

## Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo

CAMILLO, J.<sup>1</sup>; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.<sup>2\*</sup>; VIEIRA, R.F.<sup>2</sup>; PEIXOTO, J.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Ala Sul, Cx. Postal 4508, CEP: 70910-970, Brasília, DF; <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Núcleo Temático de Recursos Genéticos, PqEB, Av. W5 Norte (final), Caixa Postal 02372, CEP: 70770-900, Brasília, DF. \*jonny@cenargen.embrapa.br

**RESUMO:** *Cochlospermum regium* é uma planta de áreas de cerrado, caatinga e pantanal. Na medicina popular é conhecida por “algodão-do-campo” e suas raízes são utilizadas para o tratamento de infecções uterinas, intestinais, gastrite, úlceras e artrite. Atualmente, o extrativismo e a destruição dos habitats naturais colocaram o algodão-do-campo na lista de espécies medicinais nativas prioritárias para conservação *ex situ*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a conservação *in vitro* do algodão-do-campo e fornecer subsídios para estudos de micropropagação da espécie. Sementes de algodão-do-campo foram testadas quanto à germinação *in vitro* pela escarificação ou não das sementes em ácido sulfúrico e inoculação em meio de cultura MS. Para a conservação *in vitro*, segmentos nodais retirados das plântulas germinadas *in vitro* foram avaliados por 90 dias sob três regimes de temperatura (10, 20, e 25°C) e em três concentrações de meio WPM (½, ¾ e pleno). Verificou-se que sementes escarificadas apresentaram percentual de germinação *in vitro* de 93,3% aos 30 dias, valor significativamente superior aos 13,3% observados nas sementes não escarificadas. A conservação da espécie *in vitro* mostrou-se viável, desde que as culturas sejam mantidas em câmara de crescimento a 20°C em meio de cultivo ½WPM. Sob estas condições os explantes mantiveram um crescimento mínimo e percentual de sobrevivência de 100%, após três meses de avaliação.

**Palavras-chave:** Algodão-do-campo, conservação *in vitro*, micropropagação, germinação, plantas medicinais

**ABSTRACT:** *In vitro* conservation of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae under minimal growth storage. *Cochlospermum regium* is a plant from cerrado, caatinga and pantanal areas. In popular medicine, it is known as “algodão-do-campo” and its roots are used to treat uterine and intestinal infections, gastritis, ulcers and arthritis. Nowadays, extraction activities and the destruction of natural habitats has made “algodão-do-campo” one of the major native medicinal species for *ex situ* conservation. The aim of this work was to develop a methodology for the *in vitro* conservation of “algodão-do-campo”, contributing to studies on the micropropagation of this species. *In vitro* germination was evaluated in “algodão-do-campo” seeds subjected to scarification or not with sulfuric acid and inoculation in MS medium. For *in vitro* conservation, nodal segments from *in vitro*-germinated seedlings were evaluated for 90 days at three temperatures (10, 20 and 25°C) and three WPM medium concentrations (½, ¾ and full-strength). Scarified seeds presented 93.3% *in vitro* germination at 30 days of cultivation, a significantly higher value than the 13.3% observed for non-scarified seeds. The *in vitro* conservation of “algodão-do-campo” showed to be viable once cultures are kept in a growth chamber at 20°C in ½ WPM medium. Under such conditions, the explants presented a minimal growth and 100% survival after three evaluation months.

**Key words:** “Algodão-do-campo”, *in vitro* conservation, micropropagation, germination, preservation, medicinal plants

## INTRODUÇÃO

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil e de acordo com estudos da *Conservation International* restam intactos apenas 20% de sua cobertura original (Alho, 2005). Mendonça et al. (1998) relatam a ocorrência no cerrado de mais de 7.000 espécies de plantas superiores e estima-se que deste total, cerca de 4.400 sejam endêmicas.

Dentre as espécies endêmicas do bioma cerrado pode-se citar o algodão-do-campo [*Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger], que é arbusto de ocorrência freqüente nas áreas de cerrado da região centro-oeste do país. Na medicina popular as raízes são utilizadas para o tratamento de infecções uterinas, intestinais e ovarianas, gastrite, úlceras, artrite e afecções da pele. Análises fitoquímica e farmacológica do extrato das raízes do *C. regium* demonstraram que o flavonóide kaempferol (F-52) possui propriedades analgésica e anti-edematogênica (Lima et al., 1995), anti-bacteriana (Oliveira et al., 1996), antioxidante, mutagênica e citotóxica (Toledo et al., 2000; Nunes & Carvalho, 2003; Nunes et al., 2003; Castro et al., 2004). Ceschini & Campos (2006) demonstraram os efeitos do extrato aquoso preparado com o pó das raízes de *C. regium* no tratamento de artrite reumatóide.

A crescente demanda da indústria farmacêutica por produtos de origem vegetal constitui uma ameaça à conservação de plantas medicinais, na forma como vem sendo atendida. Alguns dados sobre comércio de plantas medicinais nativas têm mostrado que mais de 50% das espécies nativas exportadas pelo Brasil são coletadas em seu ambiente natural, na forma de um extrativismo predatório que pode comprometer a sobrevivência dessas espécies e dos ecossistemas envolvidos, diante da elevada utilização de componentes das plantas essenciais para sua reprodução, como flores, frutos, sementes e raízes. Deste modo, algumas plantas medicinais nativas encontram-se ameaçadas de extinção, ou mesmo comercialmente extintas em determinadas regiões (Brito, 2003). Nestes casos faz-se necessário a adoção de medidas de conservação das espécies fora do seu ambiente natural (*ex situ*), que podem ser via bancos de sementes em temperaturas sub-zero ou conservadas *in vitro*.

As técnicas de cultura de tecidos em plantas, em alguns casos, podem representar a única estratégia para conservar estas espécies fora do seu habitat, como no caso de plantas com sementes recalcitrantes e de difícil propagação vegetativa por métodos convencionais (Roca et al., 1991; Ferreira et al., 1998).

Outra finalidade importante da cultura de tecidos é facilitar a propagação em larga escala de espécies de propagação vegetativa de importância

econômica, como é feito rotineiramente para culturas como a banana, batata e cana-de-açúcar. Mas a multiplicação em larga escala também pode ser útil para espécies de onde a obtenção da matéria prima se dá por extrativismo, e o número de indivíduos na população pode não ser suficiente para atender a demanda. Neste caso, o cultivo sistematizado *in vitro* pode garantir a produção regular e em larga escala (Pereira, 2003).

O extrativismo e a destruição dos habitats naturais colocaram o algodão-do-campo, na lista de espécies medicinais nativas prioritárias para conservação no cerrado. O objetivo deste trabalho foi adequar uma metodologia para a conservação *in vitro* do algodão-do-campo e fornecer subsídios para estudos de micropropagação da espécie.

## MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Conservação de Germoplasma Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF. As sementes utilizadas como fontes primárias de explantes foram obtidas de frutos maduros, em plantas adultas de populações nativas de algodão-do-campo coletadas no entorno do Distrito Federal. As coletas foram realizadas semanalmente entre os meses de julho e setembro de 2006.

Para o teste de germinação, as sementes foram imersas em água destilada por 48 horas, sendo a desinfestação realizada em solução de hipoclorito de sódio (2,0% a 2,5% de alvejante sanitário comercial) por 20 minutos. As sementes foram divididas em dois sub-lotes de 30 sementes cada, sendo que no primeiro lote (T1), as sementes foram submetidas à escarificação química com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por 40 minutos, e no segundo lote (T2), as sementes foram inoculadas sem tratamento químico.

O meio de germinação foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), reduzido da metade das concentrações de sais de macro e micronutrientes, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Acumedia) e 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. As sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas e radiação luminosa de 30 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecidas por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (Sylvania, 20W).

As observações referentes à germinação das sementes foram realizadas diariamente nos primeiros 30 dias de cultivo e mensalmente, durante cinco meses, totalizando seis meses de avaliação. Para avaliar possíveis diferenças na capacidade de proliferação *in vitro* do algodão-do-campo, dez

indivíduos provenientes de sementes foram selecionados ao acaso e avaliados comparativamente quanto ao crescimento e taxa de multiplicação.

Para os estudos de conservação, segmentos nodais provenientes da etapa de multiplicação *in vitro* foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo três diferentes concentrações de sais do meio de WPM ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{3}{4}$  e Plena) (Lloyd & Mccown, 1980), suplementados com 10 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 g L<sup>-1</sup> de ágar e 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, sendo o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem. Também foram testados três regimes de temperatura de conservação: 10, 20 e 25°C, em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e radiação luminosa de 30 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecidas por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia (Sylvania, 20W). Dados sobre altura e número de gemas formadas foram obtidos mensalmente por um período de 90 dias. Ao final deste período, também foi avaliada a percentagem total de crescimento e sobrevivência.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa

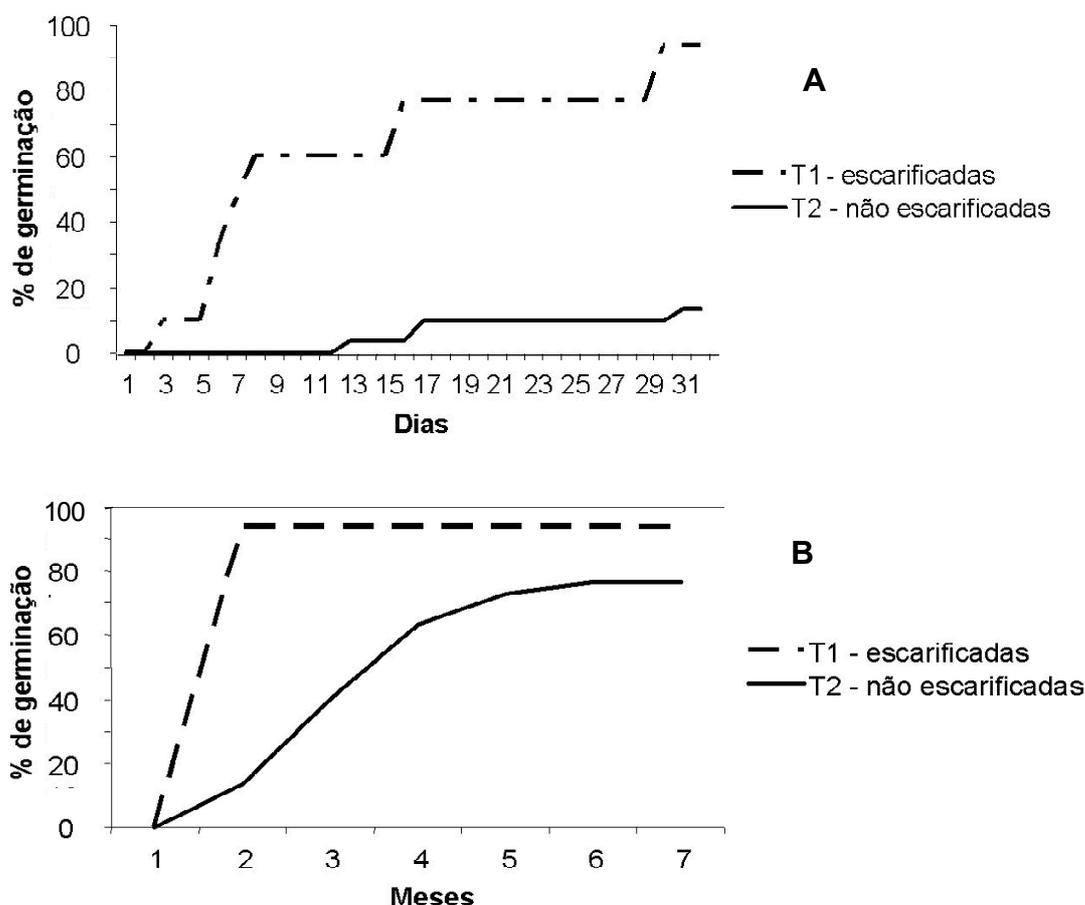
estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

O lote de sementes submetido à escarificação química com ácido sulfúrico (T1) apresentou percentual de germinação de 93,3% aos 30 dias após a inoculação, contrastando com apenas 13,3% de germinação no lote não escarificado (T2) (Figuras 1 e 3A).

Quando se avaliou o percentual de germinação das sementes ao seis meses, verificou-se que a porcentagem de sementes germinadas em T1 permaneceu constante, porém o percentual obtido em T2 foi de 76,6%, sugerindo que as sementes de algodão do campo apresentam um tipo de dormência física, que pode ser superada pelo emprego de escarificação química, como o uso do ácido sulfúrico (Figura 2).

A ocorrência de dormência é um fenômeno bastante comum descrito em sementes de espécies nativas do cerrado, havendo alguns trabalhos que descrevem diferentes formas de superar a dormência em sementes para o estabelecimento de cultivos *in*



**FIGURA 1.** Porcentagem de germinação de sementes de *Cochlospermum regium* após 30 dias (A) e 180 dias (B). O Tratamento 1 (T1) representa as sementes escarificadas em ácido sulfúrico por 40 minutos e o Tratamento 2 (T2) as sementes inoculadas sem escarificação.

*in vitro* (Coelho et al., 2001; Lima et al., 2007). Noieto & Silveira (2004) escarificaram mecanicamente sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) mediante punção na região da testa da semente, obtendo aos 22 dias após a inoculação *in vitro* percentual de germinação de 75%. Lima et al. (2007) observaram um percentual de germinação *in vitro* em torno de 60% em sementes de urucu (*Bixa orellana* L.), após remoção do tegumento, em meio de MS. Coelho et al. (2001) relataram percentuais de germinação de até 96,7% em sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth], quando estas foram inoculadas em meio de MS líquido por 35 dias, após a remoção do tegumento.

Na avaliação dos indivíduos foi observado que houve diferença significativa entre os mesmos quanto

à altura das brotações e a taxa de multiplicação (Figura 3 B). Aos 60 dias após a inoculação foi obtida uma média de 4,6 gemas formadas, contra apenas 2,7 gemas aos 30 dias de avaliação. A análise da relação entre o número de gemas formadas e o tempo de avaliação, mostrou que, em média, aos 60 dias o número de gemas formadas foi significativamente maior que aos 30 dias. Contudo, a taxa de sobrevivência dos explantes que aos 30 dias foi em média de 96,7%, decresceu para 67,6% aos 60 dias. Esta diferença no percentual de sobrevivência sugere que é mais vantajoso realizar subcultivos em intervalos menores (30 dias), pois embora a quantidade de gemas obtidas seja menor, o percentual de explantes vivos resultará num maior número de plantas ao final do processo (Tabela 1).

**TABELA 1.** Influência de plantas originárias de sementes de *Cochlospermum regium* quanto à altura de brotos, número de gemas formadas e porcentagem de sobrevivência de explantes aos 30 e aos 60 dias de avaliação *in vitro*

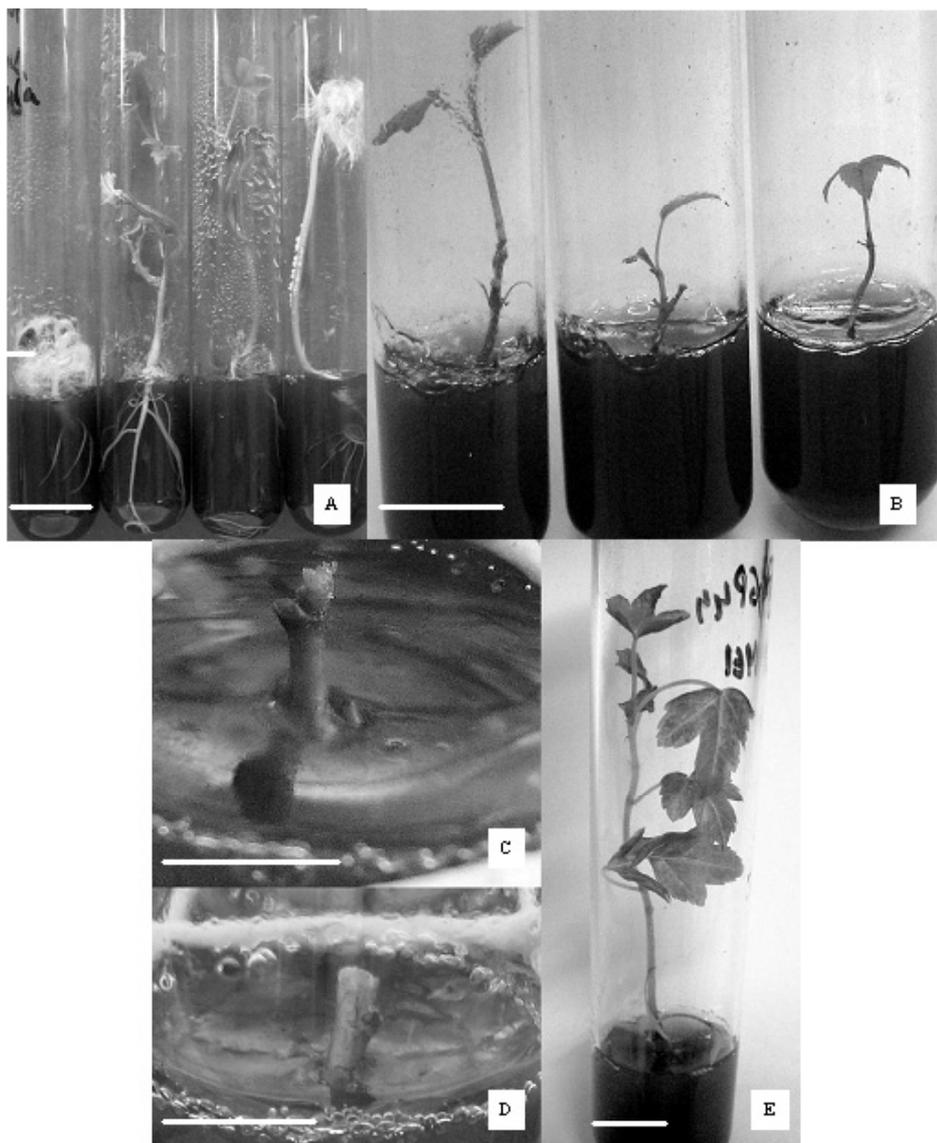
Indivíduos	Altura (cm)		Gemas formadas		Sobrevivência (%)	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Gp01	2,6 a	5,0 a	4,4 a	7,4 a	83,7 aA	83,7 abA
Gp02	1,1 bc	3,4 bcd	2,6 abc	4,0 bc	87,4 aA	26,8 bcB
Gp03	1,9 abc	4,0 abc	3,1 abc	5,1 abc	100 aA	83,7 abB
Gp07	2,1 abc	4,7 ab	2,8 abc	5,6 ab	100 aA	60,8 abcB
Gp12	1,4 abc	2,7 cde	2,9 abc	4,5 bc	100 aA	92,4 aA
Gp15	1,0 bc	2,0 de	1,6 bc	3,4 c	100 aA	51,2 abcB
Gp17	1,4 abc	3,1 cd	2,3 bc	3,3 c	100 aA	26,0 cB
Gp20	1,8 abc	3,0 cd	2,6 abc	4,3 bc	99,1 aA	87,4 aA
Gp21	0,8 c	1,5 e	1,5 c	3,6 bc	96,6 aA	69,2 abcB
Gp22	2,4 ab	4,7 ab	3,2 ab	5,1 abc	100 aA	94,8 aA
<b>Médias</b>	<b>1,6 B</b>	<b>3,4 A</b>	<b>2,7 B</b>	<b>4,6 A</b>	<b>96,7 A</b>	<b>67,6 B</b>

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido vertical e as letras maiúsculas (A,B) no sentido horizontal

**TABELA 2.** Conservação *in vitro* de *C. regium* quanto ao percentual de crescimento, altura das plantas e sobrevivência dos explantes submetidos a três regimes de temperatura e três concentrações do meio de cultura WPM.

Concentração WPM	Crescimento (%)			Altura (cm)			Sobrevivência (%)		
	10°C	20°C	25°C	10°C	20°C	25°C	10°C	20°C	25°C
½	61,6aB	54,5aB	178,9bA	0,7aB	0,9aA	1,5bA	4,3bB	100aA	90,4bA
¾	55,8aB	53,1aB	174,5bA	0,7aB	0,9aB	1,4bA	25,0bB	100aA	100aA
Pleno	57,8aB	69,1aB	452,5aA	0,7aB	0,9aB	3,1aA	44,8aB	100aA	100aA
<b>Médias</b>	<b>58,3B</b>	<b>58,9B</b>	<b>268,6A</b>	<b>0,7B</b>	<b>0,9 B</b>	<b>2,0A</b>	<b>24,7B</b>	<b>100A</b>	<b>96,8A</b>

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras minúsculas (a,b) comparam as médias no sentido vertical e as letras maiúsculas (A,B) no sentido horizontal.



**FIGURA 3.** Aspecto de plantas de algodão do campo germinadas *in vitro* (A), da diferença individual do crescimento de plantas originárias de sementes (B) e do crescimento dos explantes quando mantidos em temperaturas de 10°C (C), 20°C (D) e 25°C (E). A, B: barra 2 cm; C, D e E: barra 1 cm.

O melhor resultado para conservação *in vitro* foi obtido com a manutenção dos explantes em meio de cultura  $\frac{1}{2}$ WPM e em câmara de crescimento com temperatura de 20°C. Verificou-se que nestas condições a taxa média de crescimento dos explantes foi de 53,1% e a sobrevivência de 100% ao final de três meses (Tabela 2 e Figura 3C-E). O meio de cultura utilizado para o experimento de conservação de *C. regium* foi o WPM, por possuir apenas 45% da concentração iônica total do meio de MS e concentrações menores de nitrato (MS 40  $\mu$ M; WPM 9,7  $\mu$ M) e amônio (MS 20  $\mu$ M; WPM 4,9  $\mu$ M). De acordo com Nunes et al. (2003), o meio WPM apresenta ainda, uma baixa concentração de nitrogênio total (14,7  $\mu$ M) comparado ao MS (60  $\mu$ M),

promovendo um crescimento mais lento dos explantes em algumas espécies.

Efeito similar foi observado por Rocha et al. (2007) na micropropagação de canjarana [*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.]. Ao comparar os meios de cultura MS e WPM, os autores observaram uma maior taxa de multiplicação (1,7) nos segmentos nodais mantidos em meio MS e 2,5  $\mu$ M BAP, em comparação a taxa de multiplicação obtida em meio WPM (1,2). No cultivo em meio WPM, as taxas de multiplicação foram inferiores a 1,2 em todos os sub-cultivos e nas duas concentrações de BAP (2,5 e 5,0  $\mu$ M) testadas. O meio WPM por suas características de menor concentrações de sais, foi utilizado com bons resultados na multiplicação e conservação de espécies nativas, como *Zeyheria montana* (Mart.)

(Bertoni, 2003) e *Lychnophora pinaster* (Mart.) (Souza et al., 2003). Pereira et al. (2003) estabeleceram um protocolo para manutenção de um banco de germoplasma *in vitro* de catuaba [*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld ex de Souza]. Os resultados mostraram que plantas cultivadas em meio de MS suplementando com 3% de sacarose e 4% de sorbitol, mantidas a temperatura de 18°C e fotoperíodo de 12 horas, podem permanecer no mesmo frasco por 6 meses, sem substituição do meio de cultura. Sob estas condições o desenvolvimento dos explantes foi lento e a porcentagem média de sobrevivência de 95%. Bertoni (2003) mostrou que plantas de bolsa-de-pastor (*Zeyheria montana* Mart.) podem ser conservadas em banco de germoplasma *in vitro* à temperatura de 18°C, em meio de cultura WPM suplementado com 2% de sacarose e 4% de sorbitol. Nestas condições o índice de crescimento das plantas foi baixo e com sobrevivência superior a 95%.

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitiram concluir que, a temperatura de 20°C associado ao meio de cultura ½ WPM é uma condição eficiente para a manutenção e conservação de explantes de *C. regium* sob regime de crescimento mínimo *in vitro*.

#### AGRADECIMENTO

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo aporte físico e financeiro concedido. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio ao grupo de pesquisa.

#### REFERÊNCIA

ALHO, C.J.R. Desafios para a conservação do cerrado, em face das atuais tendências de uso e ocupação. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. **Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2005. p.15-22.

BERTONI, B.W. **Propagação, variabilidade genética e química de *Zeyheria montana* Mart.** 2003. 165p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, Jaboticabal.

BRITO, M.A. A estratégia de conservação *in situ* (Unidades de conservação) e a conservação das plantas medicinais. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J.L.D. **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. Cuiabá: UNICEN, 2003, p.137-48.

CASTRO, D.B. et al. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato do *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.6, n.3, p.15-9, 2004.

CESCHINI, L.; CAMPOS, E.G. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, n.2, p.302-5, 2006.

COELHO, M.C.F. et al. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.38-48, 2001.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA - SPI/ EMBRAPA - CNPH, 1998. 509p.

LIMA, R.V. et al. Germinação *in vitro* de urucu. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.171-7, 2007.

LIMA, D.P. et al. A flavanone glycoside from *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger. **Fitoterapia**, v.66, p.545-6, 1995.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially: feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, v.30, p.421-7, 1980.

MENDONÇA, R.C. et al. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA - CPAC, 1998. p.289-556.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.

NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagação de copaiba. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.33, p.109-20, 2004.

NUNES, W.B.; CARVALHO, S. Evaluation of the mutagenic potential of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.545-9, 2003.

NUNES, G.P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.18-27, 2003.

OLIVEIRA, C.C. et al. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. **Fitoterapia**, v.67, n.2, p.176-7, 1996.

PEREIRA, A.M.S. et al. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: conservation of an endangered medicinal plant. **Planta Medica**, v.69, p.571-3, 2003.

PEREIRA, A.M.S. Cultura de tecidos de plantas medicinais. In: COELHO, M.F.B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J.L.D. **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. Cuiabá: UNICEN, 2003. p.183-94.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHÁVEZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. 923p.

ROCHA, S.C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v.31, n.1, p.43-50, 2007.

SOUZA, A.V. et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, ed. esp., p.1532-8, 2003.

TOLEDO, M.I. et al. Acute and subacute toxicity of *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger. **Phytotherapy Research**, v.14, p.359-61, 2000.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores - SANEST**. Pelotas: UFPEL, 1984. 138p.