

## MICROPROPAGAÇÃO DE *Cabralea canjerana*<sup>1</sup>

Silvana Cruz da Rocha<sup>2</sup>, Marguerite Quorim<sup>3</sup>, Luciana Lopes Fortes Ribas<sup>3</sup> e Henrique Soares Koehler<sup>4</sup>

**RESUMO** – A *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) (canjarana) é uma espécie arbórea nativa brasileira importante para fornecimento de madeira de boa qualidade. As sementes desta espécie não podem ser armazenadas por muito tempo e, por tanto, existe a necessidade do desenvolvimento de técnicas alternativas de propagação como a micropropagação. Neste trabalho, foram realizados experimentos de multiplicação utilizando segmentos nodais, retirados de plantas germinadas *in vitro*. Os segmentos foram inoculados em meio de cultura MS ou WPM, adicionado de 6-benzilaminopurina (BAP) e, ou, 2-isopenteniladenina (2-iP) nas concentrações de 2,5 ou 5 µM. Microestacas de rebrotas foram colocadas em meio de cultura MS/2, com a metade da concentração dos sais do meio MS, adicionado de ácido indol 3-butírico (AIB) (0, 2,5 e 5 µM). Após sete dias, foram transferidas para meio MS/2 sem auxina e na luz. Na fase de multiplicação, o meio de cultura MS foi mais adequado que o meio WPM. O segmento nodal, em presença de 2,5 µM de BAP, propiciou um dos melhores resultados, com uma taxa de multiplicação de 1,77 por mês, em meio de cultura MS. O enraizamento das microestacas oriundas de rebrotas foi de 87,5% em presença de 5 µM de AIB durante sete dias. A aclimatização foi realizada em casa de vegetação e proporcionou 90% de sobrevivência das mudas após 30 dias. A micropropagação da canjarana a partir de segmentos nodais de mudas cultivadas *in vitro* é viável para a multiplicação dessa espécie.

Palavras-chave: Citocininas, cultura de tecidos e espécie nativa.

## MICROPROPAGATION OF *Cabralea canjerana*

**ABSTRACT** – *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) (“canjarana”) is a native tree of economic importance in Brazil. The storage of seeds is of short duration and it is therefore necessary to establish a protocol for micropropagation of this species. In this work, multiplication experiments were carried out using nodal segments, excised from *in vitro* germinated plants. The segments were inoculated in MS or WPM culture medium, supplemented with 6-benzylaminopurine (BAP) and/or 2-isopentenyladenine (2-iP) at 2.5 or 5 µM. Micro-cuttings were taken from new shoots developed from the seeds and used in a rooting experiment using a culture medium with half-strength MS medium (MS/2) supplemented with indolbutyric acid (IBA) (0, 2.5 and 5 µM). After 7 days in this medium, they were transferred to MS/2 medium without auxin under light. During the multiplication phase, the MS culture medium was more suitable for the multiplication of *C. canjerana* than WPM medium. The nodal segments cultured in the presence of 2.5 µM BAP showed the best result, with a multiplication rate of 1.77 per month on MS medium. The rooting of the microcuttings was 87.5% when they were kept in the presence of 5 µM IBA for 7 days. An acclimatization rate of 90% was achieved after 30 days in the greenhouse. In conclusion, the micropropagation of *C. canjerana* from nodal segments of plantlets is possible for this species.

Keywords: Cytokinins, native species and tissue culture.

<sup>1</sup> Recebido em 08.06.2006 e aceito para publicação em 15.12.2006.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba-PR.

<sup>3</sup> Departamento de Botânica da UFPR. Cx.P. 19031, 81531-970 Curitiba-PR.

<sup>4</sup> Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR, Curitiba-PR.

## 1. INTRODUÇÃO

*Cabralea canjerana* é uma espécie arbórea pertencente à família Meliaceae, conhecida popularmente como canjarana (CARVALHO, 1994). Pode ser encontrada na Costa Rica, Guiana, Perú, Bolívia, Argentina, Paraguai (BACKES e IRGANG, 2002) e em vários estados do Brasil (CARVALHO, 1994).

A madeira da canjarana é considerada uma das mais valiosas do Sul do Brasil, devido à sua ótima qualidade e à resistência satisfatória ao ataque de organismos xilófagos em condições favoráveis à decomposição (CARVALHO, 1994; BACKES e IRGANG, 2002). Devido a essas características, a madeira é empregada em construções civis, dormentes, marcenaria, confecção de caixas, embalagens, carpintaria e obras de escultura (CARVALHO, 1994; LONGHI, 1995). Além do uso da madeira, a espécie é de grande importância na composição de reflorestamentos heterogêneos ou restauração de áreas de preservação permanente (LORENZI, 1996).

A longevidade das sementes de canjarana armazenadas é curta, devido à perda rápida da viabilidade durante a secagem (LONGHI et al., 1984), surgindo assim a necessidade de determinar técnicas alternativas de propagação. A micropropagação é uma técnica que oferece várias vantagens, dentre elas a multiplicação de clones, propagação de transgênicos e de espécies de interesse econômico de maneira a preservar as florestas naturais (NEHRA et al., 2005). Técnicas de micropropagação têm sido utilizadas para propagar algumas espécies florestais nativas e para estabelecer matrizes para produção de sementes. Entretanto, houve pouco êxito na propagação *in vitro* de espécies lenhosas tropicais, exceto no caso de *Tectona grandis*, *Dalbergia* sp. e *Swietenia macrophylla* (MERKLE e NAIRN, 2005). Portanto, são necessários estudos de micropropagação para essas espécies (CID et al., 1997), como é o caso das espécies nativas brasileiras, que incluem a *Cabralea canjerana*.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação para a canjarana.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e condições de cultura

Foram coletados frutos de árvores adultas de

canjarana localizadas no Município de Antonina, Estado do Paraná, os quais foram obtidos de polinização aberta. Os frutos sem fissuras sofreram deiscência no laboratório, e suas sementes (sem o arilo) foram desinfetadas em etanol 70% (v/v) por 30 seg, seguida de solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), acrescido de Tween 20® (4% v/v) por 30 min. Posteriormente, as sementes foram enxaguadas com água destilada esterilizada e inoculadas em frascos (8,5 cm de altura e 6,5 cm de diâmetro) contendo 20 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com a metade da concentração de sais minerais e vitaminas. As culturas foram mantidas em sala de crescimento numa temperatura de  $25 \pm 3$  °C, sob  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de densidade de fluxo de fótons e fotoperíodo de 16 h.

### 2.2 Multiplicação *in vitro*

A partir dos resultados dos ensaios preliminares (dados não publicados), foi implantado um experimento para a determinação dos efeitos das citocininas BAP e 2-iP na multiplicação *in vitro*. Foram utilizados os seguintes tratamentos: meio de cultura MS suplementado com  $2,5 \mu\text{M}$  de BAP (tratamento BAP),  $2,5 \mu\text{M}$  de 2-iP (tratamento 2-iP) ou uma combinação das duas citocininas na concentração de  $2,5 \mu\text{M}$  (tratamento BAP+2-iP). Os explantes foram segmentos nodais, pois demonstraram, em experimentos preliminares, melhores resultados quando comparados com os segmentos apicais. Estes foram excisados de rebrotas de 70 dias de idade (brotos originados do nó cotiledonar após a poda da parte aérea da planta), com 1,4 cm de comprimento e duas gemas axilares alternas. No experimento com meio WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), foram utilizadas as concentrações de BAP que forneceram os melhores resultados em experimentos preliminares ( $2,5$  e  $5,0 \mu\text{M}$ ). Nos dois experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento, sendo a unidade experimental composta por dois frascos com três segmentos nodais cada.

O experimento foi avaliado ao final do segundo e do terceiro subcultivo, sendo considerados o número inicial de gemas ( $N_1$ ) em cada tratamento e o número de gemas ao final dos subcultivos ( $N_2$ ), incluindo as gemas dos novos brotos formados. A taxa de multiplicação foi calculada dividindo  $N_2$  por  $N_1$ . Adicionalmente, foram calculados a porcentagem de explantes com brotos, o número médio de brotos

(comprimento > 0,5 cm) por explante (considerando-se apenas o número de brotos novos produzidos em cada subcultivo, dividido pelo número de segmentos com brotos presentes em cada subcultivo) e a porcentagem de explantes mortos. Para a porcentagem de explantes mortos, porcentagem de explantes com brotos e número médio de brotos novos por explante, os dados foram transformados para  $\log(x+1)$ , sendo o valor de "x" expresso na forma decimal. Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

### 2.3 Enraizamento

Micro-estacas de 2 cm foram obtidas a partir de rebrotas de aproximadamente nove meses de idade. Os explantes com duas folhas na porção apical, e a base cortada em bisel duplo foram inoculados em meio de cultura MS/2 (meio MS com metade da concentração de sais), contendo 0; 2,5; 5; e 10  $\mu\text{M}$  de ácido indol 3-butírico (AIB). As microestacas permaneceram sete dias em meio de cultura na ausência de luz. Posteriormente, foram retiradas dos respectivos tratamentos e transferidas para o meio de cultura MS/2 sem AIB e mantidas na luz. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, contendo 10 microestacas por repetição. A avaliação dos experimentos foi realizada após 60 dias após a da instalação, e as variáveis avaliadas observadas foram porcentagem de microestacas enraizadas, número médio de raízes por microestaca e comprimento médio das raízes. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey.

### 2.4 Aclimatização

Após o enraizamento *in vitro*, as microestacas foram transferidas para o substrato Plantmax®, em casa de vegetação com irrigação manual diária (duas vezes por dia nos primeiros 15 dias e uma vez ao dia no restante do período). Após 30 dias, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, contendo 10 microestacas com raízes por repetição. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Multiplicação de brotos

Nos experimentos comparando os meios de cultura MS e WPM, a maior taxa de multiplicação (1,77 no 2º

subcultivo) foi observada nos segmentos nodais, no tratamento com 2,5  $\mu\text{M}$  BAP em meio de cultura MS, em comparação com o meio WPM (1,12 no 2º subcultivo) e aos segmentos apicais (dados não apresentados). Esses resultados diferiram estatisticamente (CV 7,29%). Nas culturas em meio WPM, as taxas de multiplicação foram inferiores a 1,2 em todos os subcultivos e nas duas concentrações de BAP (2,5  $\mu\text{M}$  e 5,0  $\mu\text{M}$ ) testadas.

O número de brotos/explante foi inferior ao número obtido no meio MS (dados não apresentados). As folhas apresentaram clorose, o que indica que a composição mineral do meio WPM não é adequada para a multiplicação da canjarana. No entanto, o meio de cultura WPM tem sido muito utilizado para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas (VENGADESAN et al., 2002). Esse meio de cultura adicionado de 0,88  $\mu\text{M}$  de BAP proporcionou bons resultados na multiplicação de segmentos apicais de mogno, *Swietenia macrophylla*, e de cedro, *Cedrela odorata* (MARUYAMA et al., 1989a). No caso do cedro, os autores obtiveram 3,5 brotos por explante (MARUYAMA et al., 1989b). Esse resultado foi similar ao obtido com os segmentos nodais de peroba-rosa, *Aspidosperma polyneuron*: nesse mesmo meio de cultura adicionado de BAP (4,4-8,8  $\mu\text{M}$ ), foram obtidas quatro a cinco brotações por explante (RIBAS et al., 2005).

Já no caso de *Acacia* (VENGADESAN et al., 2002) e *Anacardium occidentale* (MNENEY e MANTELL, 2002) o meio de cultura MS apresentou melhores resultados que o WPM para indução de brotos. Isso pode estar relacionado com o fato de o meio WPM possuir apenas 45% da força iônica total do meio MS (MS 40  $\mu\text{M}$ ; WPM 9,7  $\mu\text{M}$ ) e amônio (MS 20  $\mu\text{M}$ ; WPM 4,9  $\mu\text{M}$ ). Em conseqüência, o meio WPM possui uma baixa concentração de nitrogênio total (14,7  $\mu\text{M}$ ) comparado ao MS (60,00  $\mu\text{M}$ ), que pode induzir a clorose foliar, sintoma observado nos explantes de canjarana cultivados em meio de cultura WPM e não em meio de cultura MS. Assim, quando o meio de cultura WPM é utilizado, a duração de cada subcultura deve ser menor do que três semanas, para evitar ocorrência de deficiência de nitrogênio.

No presente trabalho, as citocininas BAP e 2-iP foram testadas, assim como a combinações delas. As maiores taxas de multiplicação foram observadas no segundo subcultivo, no tratamento com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP

(1,42) (Tabela 1 e Figura 1) ou com 2,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 2-iP (1,66) (Tabela 1). No terceiro subcultivo, não houve diferença significativa entre os tratamentos. As maiores porcentagens de explantes com brotos foram observadas na presença de BAP isolada (25 a 27) ou combinada com 2-iP (25 a 37) (Tabela 1). Quanto ao número médio de brotos por explante, no geral o maior valor (1,63) foi obtido quando as duas citocininas estavam presentes (dados não apresentados). No segundo e terceiro subcultivos, a menor porcentagem de explantes mortos foi observada no tratamento com BAP isolada ou combinada com 2-iP (Tabela 1).

BAP é uma citocinina sintética, enquanto o 2-iP é natural em plantas. No presente trabalho, a primeira foi escolhida por ter maior capacidade de indução de brotos quando comparada com outras (CERDAS et al., 1998; IBÁÑEZ et al., 2003) e ser a mais utilizada na multiplicação de espécies lenhosas (BENNET et al., 1994). Samsudeen Varisai et al. (1999) indicaram que BAP isolada ou em combinação com outras citocininas induz a organogênese a partir de ápices caulinares de *Macrotyloma uniflorum*. Segundo esses autores, números maiores de brotos múltiplos foram desenvolvidos a partir de nós cotiledonares em meio MS contendo BAP combinada com cinetina ou 2-iP. Além disso, os brotos múltiplos desenvolvidos com uma combinação de BAP (4,4  $\mu\text{M}$ ) e 2-iP (14,7  $\mu\text{M}$ ) cresceram mais rápido que aqueles cultivados com BAP isolada (4,4  $\mu\text{M}$ ).

As taxas de multiplicação de brotos em canjarana foram relativamente baixas (menor que 2,00) (Tabela 1), em comparação com outras espécies. Em segmentos nodais de mogno, Schottz (2003) obteve alta taxa de

multiplicação (7,22 brotos por segmento) em meio de cultura MS contendo 10  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,2  $\mu\text{M}$  de 2-iP. Entretanto, da mesma maneira que no presente trabalho, a taxa de multiplicação foi baixa (inferior a 1,00) no meio adicionado de 2-iP isolado (2,2  $\mu\text{M}$ ). O efeito do BAP em estimular a produção de brotos também foi observado em *Melia azedarach*, em que essa citocinina, na concentração de 17,75  $\mu\text{M}$ , proporcionou uma média de 23,75 brotos por explante (THAKUR et al., 1998). Para *Anacardium occidentale*, também a melhor proliferação de brotos axilares foi obtida com BAP (com aproximadamente 70% de brotos multiplicando), em comparação com 2-iP e com outras citocininas como cinetina e zeatina (MNENEY e MANTELL, 2002). Novos experimentos serão conduzidos com o uso da BAP e de outras citocininas (tidiazuron ou zeatina), assim como combinações de BAP e 2-iP não testadas neste trabalho, a fim de melhorar a taxa de multiplicação para a espécie.

### 3.2 Enraizamento de microestacas obtidas a partir de rebrotas

Os resultados indicam um efeito significativo da adição de AIB na indução de raízes e com respostas acima de 80% de enraizamento após 60 dias, não havendo diferenças significativas entre as três concentrações de AIB testadas (Tabela 2) (Figura 2). Entretanto, o comprimento médio foi significativamente superior nos tratamentos com 2,5 mM de AIB quando comparados com as demais concentrações de auxinas testadas (Tabela 2). O número médio de raízes por microestaca foi similar nas três concentrações de AIB testadas (Tabela 2).

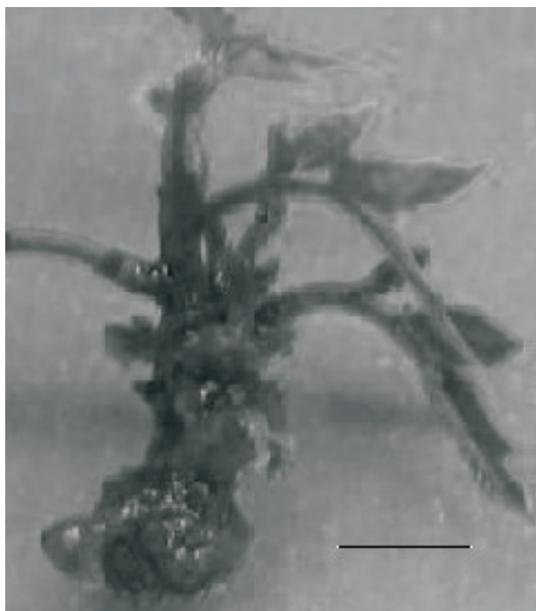
**Tabela 1** – Taxas de multiplicação, porcentagem de explantes com brotos e porcentagem de explantes mortos durante a micropropagação de canjarana em meio de cultura MS, com 2-iP, BAP e BAP + 2-iP ao final do segundo e terceiro subcultivos

**Table 1** – Multiplication rates, percentage of explants with shoots and percentage of dead explants during canjarana micropropagation in MS culture medium supplemented with 2-iP, BAP and BAP + 2-iP, at the end of the second and third subculture

Tratamento	Taxa de multiplicação		Explantes com broto (%)		Explantes mortos (%)	
	2°	3°	2°	3°	2°	3°
	subcultivo	subcultivo	subcultivo	subcultivo	subcultivo	subcultivo
2-iP (2,5 $\mu\text{M}$ )	1,05 c	1,05 a	7,00 a	16,00 a	32,60 b	37,50 b
BAP (2,5 $\mu\text{M}$ )	1,42 b	1,25 a	27,00 a	25,00 a	12,30 a	3,61 a
BAP + 2-iP (2,5 $\mu\text{M}$ + 2,5 $\mu\text{M}$ )	1,66 a	1,19 a	25,01 a	37,00 a	6,50 a	8,81 a
CV* (%)	6,01	8,20	9,77	8,95	8,29	9,84

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\*CV = coeficiente de variação.



**Figura 1** – Brotos de *Cabralea canjerana* em BAP (2,5 µM) no 2º subcultivo. Barra: 1 cm.

**Figure 1** – Shoots of *Cabralea canjerana* in BAP (2,5 µM) in the 2º subculture. Bar: 1 cm.

As auxinas controlam uma grande variedade de processos implicados no desenvolvimento das plantas, entre eles a iniciação de novos meristemas de raízes. Trabalhos realizados com estacas de *Azukia* indicaram que a auxina teve efeito duplo sobre a formação de raízes adventícias. Durante a primeira fase, a auxina acelerou a divisão celular e, durante a segunda, estimulou os processos que permitem o desenvolvimento do primórdio radicial em raiz (KATO et al., 1978). Da mesma maneira, no caso de *Pinus taeda* foi mostrado que as respostas à auxina durante a formação de raízes adventícias incluem a indução da reorganização celular e a divisão celular, seguida pela organização do meristema radicial (GREENWOOD et al., 2001).

Resultados similares aos descritos neste trabalho foram observados no enraizamento de microestacas de *Melia azedarach* (83%) após 21 dias na presença de 4,92 µM de AIB (THAKUR et al., 1998) e 100% após um tratamento de quatro dias com 12,26 µM de AIB, seguido de 26 dias sem auxina (VILA et al., 2005). No caso do urucum (*Bixa orellana* L.), a melhor taxa de enraizamento (67%) também foi observada no meio MS/2 contendo 5 µM de AIB, mas nesse caso as microestacas permaneceram no meio de cultura suplementado com

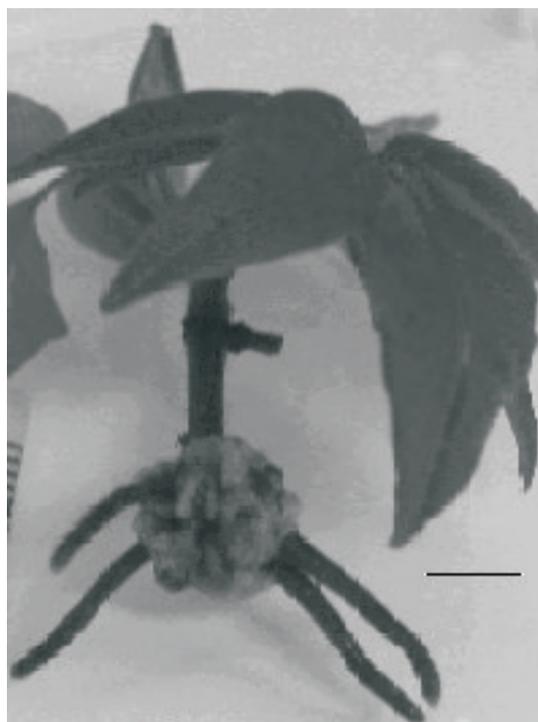
AIB e na luz (CARVALHO et al., 2005). O número médio de raízes por microestaca foi similar nas três concentrações de AIB testadas (Tabela 2), e o comprimento médio foi maior no meio de cultura sem auxina ou com a concentração de 2,5 µM.

**Tabela 2** – Enraizamento de microestacas de canjarana obtidas a partir de rebrotas, em meio de cultura MS/2 adicionado de AIB após 60 dias

**Table 2** – Rooting of micro-cuttings of canjarana obtained from new shoots, in MS/2 medium supplemented with IBA after 60 days

Concentração de AIB (µM)	Microestacas enraizadas (%)	Número médio de raízes por microestaca	Comprimento médio das raízes (cm)
0	41,9 b	1,07 b	0,76 a
2,5	80,0 a	2,09 a	0,76 a
5	87,5 a	2,55 a	0,43 b
10	83,2 a	2,57 a	0,46 b
CV* (%)	14,38	11,65	22,84

Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*CV = coeficiente de variação.



**Figura 2** – Microestaca de *Cabralea canjerana* enraizada em AIB (2,5 mM). Barra: 1 cm.

**Figure 2** – Microcuttings of *Cabralea canjerana* rooted in IBA (2.5 mM). Bar: 1 cm.

### 3.3 Aclimatização

As maiores porcentagens de sobrevivência (86,2 e 89,9%) foram observadas em microestacas enraizadas no meio de cultura MS/2 contendo 5 e 10  $\mu\text{M}$  de AIB, respectivamente (Tabela 3), em que o comprimento médio das raízes foi o menor (Tabela 2). Porém, não foi possível relacionar esse resultado com o número de raízes por microestaca. No caso do caju (*Anacardium occidentale*), foi obtida uma sobrevivência de 60 a 65% após o enraizamento com 0,5  $\mu\text{M}$  de AIB (MNENEY e MANTELL, 2002). Em *Azadirachta excelsa*, a taxa foi de 80% após 28 dias, para microestacas enraizadas na presença de 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,9 mM de AIB (LIEW et al., 1999).

**Tabela 3** – Porcentagem de sobrevivência das microestacas (obtidas a partir de rebrotas) de canjarana enraizadas em meio de cultura MS/2 adicionado de AIB (0; 2,5; 5,0; e 10  $\mu\text{M}$ ) após 30 dias

**Table 3** – Percentage of acclimatization of micro-cuttings (from new shoots) rooted in MS/2 culture medium supplemented with IBA (0, 2.5, 5.0 and 10  $\mu\text{M}$ ) after 30 days

Concentrações de AIB ( $\mu\text{M}$ ) na fase de enraizamento	Sobrevivência das micro-estacas enraizadas após 30 dias (%)
0	21,25 c
2,5	50,00 b
5	86,20 a
10	89,90 a
CV* (%)	9,94

Médias seguidas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*CV = coeficiente de variação

### 4. CONCLUSÕES

\* Este trabalho permitiu a micropropagação da canjarana, porém a etapa da multiplicação precisa ser otimizada.

\* No meio MS adicionado de BAP, de 2-iP ou de combinação das duas citocininas, a taxa de multiplicação permaneceu inferior a 2 durante três subcultivos.

\* A adição de AIB ao meio de cultura MS/2 resultou em aumento significativo no enraizamento das microestacas, em comparação com o tratamento-controle (sem AIB).

\* A porcentagem de sobrevivência das micro-estacas durante a etapa de aclimatização foi significativamente superior após tratamentos com 5 e 10 mM de AIB.

### 5. AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado a S.C.R.; e à SPVS, pelo fornecimento das sementes e pela ajuda na coleta de frutos.

### 6. REFERÊNCIAS

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul:** guia de identificação e interesse ecológico. Santa Cruz do Sul: Instituto Souza Cruz, 2002. p.200-201.

BENNETT, I. J. et al. Alternating cytokininins in multiplication media stimulates in vitro shoot growth and rooting of *Eucalyptus globules* Labill. **Annals of Botany**, n.74, p.53-58, 1994.

BENNY, D. et al. Micropropagation of *Naregamia alata* W & A. - an important medicinal plant. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.8, n.2, p.105-107, 1999.

CARVALHO, J. F. R. P.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, v.29, n.6, p.887-895, 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: Embrapa/CNPQ- SPI, 1994. p.107-112.

CERDAS, L. V.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista Biologia Tropical**, v.46, n.2, p.225-228, 1998.

CID, L. P. B. et al. Micropropagation of *Miconia* sp., a woody Melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.1, p.21-25, 1997.

GREENWOOD, M. S.; CUI, X.; XU, F. Response to auxin changes during maturation - related loss of adventitious rooting competence in loblolly pine (*Pinus taeda*) stem cuttings. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.373-381, 2001.

- IBAÑEZ, A.; VALERO, M.; MORTE, A. Influence of cytokinins and subculturing on proliferation of single-axillary-bud microcuttings of *Vitis vinifera* L. cv Napoleon. **Anales de Biologia**, v.25, p.83-90, 2003.
- KATO, M.H.; SHIBAOKA, H.; SHIMOKORIYAMA, M. The nature of the dual effect of auxin on root formation in *Azukia* cuttings. **Plant and Cell Physiology**, v.19, p.1535-1542, 1978.
- LIEW, T. K.; CHAN, L. K.; TEO, C. K. H. In vitro rooting of sentang shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.35, n.1, p.396-400, 1999.
- LIEW, T. K.; TEO, C. K. H. Multiple shoot production in vitro of the tropical timber tree, sentang (*Azadirachta excelsa* Linn.). **HortScience**, v.33, n.6, p.1073-1075, 1998.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v.30, p.421-427, 1980.
- LOPES, S, C. et al. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, v.7, n.1, p.124-128, 2001.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1996. v.1, p.239.
- LONGHI, R. A. **Livro das árvores e arvoretas do sul**. Porto Alegre: L&PM, 1995. p.51-52.
- LONGHI, R. A.; MARQUES, S. E.; BISSANI, V. Época de colheita, tratamento de sementes e métodos de semeadura utilizados no viveiro florestal de Nova Prata. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 5., 1984, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: 1984. v.2, p.533-553.
- MARUYAMA, E. et al. Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species of Perú – Amazon Forest. **Journal of Agricultural Science, The Tokyo University of Agriculture**, v.33, n.4, p.252-261, 1989a.
- MARUYAMA, E. et al. Micropropagation of cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot-tip culture. **Journal of the Japan Forestry Society**, v.71, n.8, p.329-331, 1989b.
- MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.41, p.602-619, 2005.
- MNENEY, E.E.; MANTELL, S. H. Clonal propagation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.6, n.7, p.649-657, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.1, p.437-497, 1962.
- NEHRA, N. S. et al. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.41, p.701-717, 2005.
- NUNES, E. C. et al. In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, n.1, p.259-268, 2002.
- RIBAS, L. L. F. et al. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.517-524, 2005.
- SCHOTTZ, E. S. **Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King) a partir de material juvenil**. 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SHAHZAD, A.; SIDDIQUI, S. Micropropagation of *Melia azedarach* L. **Phytomorphology**, v.51, n. 2, p. 151-154, 2001.

SHAMSUDEEN VARISAI M. et al. Effect of cytokinins on the proliferation of multiple shoots in Horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam) Verdc). **Journal of Plant Biotechnology**, v.1, p.79-83, 1999.

THAKUR, R.; RAO, P.S.; BAPAT, V.A. In vitro plant regeneration in *Melia azedarach* L. **Plant Cell Reports**, v.18, n.1, p.127-131, 1998.

VENGADESAN, G. et al. In vitro propagation of *Acacia* species - a review. **Plant Science**, v.163, n.1, p.663-671, 2002.

VILA, S. et al. Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segments of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) seedlings. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.41, n.1, p.746-751, 2005.

YOUSEF, S. A.; FATTAH, F. A. Propagation of neem plant (*Azadirachta indica* L.) by tissue culture (research note). **Dirasat Agricultural Sciences**, v.26, n.2, p.287-291, 1998.