	20,0
10	95,0 a	100,0 a	20,9
15	100,0 a	95,0 a	20,0
20	95,0 a	95,0 a	19,6
Média	95,0	96,0	20,1
CV%	9,8	8,5	-
Solução de NaOCl a 5%			
0	95,0 a	90,0 a	20,0
5	95,0 a	100,0 a	19,6
10	95,0 a	100,0 a	20,1
15	100,0 a	85,0 a	20,1
20	90,0 a	85,0 a	21,4
Média	95,0	92,0	20,2
CV%	9,8	11,9	-

Em que: 1 = Tempo médio de germinação; 2 = Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F em 5% de probabilidade de erro.

Diversos tratamentos para desinfestação de sementes têm sido utilizados em espécies florestais. O tratamento de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium*) com NaOCl a 2% e água quente (95° C) promoveu uma assepsia de 95%, resultado também obtido quando foi utilizado somente água quente (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) tratadas com NaOCl a 10% por 10 minutos e álcool 70% por 40 segundos tiveram 100% de assepsia e germinação (MARTINS-CORDER e BORGES JUNIOR, 1999). Em mogno (*Swietenia macrophylla*) foi detectada interação entre a concentração de NaOCl e o tempo de imersão, porém não ocorreu diferença significativa entre os resultados obtidos com álcool 70% e NaOCl (COUTO *et al.*, 2004), resultado parecido com os obtidos nesse trabalho.

O meio WPM proporcionou maior crescimento das plântulas de louro-pardo do que o 1/2MS, para todas as variáveis analisadas (Tabela 2). Já aos 14 dias de cultivo, foi observado o crescimento dos explantes cultivados no meio WPM. Contrariamente, no meio 1/2MS, nenhum crescimento foi verificado nesse período. O crescimento observado no meio WPM aos 14 dias foi similar ao observado nos explantes em meio 1/2MS aos 28 dias de cultivo (Figura 2). Portanto, o meio WPM não apenas proporcionou maior

crescimento das plântulas, mas também uma resposta mais rápida dos explantes em relação à emissão de folhas e raízes.

TABELA 2: Comprimento médio da parte aérea e da raiz primária, número médio de folhas e de raízes emitidas de explantes de louro-pardo cultivados em dois meios de cultura aos 28 dias após a inoculação. Santa Maria, RS, 2006.

TABLE 2: Mean length of shoot and primary root and mean number of leaves and emerged roots of *Cordia trichotoma* explants cultivated in two culture mediums at 28 days after inoculation. Santa Maria, RS, 2006.

Meios de cultivo	Comprimento (cm)		Número	
	Parte aérea	Raiz primária	Folhas	Raízes
WPM	1,60 a ¹	7,37 a	3,06 a	1,56 a
½ MS	0,73 b	1,27 b	0,52 b	1,08 b
Média	1,17	4,32	1,79	1,32
CV%	27,99	28,44	35,16	19,10

Em que: 1 = Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste F em 5% de probabilidade de erro.

O meio de cultura, além de fornecer os nutrientes necessários, preconiza o padrão de crescimento das plantas *in vitro* (THORPE *et al.*, 1991; CALDAS *et al.*, 1998). Os meios de cultura têm sido formulados para atender às necessidades da espécie trabalhada (MANTOVANI e FRANCO, 1998), sendo o WPM originalmente desenvolvido para plantas lenhosas de forma geral (LLOYD e McCOWN, 1981). O meio WPM na formulação completa foi superior ao MS para a fase de isolamento em laboratório do louro-pardo (MANTOVANI *et al.*, 2001). O WPM suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP) ou zeatina (ZEA) foi superior ao meio MS igualmente acrescido de BAP e ZEA, na indução de brotações de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) (RIBAS *et al.*, 2005). A maior taxa de regeneração e alongamento de explantes de caixeta (*Scheffera morototoni*) foi observada no meio WPM acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de BAP (MANTOVANI *et al.*, 2000). Em testes preliminares, a melhor resposta dos segmentos nodais de louro-pardo foi obtida em meio de cultura MS acrescido de BAP e ácido naftaleno acético - ANA (MANTOVANI *et al.*, 1996). O meio MS, na metade da concentração, acrescido de ANA (0,38 mg L⁻¹) e BAP (1,94 mg L⁻¹), apresentou os melhores resultados para a produção de explantes assépticos de mogno (*Swietenia macrophylla*) (TACORONTE *et al.*, 2004). O meio MS acrescido de BAP (22,0 µM) e ANA (27,0 µM) ou ANA (54 µM) e cinetina (56 µM) foi o mais eficiente para a propagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (ANDRADE *et al.*, 2000).

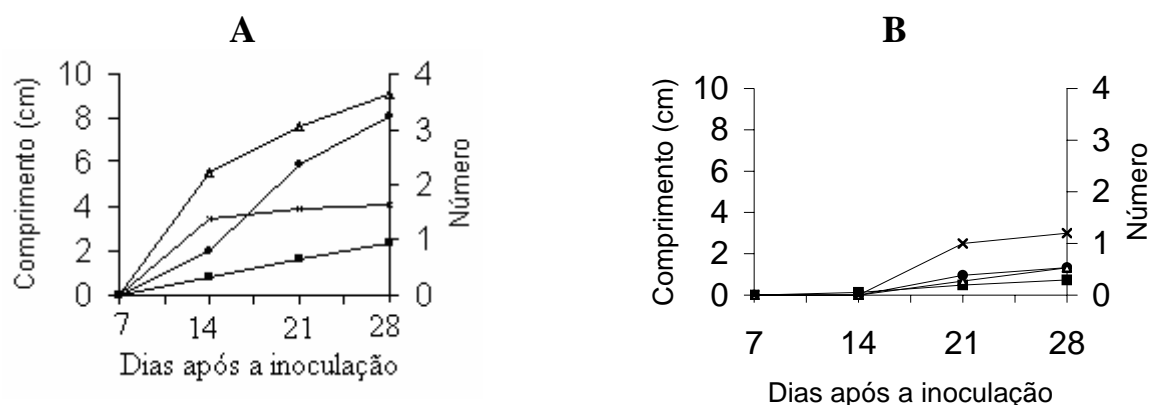


FIGURA 2: Evolução do comprimento (cm) da parte aérea (■) e da raiz primária (●) e do número de folhas (Δ) e raízes (x) emitidas em explantes de louro-pardo nos meios de cultura WPM (A) e 1/2MS (B) no período de 28 dias. Santa Maria, RS, 2006.

FIGURE 2: Evolution of length (cm) of shoot (■) and primary root (●) and number of leaves (Δ) and roots (x) of *Cordia trichotoma* explants in WPM (A) and 1/2MS (B) culture mediums during 28-day period. Santa Maria, RS, 2006.

As sementes de louro-pardo apresentam dormência tegumentar, e, para superá-la, é recomendado

realizar escarificação mecânica por 2 segundos (CARVALHO, 2003). Além disso, o tegumento dificulta a desinfestação das sementes por proteger e/ou manter patógenos associados. Em testes preliminares de estabelecimento *in vitro*, verificou-se, sem a retirada do tegumento das sementes, uma desinfestação de apenas 0% a 5%. A embebição das sementes por até 24 horas facilitou a retirada do tegumento e a desinfestação da semente sem afetar a germinação. As partes aéreas das plântulas com 30 dias após a semeadura foram utilizadas como explantes, os quais, cultivados por 28 dias em meio WPM sem a adição de reguladores de crescimento, tornaram as plântulas aptas para a micropropagação. Esses novos explantes podem ser utilizados para multiplicação massal de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, necessárias para a implantação de plantios comerciais.

CONCLUSÕES

A embebição das sementes de louro-pardo por até 24 horas facilita a retirada do tegumento e proporciona altas percentagens de desinfestação e germinação.

A retirada do tegumento e a imersão das sementes em solução de álcool etílico a 70% por 30 segundos promovem uma efetiva desinfestação, possibilitando o estabelecimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo.

Plântulas de louro-pardo apresentam melhor crescimento em meio de cultivo WPM em comparação ao meio 1/2MS, sendo desnecessária a adição de reguladores de crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. *et al.* Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York : Plenum, 1994. 445p.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1983. 512p.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 87-132.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2003. 1039p.
- COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.O.; PINHEIRO, A.L. *et al.* Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v. 28, p. 633-642, 2004.
- FERREIRA, C.A.; GALVÃO, A.P.M. Importância da atividade florestal do Brasil. In: GALVÃO, A.P.M. (Ed.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais/um guia para ações municipais e regionais**. 3 ed. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. p. 15-18.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: CALDAS, L.S.; TORRES, A.C.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 183-260.
- HANDA, L.; SAMPAIO, P.T.B.; QUISEN, R.C. Cultura *in vitro* de embriões e de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 29-33, 2005.
- HARRINGTON, J.F. Seed storage longevity. In: KOZLOSKI, T.T. (Ed.). **Seed biology**. New York : Academic, 1972. v. 3, p. 145-245.
- LIMA E BORGES, E.E.; PEREZ, S.C.J.G.A.; BORGES, R.C.G. *et al.* Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril-da-mata). **Revista Árvore**, v. 26, n. 5, p. 603-613, 2002.
- 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. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrábida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M. *et al.* Micropropagação de caixeta (*Scheffera morotoni*). **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, p. 47-61, 2000.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria : Centro de Pesquisas Florestais, UFSM, 1998. 132p. (Série técnica ; v. 12)
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; ANGONESI, L. *et al.* Resultados preliminares da micropropagação de louro-pardo *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrábida ex Steudel. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 1996, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo, 1996. p. 445.
- MARTINS-CORDER, M.P.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* De Wild. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.
- MENDONÇA, E.A.F.; RAMOS, N.P.; PAULA, R.C. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrábida ex Steudel (louro pardo) pelo teste de tretrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 64-71, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 109-120, 2004.
- OLIVEIRA, L.M.; DAVIDE, A.C.; CARVALHO, L.M. Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. **Revista Árvore**, v. 27, p. 597-603, 2003.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIZ, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Governo do Estado do RS, 1988. 525p.
- RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L. *et al.* Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Arvore**, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.
- TACORANTE, M.; VIELMA, M.; MORA, A. *et al.* Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. **Acta Botánica Venezolana**, v. 55, p. 7-12, 2004.
- THORPE, T.A., HARRY, I.S., KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p.311-336.
- XAVIER, A. **Silvicultura clonal I** : princípios e técnicas de propagação vegetativa. Viçosa: UFV, 2002. 64p.