

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *KIELMEYERA CORIACEA*

I. EFEITO DAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES COMBINADAS DE BENZILAMINOPURINA E ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO NA MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS¹

EDUARDO F. ARELLO² e JOSÉ EDUARDO B. P. PINTO³

RESUMO - *Kielmeyera coriacea* Martius (Guttiferae) é uma espécie vegetal típica dos cerrados e é muito comum em Minas Gerais. É vulgarmente conhecida por "Pau-Santo". *K. coriacea* é utilizada para a fabricação de placas em revestimentos acústicos, térmicos e decorativos de ambientes, além de ser utilizada como planta medicinal. Segmentos nodais de plântulas obtidas por germinação de sementes *in vitro* receberam inóculo em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) suplementado com diversas concentrações de benzilaminopurina (BAP) (0,0 - 0,45 - 4,5 e 22,3 μM) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0 - 0,55 e 5,5 μM), em todas as combinações possíveis, num esquema fatorial 4 x 3. A máxima proliferação de brotos foi conseguida com o emprego de 22,3 μM de BAP + 0,55 μM de ANA e a maior proliferação de brotos com mais de 1,0 cm de altura ocorreu com o uso de 0,45 μM de BAP + 0,0 μM de ANA.

Termos para indexação: cultura de tecidos, micropropagação.

IN VITRO PROPAGATION OF *KIELMEYERA CORIACEA*

I. EFFECTS OF BENZYLAMINOPURINE AND NAPHTHALENOACETIC ACID ON SHOOT MULTIPLICATIONS

ABSTRACT - *Kielmeyera coriacea* Martius (Guttiferae) is a typical botanic specie from brazilian cerrados vegetation (Savanna-like vegetation). It is popularly known as "Pau-Santo". The specific characteristic of *K. coriacea* is its strong suberized bark, from which, cork the main matter for making plates used for covering acustics, thermic and decorative places, is extracted. Nodal segments of plantlets that come from germination *in vitro* were inoculated in Murashige & Skoog (1962) culture medium enriched by several concentrations of benzylaminopurine (BAP) (0.0 - 0.45 - 4.5 and 22.3 μM) and Naphthalenoacetic acid (NAA) (0.0 - 0.55 and 5.5 μM) in all possible combinations in one factorial scheme of 4 x 3. The maximum shoots proliferation was achieved with 22.3 μM BAP + 0.45 μM NAA and higher shoots proliferation with more than 1.0 cm height happened when 0.45 μM BAP + 0.0 μM NAA was used.

Index terms: tissue culture, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A principal vegetação que caracteriza o estado de Minas Gerais é o cerrado, onde o gênero *Kielmeyera* ocorre naturalmente. A espécie *Kielmeyera coriacea* Martius (Guttiferae) é apontada por Saddi (1982) e por Almeida

(1946) como uma das mais típicas, e se dispersa desde o estado da Bahia até países limítrofes como o Paraguai e a Bolívia.

Uma característica marcante de *K. coriacea*, apontada por Souza (1947), é a sua casca fortemente suberificada da qual se extrai a cortiça, principal matéria-prima para a fabricação das placas utilizadas em revestimentos acústicos, térmicos e decorativos de ambientes.

Do ponto de vista de planta medicinal, produz um composto orgânico do grupo das xantonas, a Osajaxantona, que, segundo Lopes et al. (1977), possui propriedades cercaricidas e de repelência das cercárias de *Schistosoma mansoni*.

¹ Aceito para publicação em 26 de maio de 1992.

² Eng.-Agr. M.Sc., Coop. Agrop. Holambra, Caixa Postal 170, CEP 13825, Jaguariúna, SP.

³ Eng.-Agr., Ph.D., Prof.-Adjunto IV, Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200, Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

ni, o causador da "barriga-d'água", doença que aflige milhões de brasileiros. Pio Corrêa (1952) diz, ainda, que *K. coriacea* produz uma resina usada na medicina popular contra a dor de dentes, como tônica e como emoliente.

Do ponto de vista de planta medicinal, produz um composto orgânico do grupo das xantonas, a Osajaxantona, que, segundo Lopes et al. (1977), possui propriedades cercaricidas e de repelência das cercárias de *Schistosoma mansoni*, o causador da "barriga-d'água", doença que aflige milhões de brasileiros. Pio Corrêa (1952) diz, ainda, que *K. coriacea* produz uma resina usada na medicina popular contra a dor de dentes, como tônica e como emoliente.

Devido ao seu interesse econômico, *K. coriacea* vem sendo vítima de uma exploração predatória que, aliada à expansão agrícola nos campos de cerrado, a está tornando extinta em muitas regiões, onde, outrora, era abundante. Sua propagação dá-se, predominantemente, por sementes, mas seu desenvolvimento é lento e a desuniformidade genética de seus descendentes é muito grande. A cultura de tecidos vegetais oferece um método alternativo de propagação assexuada para esta espécie. A vantagem deste método surge na medida em que é capaz de promover um maior grau de multiplicação, originando indivíduos uniformes geneticamente, em pouco espaço e tempo.

De um modo geral, a micropropagação vegetativa em espécies florestais tem sofrido significativos progressos durante os últimos anos. Abbott (1977 e 1978) elaborou uma extensa lista de espécies, das quais a grande maioria ocorre em florestas de clima temperado, que são propagadas, atualmente, por métodos de cultivo *in vitro*.

Os métodos mais comumente empregados para a micropropagação de espécies florestais consiste em regenerar plantas a partir de meristemas pré-existentes e desenvolvimento de gemas (Durzan 1980 e Thorpe 1988).

Vários trabalhos foram feitos com *Eucalyptus*, como os de De Fossard (1974), Dicello & Duhox (1984), Durand-Cresswell & Nitsch (1977) e Gonçalves (1983), em termos de estabelecimento e cultura de brotos. As taxas de

multiplicação conseguidas variaram de acordo com o meio de cultura empregado, com a espécie utilizada, com o estado fisiológico do explante, e com as condições ambientais de cultivo. Diferentes meios de cultura, tais como os meios de Murashige & Skoog (1962), De Fossard (1976) e "wood plant medium", proposto por Smith & McCown (1983), e suas modificações, foram utilizadas na cultura de brotos de *Eucalyptus*.

Na maioria das vezes, a indução da multiplicação de brotações é feita em meio solidificado com ágar, embora Gupta et al. (1980) comprovem que determinadas espécies requerem meio líquido para estimular a proliferação. As brotações oriundas destas técnicas podem ser removidas do explante original e receber inóculo num novo meio de cultura, para continuar sua proliferação, ou num meio contendo auxinas, geralmente ácido indolbutírico, para enraizar e formar uma planta completa.

Tendo em vista as considerações mencionadas e nenhum trabalho em micropropagação dessa espécie, o presente trabalho procura determinar os efeitos de diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na maximização da proliferação de brotos *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*, bem como na produção de brotos com mais de 1,0 cm de altura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes utilizados no presente trabalho consistiram de segmentos nodais obtidos de plântulas provenientes da germinação de sementes *in vitro*. Estas sementes foram coletadas no município de Campo do Meio, MG, em abril de 1988 e armazenadas em câmara frigorífica a 10°C e 50% de umidade relativa, até receberem o inóculo em junho de 1989.

Após a retirada das sementes da câmara frigorífica estas passaram pelas seguintes etapas: a) lavagem em água corrente por 15 minutos; b) pré-germinação no escuro em solução aquosa com 20 mg de ácido giberélico/100 ml durante 12 horas; c) retirada da casca; d) nova lavagem em água corrente por 15 minutos; e) esterilização, em câmara de fluxo laminar, com álcool 70% (30 segundos de imersão) e solução 0,2% de hipoclorito de sódio com duas gotas de Tween 20 por 100 ml de água destilada (20 minutos de imersão); f) lavagem com água destilada e autoclavada, abundan-

temente, por cinco vezes e g) inoculação em tubos de ensaio com meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) onde foram empregados apenas os sais e cujas concentrações foram reduzidas à metade. Este meio foi suplementado com 7,0 g/l de ágar, 5 mg/l de ácido giberélico e 30 g/l de sacarose.

Quarenta e cinco dias depois da inoculação das sementes, foram coletados os segmentos nodais e o primeiro segmento nodal a partir da junção cotiledonar de cada plântula.

Estes segmentos nodais foram transferidos para novo meio de cultura Murashige & Skoog (1962), usado integralmente e suplementado com diversas concentrações de benzilaminopurina (0,0 - 0,1 - 1,0 e 5,0 mg/l) e ácido naftalenoacético (0,0 - 0,1 e 1,0 mg/l), em todas as combinações possíveis, num esquema fatorial 4 x 3, totalizando doze tratamentos e 36 parcelas compostas. Cada parcela foi composta por três tubos de ensaio com um segmento nodal por tubo. Os segmentos nodais foram cultuados durante 45 dias, utilizando tubos de ensaio 2,5 x 15 cm contendo 10 ml de meio de cultura e vedados com tampa plástica.

As culturas de germinação de sementes e de segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento sob condições ambientais controladas, tais como, fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro, temperatura de $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de 3.000 lux dada por lâmpada do tipo Growlux.

O material empregado no experimento, como vidrarias, pinças e bisturis, foram cuidadosamente lavados com sabão líquido neutro comercial e esterilizados, posteriormente, em estufa tipo hospitalar. Já o meio de cultura foi autoclavado, logo após o seu preparo, a 120°C e $1,3 \text{ kg/cm}^2$ durante 15 a 20 minutos.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se os níveis de significância de 1 a 5% para o teste F. As médias foram comparadas aplicando-se o teste de Tukey ao nível de 5%. Para efeitos de análise estatística, os dados foram transformados para $\text{arc. sen } \sqrt{x + 0,5}$. Os parâmetros avaliados no teste experimental foram: a) número total médio de brotações produzidas e b) percentagem média de brotações com mais de 1,0 cm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os reguladores de crescimento benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) parecem interagir no que diz respeito não só à produção total de brotações em *Kielmeyera* co-

riacea, mas também à produção de brotações com mais de 1,0 cm (Tabelas 1 a 4). Esta interação entre os dois reguladores de crescimento fazem com que a *K. coriacea* seja considerada como uma daquelas inúmeras plantas que, para uma maior proliferação de brotações, Skoog & Miller (1957) trata como dependentes não só de citocininas mas também de auxinas.

TABELA 1 - Resumo da análise de variância para micropropagação (número total médio de brotações) de *K. coriacea* em diversas concentrações combinadas de reguladores de crescimento.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP	3	2,5209**
ANA	2	0,1499**
BAP X ANA	6	0,2717**
Resíduo	24	0,0139
Total	35	

** P < 0,01

TABELA 2 - Resumo da análise de variância para micropropagação (número total médio de brotações) de *K. coriacea* referente aos desdobramentos da interação entre os reguladores de crescimento.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP:ANA (0,0 mg/l)	3	0,8266**
BAP:ANA (0,1 mg/l)	3	1,2733**
BAP:ANA (1,0 mg/l)	3	0,9658**
Resíduo	24	0,0138
ANA:BAP (0,0 mg/l)	2	0,0000
ANA:BAP (0,1 mg/l)	2	0,2721**
ANA:BAP (1,0 mg/l)	2	0,0729*
ANA:BAP (4,0 mg/l)	2	0,6202**
Resíduo	24	0,0139

* P < 0,05

** P < 0,01

TABELA 3 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1,0 cm) de *K. coriacea* em diversas concentrações combinadas de reguladores de crescimento.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP	3	0,9080**
ANA	2	0,2943**
BAP X ANA	6	0,1545**
Resíduo	24	0,0075
Total	35	

** P < 0,01

TABELA 4 - Resumo da análise de variância para micropropagação (percentagem média de brotações com mais de 1,0 cm) de *K. coriacea* referente aos desdobramentos da interação entre os reguladores de crescimento.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
BAP:ANA (0,0 mg/l)	3	0,8088**
BAP:ANA (0,1 mg/l)	3	0,3053**
BAP:ANA (1,0 mg/l)	3	0,1030**
Resíduo	24	0,0075
ANA:BAP (0,0 mg/l)	2	0,0000
ANA:BAP (0,1 mg/l)	2	0,7124**
ANA:BAP (1,0 mg/l)	2	0,0054
ANA:BAP (4,0 mg/l)	2	0,0400 *
Resíduo	24	0,0075

* P < 0,05

** P < 0,01

Além de Skoog & Miller (1957), outros pesquisadores reforçam a hipótese de que a proliferação de brotos *in vitro* pode ser maximizada, como aconteceu com *K. coriacea*, com o emprego conjunto de dois ou mais grupos de reguladores de crescimento. A nogueira *Juglans nigra*

somente prolifera bem em presença de BAP e de ácido indolbutírico (IBA), outra auxina empregada em vários trabalhos (Heile - Sudhoul et al. 1986). Para *Citrus sinensis*, a maximização da produção de brotações ocorreu quando BAP e ANA apareciam combinados no meio de cultivo (Pasqual & Ando 1989). É interessante ressaltar que os níveis em que estes hormônios devem aparecer para proporcionar a maior quantidade de brotos emitidos, variam de acordo com o genótipo da planta considerada, e que devem ser determinadas, para cada caso, experimentalmente. Isto torna difícil estabelecer comparações mais estreitas entre os níveis de hormônios que levaram aos resultados obtidos com *K. coriacea*, com os já determinados para as demais espécies citadas em literatura. De modo geral, as concentrações das citocininas são sempre superiores às das auxinas, o que acaba por proporcionar maior taxa de multiplicação. Quando o contrário se verifica, isto é, quando as concentrações das citocininas são inferiores às das auxinas, é comum o surgimento de raízes. Em *K. coriacea*, a associação de 0,1 mg/l de BAP e 1,0 mg/l de ANA, adicionados ao meio de cultura proporcionou a formação de raízes em 76% das repetições correspondentes ao referido tratamento.

Para *K. coriacea*, a exemplo do que aconteceu com o aparecimento de raízes, a combinação de 5,0 mg/l de BAP e 0,1 mg/l de ANA, de modo geral, foi capaz de proporcionar a maior emissão de brotações, isto é, 6,3 brotações novas por explante inicial, em média (Tabela 5). Uma boa proliferação de brotos pode ser conduzida, ainda, com o emprego conjunto de 1,0mg/l de BAP e 1,0 mg/l de ANA, qual seja, 5,7 novas brotações, em média.

Algumas observações oportunas devem ser feitas quanto à qualidade destas novas brotações assim originadas. Embora numerosas, estas brotações são atrofiadas e pouco desenvolvidas, o que as torna nada semelhantes ao material que lhes deu origem. Suas folhas são aciculadas, pequenas e disformes, seus internódios, extremamente curtos, e raramente tais brotos chegam a atingir 1,0 cm de altura. Ao que tudo indica, estas observações coincidem com as fei-

TABELA 5 - Número total médio de brotações produzidas através da cultura *in vitro* de segmentos nodais de plântulas de *Kielmeyera coriacea* Martius, em meio Murashige & Skoog (1962) suplementado com BAP e ANA.

BAP (mg/l)	ANA (mg/l)		
	0,0	0,1	1,0
0,0	1,0 Ab	1,0 Ad	1,0 Ac
0,1	4,5 Aa	3,0 Bc	2,3 Bb
1,0	4,3 Ba	4,7 ABb	5,7 Aa
5,0	3,7 Ba	6,3 Aa	2,7 Cb

Obs.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de ANA e minúscula, para níveis de BAP) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.

tas por Von Arnold (1989), quando salientou o fato de que, em determinadas situações, as citocininas deixam de ser benéficas e passam a ser malélicas ao desenvolvimento de materiais cultivados *in vitro*. A espécie *K. coriacea* parece mostrar-se sensível a determinadas concentrações de BAP. Assim, 5,0 mg/l de BAP, apesar de terem sido interessantes para a produção de novas brotações, foram deletérios para a qualidade destas mesmas brotações.

O tempo de exposição dos explantes aos vários níveis de BAP empregados neste experimento foi de 45 dias e, segundo as hipóteses de Vogelmann et al. (1984), que sugerem uma absorção do hormônio diretamente proporcional à sua concentração no meio, durante todo o período de cultivo, fica fácil supor que os segmentos de *K. coriacea* cultivado sem níveis mais elevados de BAP absorvessem maiores quantidades deste. Talvez fosse recomendado, como Von Arnold (1989) e Von Arnold & Grönroos (1986) sugeriram, que o tempo de exposição do material vegetativo às altas concentrações de BAP fosse reduzido, constituindo isso um bom objeto de estudo para experimentos e estudos futuros.

A ausência total de BAP, como aparece na Tabela 5, no meio de cultura, fez com que os explantes que receberam inóculo não produzissem brotos em abundância. Na grande maioria das parcelas em que BAP não aparecia, apenas uma nova brotação era originada, fruto, talvez, de pequenas quantidades de citocininas endógenas do material inoculado. Aqui está um fato que vem reforçar ainda mais a idéia de que as citocininas são essenciais ao processo de proliferação de brotos e coincidem com vários resultados encontrados na literatura. Nestas mesmas parcelas, isto é, onde BAP assumia concentrações nulas, os níveis de auxinas foram promotores apenas de um leve crescimento da nova brotação.

A Tabela 5 mostra, também, que ao se utilizar 0,1 mg/l de BAP, concentrações mais baixas de ANA devem ser preferidas. Como se pode ver, para este nível de BAP o número de brotações produzidas tende a aumentar na medida em que as concentrações da auxina decrescem e chegam a atingir valores máximos quando ANA está ausente no meio, ou seja 4,5 novas brotações por explante inicial, em média. Embora este valor seja algo inferior ao de 6,3 brotações produzidas com 5,0 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA, ou mesmo 5,7 brotações com o uso de 1,0 mg/l de BAP e ANA a qualidade dos brotos foi superior. Esbarra-se, aqui, num ponto bastante interessante: Nem sempre o tratamento hormonal que proporciona a maior taxa de multiplicação proporciona, também a melhor percentagem de brotos de boa qualidade, ou mesmo brotos com mais de 1,0 cm de altura. O inverso desta situação, qual seja, o tratamento que mostrou ser o mais indicado para a formação de brotos com mais de 1,0 cm e de boa qualidade, pode não ser o mais recomendado para uma maior multiplicação de brotos. Um "meio-termo", portanto, deve ser estabelecido. Um mesmo tratamento deve produzir uma melhor proliferação de brotos, ao mesmo tempo em que deve garantir maior formação de rebentos de boa qualidade. A ausência de BAP no meio de cultivo (Tabela 6), independentemente das concentrações de ANA utilizadas, propiciou o melhor resultado quanto ao tamanho dos bro-

TABELA 6 - Percentagem média de brotações com mais de 1,0 cm produzidas através da cultura *in vitro* de segmentos nodais de plântulas de *Kielmeyera coriacea* Martius, em meio Murashige & Skoog (1962) suplementado com BAP e ANA.

BAP (mg/l)	ANA (mg/l)		
	0,0	0,1	1,0
0,0	100% Aa	100% Aa	100%
0,1	89,3% Ab	77,7% Bb	36,1% Cb
1,0	11,8% Ac	10,8% Ac	8,9% Ab
5,0	13,9% Ac	11,9% Ac	5,5% Bc

Obs.: As médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de ANA e minúscula, para níveis de BAP) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.

tos (100%), muito embora, como já foi discutido em parágrafo anterior, tenha concorrido para a pior taxa de multiplicação (1,0 broto em média). Uma excelente produção de brotos vigorosos foi conseguida com a administração de 0,1 mg/l de BAP ao meio, principalmente quando a concentração da auxina foi nula. Em média, 89,3% das 4,5 novas brotações originadas por explante inicial eram robustas, normais, de boa qualidade e com altura superior a 1,0 cm. Quando ANA assumiu valores de 0,1 mg e 1,0 mg/l, a média percentual para brotações com tais características mostrou decréscimos acentuados, ou seja, 77,7% das 3,0 novas brotações, e 36,1% das 2,3 novas brotações, respectivamente. As demais combinações entre BAP e ANA testadas apresentaram resultados muito aquém dos acima discutidos. Os 5,0 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA e 1,0 mg/l de BAP + 1,0 mg/l de ANA que tinham proporcionado ótimas taxas de multiplicação (6,3 e 5,7 respectivamente) tiveram péssimo desempenho na produção de rebentos com mais de 1,0 cm, beirando a faixa dos 10% (11,9% e 8,9% mais precisamente). Isto pode ser explicado, tendo em vista a competição de nutrientes entre as brotações.

CONCLUSÕES

1. Máxima proliferação de brotos foi conseguida com o emprego de 5,0 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA.
2. A maior percentagem média de brotos com mais de 1,0 cm foi conseguida em meios desprovidos de BAP.
3. Maior proliferação de brotos com mais de 1,0 cm de altura ocorreu com o uso de 0,1 mg/l de BAP.
3. Maior proliferação de brotos com mais de 1,0 cm de altura ocorreu com o uso de 0,1 mg/l de BAP + 0,0 mg/l de ANA.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. J. Practice and promise of micropropagation of woody species. *Acta Horticulturae*, Hague, v.79, p.113-127, 1978.
- ABBOTT, A. J. Propagating temperate woody species in tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.28, p.155-162, 1977.
- ALMEIDA, G. Cortiças. *Revista Florestal*, Rio de Janeiro, v.3, n.314, p.10-24, 1946.
- DE FOSSARD, R. A. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, New Zealand, v.4, n.2, p.267-278, 1974.
- DE FOSSARD, R. A. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE. *Proceedings...* Peking: Science Press, 1976. p.425-438.
- DICELLO, N.; DUHOX, E. Organogenesis and multiplication *in vitro* of *Eucalyptus camaldulensis* - propagation via seedling callus culture. *Journal of Plant Physiology*, London, v.115, n.3, p.177-182, 1984.
- DURAND-CRESSWELL, R.; NITSCH, C. Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. *Acta Horticulturae*, Hague, v.78, p.149-155, 1977.
- DURZAN, D. J. Prospects for the mass propagation of economically important conifers by cell and tissue culture. In: SALA, F.; PARISI, R.; CIFERRI, O. *Plant cell cultures: results and perspectives*. Elsevir: Biomedical Press, 1980. p.283-288.

- GONÇALVES, A. N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, em sistemas de culturas de células e de tecidos. **Silvicultura**, Piracicaba, v.4, n.32, p.786-787, 1983.
- GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook by tissue culture. **Plant Science Letters**, Elsevir, v.20, n.3, p.195-201, 1980.
- HEILE-SUDHOULT, C.; HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E.; GAFFNEY, G. R. *In vitro* embryonic axis and seedling shoot tip culture of *Juglans nigra* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.6, n.2, p.189-197, 1986.
- LOPES, J. L. C.; LOPES, J. N. C.; GILBERT, B.; BONINI, S. E. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, London, v.16, n.7, p.1101, 1977.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação da laranja "Valência" através da cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, n.6, p.723-726, 1989.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. [S.l.]: Imprensa Oficial, 1952. 747p.
- SADDI, N. A new combination in *Kielmeyera* (Guttiferae). U. Kingdon: University of Reading, 1982. Ph.D. Thesis.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia for Society Experimental Biology**, Cambridge, v.11, p.118-131, 1957. p.118-131, 1957.
- SMITH, M. A. L.; McCOWN, B. H. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. **Plant Science Letters**, Elsevier, v.28, n.2, p.149-156, 1983.
- SOUZA, F. P. **Tecnologia de produtos florestais**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1947. 409p.
- THORPE, T. A. Physiology of bud induction in conifers *in vitro*. In: HANOVER, J. W.; KEATHLEY, D. E. **Genetic manipulation of woody plants**. New York: Basic Life Sciences - Plenum Press, 1988. v.44, p.413-432.
- VOGELMANN, T. C.; BORNMAN, C. H.; NISSEN, P. Uptake of benzyladenine in explants of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, p.513-517, 1984.
- VON ARNOLD, S. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. **Newsletter**, Leiden, n.13, p.2-13, 1989.
- VON ARNOLD, S.; GRÖNROOS, R. Meristematic zone formation and peroxidase activity during early stages of adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. **Botanical Gazette**, Chicago, v.147, p.415-431, 1986.