



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* DE
Aniba rosaeodora Ducke (Lauraceae)

LYANA SILVA JARDIM

MANAUS – AMAZONAS

2006

LYANA SILVA JARDIM

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* DE
Aniba rosaeodora Ducke (Lauraceae)

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Manaus – Amazonas

Fevereiro – 2006

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* DE

Aniba rosaeodora Ducke (Lauraceae)

LYANA SILVA JARDIM

Engenheira agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte –
O autor”.**

JARDIM, Lyana Silva; SAMPAIO, Paulo de Tarso Barbosa; BRANDÃO, Hélio Leonardo Moura.

Propagação vegetativa *in vitro* de *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae)
Manaus: UEA\INPA, 2006.

53p.

Dissertação de Mestrado

Palavras-chave: 1. *Aniba rosaeodora* Ducke, 2. Propagação *in vitro*, 3. Reguladores de crescimento.

Sinopse:

Este trabalho aborda o estudo da propagação vegetativa de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) por meio da técnica de Cultura de Tecidos Vegetais, testando-se a aplicação dos hormônios ANA, AIA, 2,4-D, BAP e TDZ em meio de cultura, tendo como fontes de explante, brotações apicais, segmentos nodais e fragmentos foliares.

Palavras-chave: *Aniba rosaeodora* Ducke, 2. Propagação *in vitro*, 3. Reguladores de crescimento.



“Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de pequenas realizações”.

Vicente Van Gogh

*Á Deus, meus pais, familiares e amigos,
Pelo apoio, compreensão e
incentivo no decorrer deste estudo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

- *A Deus, meus pais, familiares, e amigos, por todo apoio, companheirismo e paciência, que me dedicaram no decorrer deste estudo;*
- *Ao Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio, pela amizade e orientação;*
- *Ao Dr. Eduardo Ossamu Nagao e Dr. Kaoru Yuyama pelo apoio e incentivo no decorrer de meus estudos;*
- *Ao Dr. Gil Vieira e Dra. Elisabete Brocki pelas sugestões e correções;*
- *Ao colega Hélio Leonardo Brandão pela parceria e companheirismo;*
- *À Universidade do Estado do Amazonas pelo título de mestre;*
- *À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela bolsa e incentivos dados ao projeto de minha dissertação;*
- *Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pelo apoio técnico dado a realização deste trabalho;*
- *À coordenação do Curso de mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da UEA, em especial a Prof. Dr. Marlene Matos[†], Ademir de Castro e Iselma Teixeira, pela amizade, apoio e incentivo no decorrer deste trabalho;*
- *Aos meus amigos: Alex Maciel, Silvia Brito, Maura Lúcia, Raquel, Gleide, Dirlan, Gilda, Angela Azevedo, Daniel Dutra, Daniel Menezes, Maslova e Cláudia Blair, por todo apoio e incentivo que me dedicaram sempre na minha carreira acadêmica e profissional;*
- *E a todos àqueles que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.*

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	14
2.1.1 Descrição botânica	14
2.1.2 Distribuição geográfica	15
2.1.3 Fenologia	15
2.1.4 Propagação	15
2.1.5 Uso e comercialização	16
2.2 Regeneração de plantas <i>in vitro</i>	17
2.3 Explantes	17
2.4 Organogênese e Embriogênese	18
2.5 Fatores externos que afetam o crescimento das plântulas <i>in vitro</i>	19
2.5.1 Luz	20
2.5.2 Temperatura	21
2.5.3 Umidade relativa	22
2.6 Descontaminação superficial dos explantes	23
2.7 Meios de cultura	24
2.8 Reguladores de crescimento	26
2.9 Aclimação	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODO	31

4.1	Aquisição de sementes e pré-tratamento do material vegetativo	31
4.2	Descontaminação superficial dos explantes	31
4.2.1	Ápices e segmentos nodais	32
4.2.2	Fragmentos foliares	33
4.3	Indução de brotação, enraizamento e formação de calo em ápices e segmentos nodais	35
4.4	Indução de organogênese nos fragmentos foliares	36
4.5	Aclimação das plântulas enraizadas <i>in vitro</i>	36
4.6	Análise de dados da fase de descontaminação superficial dos explantes utilizados	37
4.7	Desenho experimental e análise de dados da fase de indução de brotos, raiz e formação de calo dos ápices e segmentos nodais.	37
4.8	Desenho experimental e análise de dados da fase de indução de organogênese dos fragmentos foliares	38
4.9	Análise de dados da fase de aclimação das plântulas	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1	Desinfestação dos ápices e segmentos nodais	39
5.2	Desinfestação dos fragmentos foliares	41
5.3	Indução de brotos, raízes e calo nos ápices e segmentos nodais	42
5.3.1	Brotos	42
5.3.2	Raiz	45
5.3.3	Formação de calo	47
5.4	Indução de organogênese dos fragmentos foliares	49
5.5	Aclimação	52
6.	CONCLUSÕES	54
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Tratamentos utilizados para assepsia de ápices e segmentos nodais de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.	32
TABELA 2 Tratamentos utilizados na assepsia dos fragmentos foliares de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.	34
TABELA 3 Dose em mg.L ⁻¹ dos reguladores de crescimento (R.C.): ANA, AIA, 2,4-D e BAP, utilizados no experimento para indução de broto, raiz e calo em ápices e segmentos nodais de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.	35
TABELA 4 Dose em mg.L ⁻¹ dos reguladores de crescimento (R.C.): AIA, ANA, 2,4-D, BAP e TDZ, utilizados no experimento para indução de organogênese em fragmentos foliares de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.	36
TABELA 5 Efeito da concentração e tempo de exposição dos produtos desinfestantes utilizados no processo de assepsia em ápices e segmentos nodais de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.	39
TABELA 6 Efeito da concentração e tempo de exposição dos produtos desinfestantes utilizados no processo de assepsia em fragmentos foliares de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	41
TABELA 7 Análise de variância para os tratamentos referentes a indução de brotos em ápices e segmentos nodais de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	43
TABELA 8 Médias referentes ao número de brotos, raízes e calos formados por explante de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, obtidos <i>in vitro</i> , para os tratamentos envolvendo diferentes tipos, concentrações e combinações de reguladores de crescimento.	44
TABELA 9 Análise de variância para os tratamentos referentes a indução de raiz em ápices e segmentos nodais de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke ...	46

TABELA 10	Análise de variância para os tratamentos referentes à indução de calo em ápices e segmentos nodais de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke ..	47
TABELA 11	Análise de variância referente à indução de organogênese em fragmentos foliares de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	49
TABELA 12	Médias referentes à formação de calo em fragmentos foliares de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, obtidos <i>in vitro</i> , para os tratamentos envolvendo diferentes tipos de reguladores de crescimento	50

LISTA DE QUADROS

	Pág.
QUADRO 1 Composição química do meio MS, conforme Murashige e Skoog (1962) e suas respectivas concentrações.	25

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Zeatina	27
FIGURA 2	Cinetina	27
FIGURA 3	Tidiazuron	27
FIGURA 4	Ácido indolacético	28
FIGURA 5	Ácido indolbutírico	28
FIGURA 6	Ácido naftalenoacético	28
FIGURA 7	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético	28
FIGURA 8	Sementes de pau-rosa	31
FIGURA 9	Sementes postas para germinar em bandejas plásticas contendo areia lavada e vermiculita	31
FIGURA 10	Plântulas germinadas após 50 dias	31
FIGURA 11	Plântula de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, germinada em casa de vegetação.	33
FIGURA 12	Detalhe dos explantes utilizados no processo de assepsia. ...	33
FIGURA 13	Detalhe da poda realizada nos explantes após assepsia.	33
FIGURA 14	Detalhe de uma brotação em meio de cultura, após uma semana realizada a assepsia	33
FIGURA 15	Estufa do tipo B.O.D.	33
FIGURA 16	Sala de Crescimento.	33
FIGURA 17	Folhas maduras de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.	34
FIGURA 18	Detalhe das folhas utilizadas no processo de assepsia.	34
FIGURA 19	Detalhe dos cortes medianos, que originaram os fragmentos utilizados como fonte de explantes	34
FIGURA 20	Fragmentos foliares inoculados em placas de petri contendo meio de cultura MS	34
FIGURA 21	Expalntes incubados na sala de crescimento, após 48 horas realizada a assepsia	34
FIGURA 22	Plântula com a raiz principal medindo 10,5 cm de comprimento ...	37
FIGURA 23	Detalhe das plântulas enraizadas <i>in vitro</i>	37
FIGURA 24	Detalhe do processo de aclimação	37

FIGURA 25	Plântulas de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, alongadas <i>in vitro</i> , contendo em meio de cultura 4,0 mg.L ⁻¹ de BAP + 6,0 mg.L ⁻¹ de AIA	45
FIGURAS 26 e 27	Detalhe de brotações adventícias adquiridas em ápices e segmentos nodais da espécie	45
FIGURA 28	Ápice de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, iniciando o processo de enraizamento em meio MS, contendo 3,0 mg.L ⁻¹ de ANA, após 15 dias de incubação	47
FIGURA 29	Segmento nodal contendo três raízes após 45 dias em meio de cultura	47
FIGURA 30	Detalhe da parte aérea	47
FIGURA 31	Detalhe do enraizamento após 90 dias de incubação	47
FIGURA 32	Ápice de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, totalmente envolvido por calo ..	48
FIGURA 33	Segmento nodal <i>in vitro</i> contendo na base a formação de calo	48
FIGURA 34	Detalhe da calogênese formada na base do explante.	48
FIGURA 35	Fragmentos foliares <i>in vitro</i> , dispostos em sala de crescimento.	51
FIGURA 36	Formação de calo em fragmentos foliares de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, inoculados em meio MS, contendo 5,0 mg.L ⁻¹ de ANA	51
FIGURA 37	Detalhe da formação de calo a partir das nervuras principal e secundária, cujo meio MS, continha 5,0 mg.L ⁻¹ de ANA.	51
FIGURAS 38a e 38b	Detalhe da formação de calo em fragmentos foliares, inoculados em meio MS, contendo 5,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D, após 40 dias de incubação	51
FIGURA 39	Vista aérea do início da necrose foliar, em uma plântula de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke, após 3 dias de transplantio	52
FIGURA 40	Vista frontal	52
FIGURA 41	Plântula totalmente necrosada após 10 dias de transplantio para o substrato contendo areia, barro e vermiculita	52
FIGURA 42	Início da perda das folhas	52

RESUMO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* DE *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae). Universidade do Estado do Amazonas. Rua Carvalho Leal, N° 1777 CEP: 69055-001. Manaus - AM. JARDIM, L.S. & SAMPAIO, P.T.B. lsj.mbt@uea.edu.br ; sampaio@inpa.gov.br. Palavras chaves: *Aniba rosaeodora* Ducke; Propagação *in vitro*; Reguladores de crescimento.

O pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), é uma espécie de grande valor econômico por produzir o óleo essencial linalol utilizado pelas indústrias de perfumaria, motivando intensa exploração das populações naturais e ocasionando seu desaparecimento em áreas de fácil acesso. Em frente disso, o presente estudo, objetivou estabelecer um protocolo para sua propagação *in vitro* a partir de brotações apicais, segmentos nodais e folhas, visando desenvolver novas técnicas para sua reprodução. Primeiramente, os explantes foram submetidos a distintos processos de assepsia, utilizando solução de benomyl (4g.L⁻¹), solução de hipoclorito de sódio a 15% e 20%, acrescido de tween 20, sob diferentes tempos de exposição. Em seguida, foram inoculados em meio MS, acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose e 8g.L⁻¹ de agar, mantidos no escuro por 48 horas na B.O.D sob 26°C, e conduzidos à sala de crescimento. As brotações apicais e segmentos nodais aparentemente sadios foram submetidos à indução de broto, raiz e calo, sendo transferidos para meio de cultura contendo reguladores de crescimento: BAP (0,0 e 4,0 mg.L⁻¹), AIA, ANA e 2,4-D (0,0; 3,0 e 6,0 mg.L⁻¹), e suas respectivas combinações. O delineamento utilizado foi o D.I.C, em arranjo fatorial 9 X 2, com 18 tratamentos, cada um com 15 repetições. Para os fragmentos foliares, utilizou-se BAP, TDZ, ANA, AIA e 2,4-D (5,0 mg.L⁻¹).para indução de organogênese.foliar. O delineamento foi o em blocos ao acaso, constando de 6 tratamentos, com 8 blocos cada, sendo cada bloco com 2 repetições. Após 90 dias, as plântulas enraizadas *in vitro* foram postas em copos descartáveis cobertas por sacos de plástico transparente, e avaliadas em três tipos de substrato para o processo de aclimação. O primeiro e o segundo eram compostos por: terra-preta, barro e areia nas proporções 2:1:1 e 1:2:1 (v/v), cobertos por vermiculita, respectivamente; e o terceiro era composto somente por vermiculita.

Ao final do estudo, verificou-se que, para as brotações apicais e segmentos nodais, o processo de assepsia constando de imersões em solução de benomyl (4g.L⁻¹) durante 24 horas e solução de hipoclorito de sódio a 20% + tween 20 durante 20 minutos, foi o mais eficiente, promovendo uma média de 81,7% de sobrevivência dos explantes; Para indução de brotos, o tratamento contendo 4,0 mg.L⁻¹ de BAP + 6,0 mg.L⁻¹ de AIA, proporcionou a melhor média, 1,50 brotos/explante, seguido do tratamento com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP + 6,0

mg.L⁻¹ de ANA, cuja média foi de 1,45 brotos/explante; Para o parâmetro enraizamento, o meio contendo 3,0 mg.L⁻¹ de ANA, foi o mais eficiente, com uma média de 1,68 raízes/explante, seguido do tratamento contendo 6,0 mg.L⁻¹ de ANA, cuja média foi 1,39. Já em relação à formação de calos, todos tratamentos proporcionaram calogênese, porém, o meio contendo 4,0 mg.L⁻¹ de BAP + 6,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, foi o melhor, apresentando uma média de 1,45 calos/explante, seguido do tratamento, com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP + 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, cuja média foi 1,39. Para os fragmentos foliares, a assepsia constando de imersão em solução de benomyl (4g.L⁻¹) durante 20 horas, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 20% + 3 gotas de tween 20 durante 15 minutos, foi a melhor, promovendo uma média de 80% de sobrevivência dos explantes. Para organogênese foliar, o tratamento F3 contendo 5,0 mg.L⁻¹ de ANA e o tratamento F5 contendo 5,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, obtiveram os melhores índices de formação de calo nas folhas, ambos com média de 1,4 calos/explante. Para o processo de aclimação, nenhum dos substratos, mostrou eficiência para a adaptação as novas condições ambientais das plântulas enraizadas *in vitro*. O índice de sobrevivência foi zero para todos os tratamentos em menos de 30 dias após o transplante, onde as plântulas apresentaram necrose completa com perda de folhas, e aparecimento de fungos em algumas repetições.

ABSTRACT

IN VITRO VEGETATIVE PROPAGATION OF *Aniba rosaeodora* Ducke (Lauraceae).

Author: Lyana Silva Jardim

Adviser: Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio

Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke), is a specie of great economic value for producing the essential oil linalol, used for perfume industry, causing intense exploration of the natural populations, and its disappearance in the areas of easy access. Like this, the purpose of this study was to establish a protocol for rosewood *in vitro* propagation, using apical and nodal segments and leaves, aiming at new techniques for specie's reproduction. Firstly, the explants were submitted to differents process of disinfection, using solution of benomyl (4g.L^{-1}), solution of sodium hipoclorite in 15% and 20%, with tween 20, in differents time exposure. After the explants were inoculated in MS medium, with 30g.L^{-1} of sucrose and 8g.L^{-1} of agar added to it , and they were left in dark conditions for 48 hours in B.O.D under 26°C , and led to culture room. After, the apical and nodal segments, apparent healthy, were submitted to buds, roots and callus induction. They were transferred to culture medium containing growth regulators: BAP ($0,0$ e $4,0\text{ mg.L}^{-1}$), AIA, ANA and 2,4-D ($0,0$; $3,0$ e $6,0\text{ mg.L}^{-1}$), and their respective combinations. The design was complete randomized in arranged factorial 9×2 , with 18 treatments, each one with 15 replications. For the folial segments, were used: BAP, TDZ, ANA, AIA and 2,4-D ($5,0\text{ mg.L}^{-1}$) to induction of foliar organogenesis. The design was randomized blocks consisted of 6 treatments, each one with 8 blocks e 2 replications. After 90 days, the plantlets took root *in vitro* were transplanted in plastic glass covered for transparent plastic sack, and evaluated in three kids of substratum for the acclimatization process. The first and the second substratum contained dark soil, clay and sand in proportions 2:1:1 and 1:2:1 (v/v) covered for vermiculite respectively; and the third substratum contained for vermiculite just.

At the end of the study, the results indicated that the best process of disinfection for the apical and nodal segments was the use of benomyl solution (4g.L^{-1}) during 24 hours, following the solution of sodium hipoclorite in 20% with tween 20, during 20 minutes, with 81,7% of survival of the explants. For the buds induction, the treatment containing $4,0\text{ mg.L}^{-1}$ of BAP + $6,0\text{ mg.L}^{-1}$ of AIA, showed the best, with the average of 1,50 buds/explant, followed by the treatment with $4,0\text{ mg.L}^{-1}$ of BAP + $6,0\text{ mg.L}^{-1}$ of ANA, which the average was 1,45 buds/explant. For the rooting induction, the best medium was containing $3,0\text{ mg.L}^{-1}$ of ANA, showing 1,68 roots/explant, followed by the treatment with $6,0\text{ mg.L}^{-1}$ of ANA, showing an

average of 1,39. For the callus induction, all the treatments formed callus, therefore, the medium containing 4,0 mg.L⁻¹ of BAP + 6,0 mg.L⁻¹ of 2,4-D, showed the best result, with 1,45 callus/explant, followed by the treatment with 4,0 mg.L⁻¹ of BAP + 3,0 mg.L⁻¹ of 2,4-D, of which an average was 1,40 callus/explant. For the folial segments, the best disinfection was the use of benomyl solution (4g.L⁻¹) during 20 hours, followed by the solution of sodium hipoclorite in 20% with three drops of tween 20, during 15 minutes of exposure, showing 80% of survival of the explants. For the folial organogenesis, both treatments, F3 containing 5,0 mg.L⁻¹ of ANA and F5 containing 5,0 mg.L⁻¹ of 2,4-D, presented the best results for the callus induction, with an average of 1,4 callus/explant (both treatments). For the acclimatization process, none of the substratum presented efficiency for the plantlets adaptation in the new environmental conditions. The survival percentage of the explants for all the treatments was zero. In less of 30 days after the transplant, the plantlets presented complete necrose with partial lost of the leaves, and appearance of fungi in some replications.

Key words: 1. *Aniba rosaeodora* Ducke; 2. *In vitro* propagation; 3. Growth regulators.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos os processos de desmatamento têm proporcionado perdas significativas na biodiversidade amazônica. A flora rica em espécies medicinais, florestais e frutíferas, vem sofrendo intensa exploração extrativista reduzindo o fornecimento de matéria-prima para indústrias, e, conseqüentemente, de suas populações naturais, tornado-as parte das espécies estimadas de extinção, como a *Aniba rosaeodora* Ducke, segundo a lista oficial divulgada pelo IBAMA, em 3 de abril de 1992.

Aniba rosaeodora Ducke, popularmente conhecida como pau-rosa, é uma espécie florestal pertencente à família das Lauraceas, considerada de grande valor econômico para o país. A árvore é explorada principalmente por produzir o óleo essencial Linalol, obtido a partir da destilação de sua madeira, folhas e raízes, utilizado pelas indústrias de perfumaria como fixador.

Apesar dessa espécie ser propagada sexuada e assexuadamente, apresenta baixa e irregular produção de sementes, que aliada à elevada predação por pássaros, insetos e roedores, limita a recomposição das populações naturais das matas e de plantios *ex situ*, fazendo da técnica de regeneração de plantas *in vitro*, uma alternativa, para produção de mudas da espécie.

A técnica consiste, basicamente, em cultivar um tecido ou órgão do vegetal, em um meio nutritivo artificial em condições assépticas e controladas, possibilitando o ótimo estado fitossanitário das plantas (Torres e Caldas, 1990), e a obtenção de clones idênticos à planta matriz. Além da técnica propagar, recupera plantas livres de vírus, conserva o genótipo da espécie, permite o intercâmbio de germoplasma e auxilia programas de melhoramento através da transformação genética de plantas, permitindo-nos obter um grande número de clones selecionados e uniformes, em curto espaço de tempo (Murashige, 1974; Grout, 1990).

Considerada uma técnica biotecnológica, a regeneração de plantas *in vitro* vem assumindo um papel importante na propagação em larga escala de espécies de interesse econômico, principalmente para aquelas caracterizadas por um longo período de maturação, baixa viabilidade de sementes, e de difícil propagação através dos métodos convencionais.

Como as espécies nativas da região não apresentam técnicas adequadas de propagação clonal, a cultura de tecidos surge como uma alternativa praticável dentro deste contexto.

Hoje, diversas são as espécies florestais das quais são obtidos resultados positivos. No que se refere a esta técnica, eucaliptus é um exemplo. Isto indica que a propagação *in*

vitro de pau-rosa, utilizando brotações apicais, segmentos nodais e folhas, pode tornar-se um meio para reprodução, conservação e utilização do potencial econômico desta espécie, agregando valores para sua comercialização e multiplicando genótipos selecionados disponíveis para produtores de mudas e plantios *ex situ*, recuperando assim, florestas nativas da região.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Aniba rosaeodora* Ducke

2.1.1. Descrição Botânica

A *Aniba rosaeodora* Ducke, é uma espécie florestal pertencente à família das Lauraceas, conhecida mais comumente como pau-rosa, mas também como: pau-rosa-itaúba, pau-rosa mulatinho no Brasil; rosewood na Guiana; bois-de-rose, bois-de-rose femelle na Guiana Francesa e enclit-rosenhout no Suriname.

É uma árvore de grande porte, podendo atingir até 30 m de altura por 2 m de diâmetro. Possui tronco reto e cilíndrico com casca pardo-amarelada ou avermelhada que se desprende facilmente em grandes placas (Ducke, 1938; Kubitzki e Renner, 1982).

Suas folhas são obovada-elípticas ou lanceoladas, possuem base obtusa e imediatamente arredondada, com o ápice bastante acuminado e de margens planas ou levemente recurvadas. A superfície superior é glabra, coriácea e verde escura e a inferior levemente pubescente e amarela pálido (Ducke, 1938; Kubitzki e Renner, 1982).

A inflorescência possui forma de uma panícula sub-terminal, com múltiplas flores localizadas nas axilas das brácteas caducas ou das folhas persistentes, densamente ferrugínea-tomentosa, com 4 a 17 cm de comprimento (Ducke, 1938; Kubitzki e Renner, 1982).

Sua flor é hermafrodita, pequena, de cor ferrugínea-tomentosa. O perianto tem 6 sépalas eretas podendo ser iguais ou não. Há comumente 9 estames, e suas anteras possuem válvulas que se abrem geralmente para cima liberando o pólen. O pistilo é tomentoso. O ovário é elipsóide ou ovóide, glabro ou piloso incluindo o tubo floral (Ducke, 1938; Kubitzki e Renner, 1982).

Os frutos são do tipo baga, com uma cúpula cônica espessa, de superfície externa áspera de cor marrom-esverdeada, e superfície interna glabra de cor marrom. A baga é de forma obovóide a ovóide, de cor verde quando imatura e roxa-escura quando madura, contendo apenas uma semente (Ducke, 1938; Kubitzki e Renner, 1982).

Sua semente é do tipo ovóide, com tegumento delgado, liso e opaco, de cor marrom-clara com estrias longitudinais marrom-escuras. Possui 2 cotilédones grandes, convexos, duros, lisos, de cor creme. O eixo embrionário é reto, central, próximo à base, com 3 mm de comprimento também de cor creme (Ducke, 1938; Kubitzki e Renner, 1982).

2.1.2. Distribuição geográfica

O pau-rosa ocorre na Guiana Francesa, distribuindo-se ao longo do escudo das Guianas, nas bacias dos Rios Tapanahoni e Gonini no Suriname e na Região Amazônica da Venezuela, Colômbia e Peru, mais precisamente em Iquitos, Rio Napo e Pucalpa (Costa *et al.*, 1995). No Brasil, segundo a Sudam (1972), a espécie ocorre desde o Estado do Amapá no nordeste amazônico, seguindo as duas margens do Rio Amazonas e tributários até o Peru à noroeste. Ela ocorre também desde a região centro-sul do Estado do Pará até a bacia do Rio Purus no sul do Estado do Amazonas (Ducke, 1938; Mitja e Lescure, 1996).

Em estudos recentes de May e Barata (2004), é relatado que populações de pau-rosa podem ser encontradas nas proximidades do Velho Buriti, Maués, Jamundá e nos Rios dos Oyapoc. A espécie pode ser encontrada tanto em floresta de terra firme úmida como também em área de campinarana, presente nas regiões norte e central da Amazônia (Kubitzki e Renner, 1982).

2.1.3. Fenologia

Estudos fenológicos mostraram que na Amazônia Central há uma grande variação para as fenofases de floração e frutificação entre os indivíduos da espécie, não apresentando necessariamente uma frutificação anual (Sampaio *et al.*, 2003).

Segundo estudos de Spironello *et al* (2001), há dois picos de floração para as árvores de um plantio na Reserva Adolpho Ducke em Manaus: o primeiro, no final de abril a início de maio, e o segundo, no final de junho.

2.1.4. Propagação

O pau-rosa pode ser propagado via sementes ou assexuadamente, por meio de estaquia (Rosa *et al.*, 1999; Vieira, 1972). A produção de mudas feita por semeadura, pode ser realizada diretamente em sacos plásticos individuais ou em sementeiras para posterior repicagem. As sementes não apresentam dormência e são recalcitrantes, não tolerando, portanto, o dessecamento, devendo ser armazenadas com um teor de água acima de 40%. Na semeadura podem ser colocadas de 1 a 2 cm de profundidade sem interferir na taxa de germinação, porém o grau de maturação dos frutos influencia no processo de germinação.

Sementes provenientes de frutos mais maduros, de coloração roxa escura, apresentam maior percentagem de germinação (Rosa *et al.*, 1999).

O pau-rosa é uma espécie que não exige substrato específico, porém, o desenvolvimento das mudas em viveiro é favorecido, quando as sementes são colocadas em substrato organo-arenoso aliado a um sombreamento entre 30 a 50%, pois nestas condições, são simulados sítios preferenciais de regeneração natural em clareiras (Rosa *et al.*, 1997; Marques *et al.*, 1999).

Segundo estudos de Sampaio (1987), o pau-rosa também pode ser propagado assexuadamente por meio de estaquia. Em suas pesquisas, ramos juvenis da espécie sem nenhum tratamento hormonal, enraizaram em média 70%, favorecendo desta forma, possibilidades de seleção de material de alta qualidade para plantações experimentais e comerciais de pau-rosa.

2.1.5. Uso e Comercialização

O uso principal do pau-rosa é a extração de seu óleo essencial, que é constituído principalmente por um metabólito secundário conhecido como linalol, substância esta usada como fixadora de perfumes pelas grandes multinacionais estrangeiras.

Sua madeira possui ainda, usos secundários muito raros na indústria madeireira, pois é fácil de se trabalhar e permiti a confecção de acabamentos esmerados (Loureiro *et al.*, 1979).

O comércio do óleo essencial do pau-rosa teve início historicamente, na Guiana Francesa, no Amapá e no Pará. Hoje, este óleo é obtido somente do Brasil, e o único porto de exportação é o de Manaus, no Estado do Amazonas. As operações de colheita e destilação são limitadas nos municípios de Parintins, Rio Madeira, Presidente Figueiredo, Manicoré e Maués (May e Barata, 2004).

Apesar do linalol estar presente em todas as partes da árvore, Araújo *et al* (1971) indicam que o rendimento para a extração do óleo é de 1,1% da biomassa da madeira e 2,4% das folhas, porém, o óleo, ainda é extraído basicamente da madeira, o que promove uma redução drástica de populações naturais da espécie.

Atualmente os principais países importadores do pau-rosa são: Estados Unidos, Alemanha, França, Espanha, Países Baixos e Reino Unido (Ohashi, *et al.*, 1997).

Projetos de pesquisa interinstitucionais investigam possibilidades prováveis para a realização de um manejo sustentável do pau-rosa. Estudos recentes mostram que podas realizadas na copa das árvores estimulam o rebrotamento, tornando possível uma produção

de óleo a partir de galhos e folhas, reduzindo, assim, a necessidade da exploração inteira da árvore, indicando que o método pode ser considerado como uma alternativa para o manejo sustentável da espécie (Spironello *et al.*, 2001).

2.2. Regeneração de plantas *in vitro*

Apesar da grande utilização da regeneração de plantas *in vitro* em processos biotecnológicos, pouco ainda se conhece a respeito dos mecanismos envolvidos na aquisição de competência para regeneração de plantas. O que se pode dizer é que todos os processos tecnológicos são derivações de conhecimentos básicos adquiridos em vários campos da ciência, como a fisiologia e a genética vegetal, e, mais especificamente, a sub-área: desenvolvimento (Peres, 2002).

O que se sabe ao certo, é que, a regeneração de plantas *in vitro*, baseia-se na capacidade da totipotência celular, isso significa que, células isoladas não diferenciadas, órgãos ou tecidos vegetais, quando cultivados em um meio de cultura asséptico apropriado, podem dividir-se indefinidamente, e até diferenciar-se, formando parte da planta, ou então, a planta inteira, multiplicando e clonando milhares de indivíduos num curto espaço de tempo (Ramalho *et al.*, 1997).

Hoje a aplicação comercial desta técnica, concentra-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas, seguindo posteriormente, as lenhosas, principalmente as árvores-elite de essências florestais de rápido crescimento, como a andiroba e o eucaliptus (Grattapaglia e Machado, 1998).

2.3. Explantes

Na terminologia da cultura de tecidos, explante é qualquer tecido oriundo de uma planta capaz de iniciar uma cultura *in vitro*, podendo ser ele, um ápice caulinar ou radicular, uma gema axilar, um segmento nodal, um fragmento foliar, uma antera, um ovário ou embrião, e etc (Cid, 2002).

Tais explantes podem formar plantas inteiras diretamente, ou passar por uma etapa intermediária de calo antes de formá-las. Esse calo, conceitualmente, é a aglomeração de células não diferenciadas em contínua proliferação celular, que quando cultivados em meio de cultura apropriado, acrescido com reguladores de crescimento, propiciará a formação de brotos, raiz ou até mesmo de frutos (Cid, 2002). Esse desenvolvimento é dado devido a dois

tipos de processos de regeneração: a organogênese ou embriogênese, muito característicos na regeneração de plantas *in vitro* (Peres, 2002).

Teoricamente qualquer tecido pode ser utilizado como explante. Porém, na seleção deste, deve-se levar em consideração, àquele que possui maior proporção de tecido meristemático, ou que tenha maior capacidade de expressar a totipotência celular (Grattapaglia e Machado, 1998).

Em estudos de Dantas *et al.* (2002), com uma cultivar de pereira denominada Housui, os autores verificaram que os ápices desta espécie promoveram maior média de brotos por explante (3,2 brotos) do que os seus meristemas, cuja média foi de 1,5 brotos por explante. O fato confirmou, conseqüentemente, que a formação de plântulas *in vitro*, é facilitada com a utilização de ápices caulinares, pois eles possuem estrutura mais definida que o meristema, uma vez que o último nem sempre resulta na formação de uma plântula, órgão ou tecido.

Já Murashige (1974), observou que a capacidade de formação de parte aérea em segmentos nodais de fumo, decresce com o aumento da distância em relação ao ápice. Porém Yu e Meredith (1986), observaram, em diversas variedades de videira (*Vitis vinifera* L.), que a sobrevivência e a multiplicação *in vitro*, foram maiores em explantes de gemas laterais do que os isolados de gemas apicais, o que nos leva, desta forma, a realizar mais estudos para o estabelecimento de protocolos de micropropagação, utilizando diferentes tipos de explantes, com as inúmeras variedades de espécies vegetais.

2.4. Organogênese e Embriogênese

Nos dois processos de regeneração: organogênese e embriogênese, existe a necessidade do estabelecimento de células competentes no explante inicial. Tanto as células meristemáticas quanto as células embriogênicas, podem se formar posteriormente ou estar pré-existentes no explante (Peres, 2002).

Se o explante possuir células meristemáticas ou embriogênicas, ocorrerá organogênese direta ou embriogênese direta, respectivamente. Porém, quando o explante possuir a necessidade de desdiferenciar-se, com a conseqüente formação de calo, prévia ao estabelecimento das células componentes, ocorrerá organogênese ou embriogênese indireta (Peres, 2002).

Desta forma, podemos dizer, que, a organogênese em cultura de tecidos vegetais, é a formação de órgãos *in vitro*, a partir de meristemóides: células capazes de se dividirem ativamente e produzir precursores de tecidos primários de órgãos, processo em geral,

estimulado por citocininas. Neste processo de regeneração, será denominada *direta*, quando o desenvolvimento de um órgão ou da plântula inteira, partir diretamente do tecido do explante, sem passar por fase de calo; e será denominada *indireta*, quando houver o desenvolvimento de órgãos a partir de uma massa não diferenciada de células, ou calo, originado do explante (Borém e Vieira, 2005).

Já a embriogênese somática, é dada pelo processo de diferenciação de embriões somáticos a partir de tecidos vegetais ou, mais usualmente, de calos derivados de explantes, em geral embrionários. Neste processo, a forma *direta* se dará pela formação de embriões somáticos, em cultura *in vitro*, sem passar pela fase de calo. E a forma *indireta* se dará pela formação de embriões somáticos, em cultura *in vitro*, a partir de calos oriundos de explantes (Peres, 2002).

2.5. Fatores externos que afetam o crescimento das plântulas *in vitro*

A propagação *in vitro* pode ser vista como um cultivo realizado numa estufa ou câmara de crescimento em miniatura, e os explantes cultivados, como segmentos vegetativos, comparados com os de estaquia. Contudo, este ambiente físico *in vitro* é bastante diferente quando comparado ao ambiente de uma estufa convencional, pois raramente promoverá problemas fisiológicos e patológicos para as plantas cultivadas no sistema convencional (Debergh and Maene, 1984). Em frente disso, estudos mais específicos referentes a estes aspectos devem ser mais enfocados para se entender melhor o desenvolvimento destes explantes em sistemas *in vitro*.

Segundo Aitken-Christie *et al.* (1995), o ambiente físico do sistema *in vitro* é caracterizado principalmente por ter: alta umidade relativa (UR); temperatura constante, geralmente estipulada de acordo com o *habitat* natural da espécie trabalhada; alta taxa de CO₂; altas concentrações de açúcar, sais e reguladores de crescimento no meio de cultura; acumulação de substâncias tóxicas; e ausência de microrganismos. Estas condições quando controladas, raramente causam baixas taxas de transpiração, fotossíntese, perda lenta de água, nutrientes e CO₂ para os explantes. Porém, quando ocorre, alta taxa de respiração noturna, um desenvolvimento pobre do explante é promovido *in vitro*.

De acordo com pesquisas de Jeong *et al.* (1995), micro-ambientes controlados, promovem às plântulas um bom crescimento e desenvolvimento, reduzindo significativamente desordens morfológicas e fisiológicas que possam ocorrer com elas.

Desta forma, o estágio de aclimatização das plântulas adquiridas *in vitro*, resulta em mudas vigorosas com os custos de produção significativamente reduzidos.

Neste contexto é que se faz importante, analisar os fatores que influenciam o ambiente aéreo e o ambiente da zona radicular das espécies cultivadas *in vitro*, pois o ambiente interno *in vitro*, é influenciado direto e indiretamente pelo ambiente externo (Kozai *et al.*, 1997).

Os fatores ambientais descritos a seguir, têm uma influência no crescimento e desenvolvimento das plântulas durante todo o período do cultivo. Os níveis destes fatores, tanto no começo, quanto durante o cultivo, devem ser controlados para maximizar as culturas. Por um lado, a maioria dos fatores físicos podem ser mantidos em um conjunto de pontos desejáveis do início ao fim do cultivo, por outro lado, a maioria dos fatores químicos, aumentam ou diminuem no meio de cultura, atingindo o crescimento das plântulas, a não ser que se introduza um sistema contínuo de abastecimento como biorreatores, para que, então, elas não sejam afetadas (Kozai *et al.*, 1997).

2.5.1. Luz

A distribuição dos espectros de luz de diferentes fontes de luminosidade varia significativamente no sistema de cultivo *in vitro*. Embora nas salas de crescimento sejam usadas lâmpadas brancas tipo fluorescente, a composição espectral varia conforme as marcas comerciais oferecidas no mercado (Bickford e Dunn, 1978).

A luz é necessária para a plântula, sob três aspectos importantes: fotossíntese, fotomorfogênese e fototropismo, justificando por isso, a sua inclusão nas salas de crescimento (Cid, 2002).

Para se controlar a fotomorfogênese das plântulas *in vitro*, por exemplo, diferentes tipos de diodos emissores de luz podem ser utilizados também para emitirem luz azul, ou vermelho, a um baixo custo. A utilização desses diodos para o crescimento de plântulas *in vitro* seria uma alternativa prática para o sistema convencional de luminosidade (Miyashita *et al.*, 1995).

Já as lâmpadas brancas fluorescentes, foram as fontes primárias de luz utilizadas na micropropagação. Sua utilização é válida desde que seus espectros combinem com a necessidade das culturas *in vitro*, pois, elas dão uma distribuição horizontal relativamente uniforme da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (photosynthetic photon flux density (PPFD) sobre as prateleiras das estantes em que se encontram os frascos ou tubos de ensaio contendo as culturas. Essa distribuição é muito dependente sobre o tipo de vaso

(frascos de cultura ou tubos de ensaio) e tampas utilizadas para o cultivo, assim como, o arranjo espacial destes vasos (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

A fonte de luz é geralmente instalada acima dos frascos, e as plântulas recebem uma iluminação para baixo. Como as plântulas crescem, um aumento na quantidade de energia de luz, é interceptada pela parte superior das plântulas, e somente uma pequena quantidade de energia alcança as partes mais baixas. Já na iluminação lateral, por exemplo, as plântulas recebem mais quantidade de energia de luz e são uniformemente distribuídas por todas as partes.

Segundo Aitken-Christie *et al.* (1995), plântulas de batata (*Solanum tuberosum* L.), com o comprimento dos brotos reduzidos e área foliar aumentada, foram produzidas utilizando iluminação lateral. Os resultados permitiram concluir que, luz lateral, fibras ópticas ou outras fontes de luz pequeninas ou tênues, podem ser utilizadas também na micropropagação.

Outra configuração relacionada ao efeito da luz que influencia o crescimento das plântulas *in vitro*, é o fotoperíodo. Morini *et al.* (1990) trabalhando com pêra (*Pyrus communis* L.), testaram o efeito de diferentes ciclos de fotoperíodo. Os autores verificaram que o crescimento de brotos desta espécie foi significativamente maior com um ciclo de 4 horas de luz e 2 horas no escuro, quando comparado ao ciclo convencional de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Isto provavelmente modifica, de acordo com a cultura estudada.

Assim de modo geral, a luz deve ser analisada separadamente levando-se em conta a irradiância e o fotoperíodo para cada espécie. Desta maneira então, se fornecerá o melhor protocolo na maximização da produção de espécies vegetais *in vitro*.

2.5.2. Temperatura

A temperatura é outro fator importante no sistema de cultivo *in vitro*. Geralmente em salas de crescimento, a temperatura a ser utilizada para determinadas espécies, tem como base, aquela encontrada em seu habitat natural. Sendo assim, um sistema de ar refrigerado acionado a um termostato, é utilizado para manter a temperatura fixa que varia de 24° a 27°C (Cid, 2002).

Normalmente, a temperatura dentro do vaso da cultura é aproximadamente 1°C mais alta do que a temperatura do lado de fora do vaso, durante o fotoperíodo convencional (Aitken-Christie *et al.*, 1995). Embora, que, todas as precauções sejam tomadas para manter as variações de temperatura sob controle, problemas de condensação da água nas paredes destes materiais, sempre ocorre nas placas, frascos ou tubos de ensaio.

Em estudos de Kozai *et al.* (1992) com batata, os autores descreveram o efeito das diferenças entre o fotoperíodo e temperatura no período noturno, e os níveis da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos sobre a morfogênese e crescimento das plântulas dessa espécie *in vitro*. Após a análise dos tratamentos, verificaram que o comprimento dos brotos foi maior com o aumento do fotoperíodo e a baixa temperatura no período noturno, tanto com baixos ou altos níveis de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos. Já os pesos seco e fresco das plântulas foram similares entre os tratamentos de fotoperíodo e temperatura no período noturno. Verificaram, também, que, o fotoperíodo e a temperatura no período noturno, podem ser um caminho eficiente no controle da altura de plântulas cultivadas *in vitro*, com custos minimizados de aquecimento e resfriamento nas salas de cultura.

2.5.3. Umidade Relativa (UR)

A mudança da água para o estado líquido e gasoso entre a planta, o ar e o meio de cultura no frasco de cultura, assim como, as características do ambiente fora do frasco, tornam-se importantes regras no crescimento e desenvolvimento da planta cultivada *in vitro* (Kozai *et al.*, 1997).

Segundo Ziv *et al.* (1983) e Schloupf *et al.* (1995), a umidade relativa é normalmente alta dentro do frasco de cultura, no qual induz um desenvolvimento anormal das folhas, assim como a hiperhidricidade dos brotos e a transpiração excessiva da plântula.

A umidade relativa (UR) contida no frasco, é altamente dependente do número de mudanças gasosas por hora, entre o frasco de cultura e a UR da sala de crescimento (Aitken-Christie *et al.*, 1995); este fator, vinculado as correntes lentas de ar contidas nos frascos, tornam baixo, o coeficiente de difusão do ar no frasco de cultura, fazendo com que o CO₂ e água fiquem limitados para o processo de fotossíntese e transpiração (Kozai *et al.*, 1997).

Em exemplo, Kozai *et al.* (1993), cultivando plântulas de batata *in vitro* durante 22 dias sob diferentes condições de UR, observaram um aumento no comprimento dos brotos proporcional ao aumento da UR. Do mesmo modo, verificaram que a área específica foliar (m².gDW⁻¹) foi reduzida com a diminuição da UR, enquanto que não houve diferença significativa no peso seco das plântulas entre os diferente tratamentos.

Assim, é, válido, afirmar que, o tipo de frasco de cultura utilizado, afeta na composição dos gases das culturas em estudo; e, que, portanto, no ambiente em questão, a luz e UR, interferem, conseqüentemente, na hiperhidricidade e no crescimento das plântulas cultivadas *in vitro*.

2.6. Descontaminação superficial dos explantes

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a maior dificuldade na cultura de tecidos é a desinfestação dos explantes. Por isso, pré-tratamentos aplicados nas plantas matrizes são determinantes para seu sucesso, principalmente, quando se trabalha com espécies possuidoras de microrganismos endógenos.

Tecidos de plantas excessivamente contaminados devem ser lavados em solução fraca de detergente e enxaguadas várias vezes em água destilada antes da esterilização. Segundo Lebowitz (1995), o hipoclorito de sódio (NaOCl) é mais apropriado em soluções contendo de 0,025 a 0,25% do mesmo. Alguns agentes emulsionantes como Tween ou Triton são utilizados em baixa concentração e adicionados às soluções descontaminantes para assegurar que esses agentes químicos entrem em contato com toda a superfície do tecido. Após a esterilização superficial, recomenda-se no mínimo três enxaguadas sucessivas de água autoclavada para remover resíduos dos agentes químicos.

As concentrações das soluções desinfestantes assim como as combinações dos princípios ativos desinfestantes e os tempos de exposição podem variar muito. Considerando a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, a concentração da solução, e o tempo de exposição são itens manipulados de maneira inversamente proporcional. Em estudos com eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), Gupta *et al* (1981) desinfestaram gemas axilares com cloreto de mercúrio a 0,05%, durante 15 minutos. Já Fereol e Ducreux (1981), trabalhando com mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), esterilizaram frações do caule, possuindo uma gema, com álcool a 70%, durante 10 minutos. Depois o material foi imerso em solução de hipoclorito de cálcio (17g.L^{-1}) durante 30 minutos, e em seguida, lavados com água autoclavada durante 15 minutos.

Produtos bastante utilizados também na desinfestação de explantes são os fungicidas sistêmicos, principalmente, no que se refere à eliminação de microrganismos endógenos. Porém, seu uso, não deve ser substituído pelas técnicas de assepsia do explante no momento do estabelecimento *in vitro*. Geralmente, as concentrações dos fungicidas utilizadas no processo de desinfestação, variam muito de espécie para espécie, sendo necessário, cuidado na escolha do produto. Benomyl é o mais indicado, segundo Grattapaglia e Machado (1998), pois apresenta amplo espectro de ação, e é pouco tóxico às culturas nas concentrações necessárias para o controle de fungos.

Em estudos com *Camellia sinensis*, arbusto conhecido popularmente como chá, provenientes do campo, Haldeman *et al* (1987), utilizaram concentrações de 1 a 2 g.L^{-1} da formulação comercial Benlate, para a eliminação de contaminação fúngica de ápices da

espécie. Já Hauptmann *et al* (1985), utilizaram a concentração de 50 mg.L⁻¹, para a eliminação de *Penicillium* em culturas de protoplastos de diversas outras espécies.

2.7. Meios de Cultura

O meio de cultura é, basicamente, um meio nutritivo que deve suprir tecidos e órgãos vegetais cultivados *in vitro*, com nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento dos explantes utilizados. Sua composição deve fornecer macro e micronutrientes, uma fonte de carboidrato que geralmente é a sacarose, que substitui o carbono que a planta normalmente fixa da atmosfera pela fotossíntese, e, certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, que proporcionam um crescimento maior para as plântulas cultivadas *in vitro* (Pasqual *et al.*, 1997).

Vale ressaltar que os meios de cultura por consistirem em uma parte essencial da cultura de tecidos, têm evoluído juntamente com a biotecnologia, pois controlam praticamente todo o crescimento e morfogênese dos explantes *in vitro*. Em paralelo, os meios de cultura devem ser trabalhados com a escolha do explante, as condições de temperatura e luminosidade em que os mesmos são mantidos (Pasqual *et al.*, 1997).

A planta quando cultivada em condições *in vitro* apresenta característica heterotrófica, necessitando, assim, para o seu crescimento e desenvolvimento, de um substrato adequado. As exigências nutricionais para o crescimento ótimo das plantas *in vitro* podem variar com a espécie, e, mesmo na própria planta, pois explantes de diferentes partes podem requerer meios específicos para o crescimento e desenvolvimento de uma plântula inteira ou parte dela.

A literatura mostra que o meio MS (Murashige e Skoog), apresentado no Quadro 1, é um dos meios mais utilizados, por apresentar uma constituição muito rica em minerais, principalmente altos níveis de nitrato, potássio e amônio.

Além do meio de cultura MS, existem ainda os meios de White, B5 e WPM (Wood Plant Medium) que diferenciam-se na composição de seus nutrientes e vitaminas, ou apenas na concentração dos macro e micronutrientes (Caldas *et al.*, 1998).

Quadro 1: Composição química do meio MS, conforme Murashige e Skoog (1962) e suas respectivas concentrações:

	ESTOQUE	SAL	P.M.	SOLUÇÃO FINAL	
MACRONUTRIENTES	I	NH ₄ NO ₃	80,04	1,649 mg.L ⁻¹	20,6 m mol.L ⁻¹
	II	KNO ₃	101,11	1,900 mg.L ⁻¹	18,8 m mol.L ⁻¹
	III	CaCl ₂ 2H ₂ O	147,02	440 mg.L ⁻¹	3,0 m mol.L ⁻¹
	IV	MgSO ₄ 7H ₂ O	246,50	370 mg.L ⁻¹	1,5 m mol.L ⁻¹
		KH ₂ PO ₄	136,09	170 mg.L ⁻¹	1,25 m mol.L ⁻¹
V	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	372,25	37,23 mg.L ⁻¹	0,100 m mol.L ⁻¹	
MICRONUTRIENTES	VI	FeSO ₄ 7H ₂ O	278,03	27,80 mg.L ⁻¹	0,100 m mol.L ⁻¹
		H ₃ BO ₃	61,83	6,2 mg.L ⁻¹	0,100 m mol.L ⁻¹
		MnSO ₄ H ₂ O	169,01	16,90 mg.L ⁻¹	0,100 m mol.L ⁻¹
		ZnSO ₄ 7H ₂ O	287,54	8,63 mg.L ⁻¹	0,030 m mol.L ⁻¹
		Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	241,95	0,25 mg.L ⁻¹	0,001 m mol.L ⁻¹
		CoCl ₂ 6H ₂ O	237,93	0,025 mg.L ⁻¹	0,0001 m mol.L ⁻¹
SUPL. ORG.	VII	CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	0,025 mg.L ⁻¹	0,0001 m mol.L ⁻¹
		Inositol	180,2	100 mg.L ⁻¹	0,55 m mol.L ⁻¹
		Tiamina	337,27	0,1 mg.L ⁻¹	0,0003 m mol.L ⁻¹
		Piridoxina	205,64	0,5 mg.L ⁻¹	0,0024 m mol.L ⁻¹
		Ác. Nicotínico	123,11	0,5 mg.L ⁻¹	0,004 m mol.L ⁻¹

2.8. Reguladores de Crescimento

Assim como nos animais, o desenvolvimento de plantas é fundamentalmente controlado por substâncias reguladoras de crescimento (Peres, 2002). Esses reguladores são compostos orgânicos, que, em baixas concentrações, promovem, inibem, ou, ainda, modificam o crescimento do vegetal (Pasqual *et al.*, 1997).

Na cultura de tecidos, o uso destes compostos no meio de cultura, possibilita um controle no crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*. A indução da parte aérea ou do sistema radicular dos explantes utilizados, seria praticamente impossível sem a adição dos reguladores de crescimento ao meio de cultura, pois eles na maioria das vezes, direcionam o metabolismo dos explantes utilizados para o processo desejado *in vitro* (Pasqual *et al.*, 1997).

O desenvolvimento de órgãos, como folhas e caules, envolve uma seqüência ordenada de fases da divisão celular e extensão das células, havendo uma coordenação do crescimento, de acordo com o tempo. Através de vários estudos, é de conhecimento que hormônios desempenham um papel vital no controle do crescimento, não somente na planta como um todo, mas também, em seus órgãos.

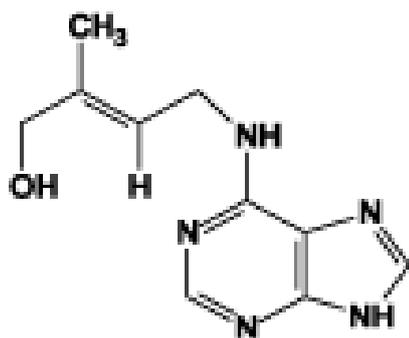
Em estudos com mogno (*Swietenia macrophylla* King), Lopes *et al.* (2001), induziram o enraizamento em ápices e brotações desta espécie, ao utilizarem ANA (ácido naftalenoacético), nas concentrações 2,0 e 5,0 mg.L⁻¹, promovendo um enraizamento acima de 70%, para ambos explantes. Já Schuch *et al* (2003), induziram brotações em gemas apical e axilar do porta-enxerto de macieira 'EM-9' cultivadas *in vitro*, com uma média de 2,14 brotações por explante.

Segundo Skoog e Miller (1957), as auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo na cultura de tecidos são regulados pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento.

As citocininas são substâncias reguladoras de crescimento que estimulam a síntese protéica, por isto, podem promover a maturação de cloroplastos e atrasar a senescência das folhas. Seu emprego, geralmente é mais notável, em pesquisas realizadas na cultura de tecidos, onde são amplamente utilizadas com as auxinas, que quando combinadas em meio de cultura, estimulam a divisão celular e controlam a morfogênese do vegetal; por outro lado, quando utilizadas para indução de brotos, reduzem a dominância apical e liberam gemas laterais da dormência (Pasqual *et al.*, 1997).

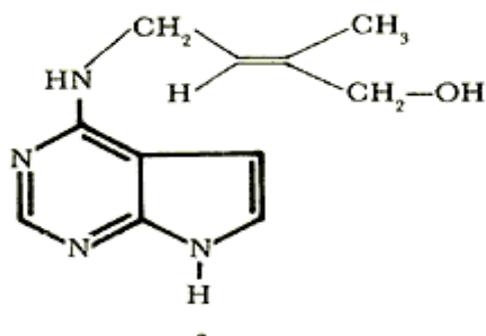
Muitas citocininas utilizadas em pesquisa são sintéticas, embora possam às vezes apresentar atuação anormal, freqüentemente, mostram atividades mais altas que as naturais. No caso, a citocinina natural mais conhecida é a Zeatina (ZEA) (Fig.1), e as principais citocininas sintéticas são: 6-Benziladenina (BA) ou 6-Benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN) (Fig.2) e o Tidiazuron (TDZ) (Fig.3) (Pasqual *et al.*, 1997).

Fig.1



Zeatina (ZEA)

Fig.2



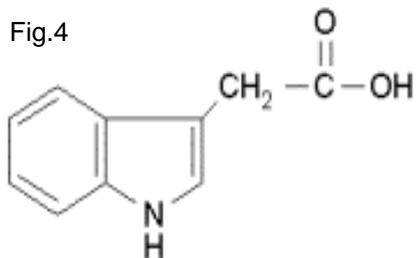
Cinetina (CIN)

Fig.3

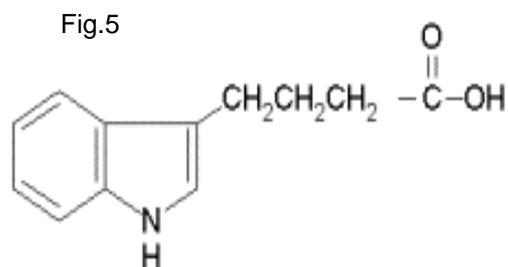


Tidiazuron (TDZ)

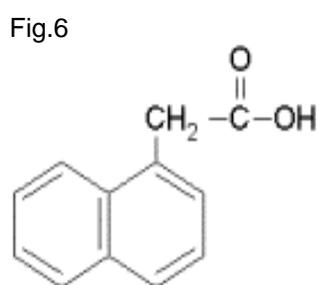
Já as auxinas, são substâncias reguladoras de crescimento capazes de controlar vários processos distintos, como o crescimento e alongação celular. Elas são capazes de iniciar a divisão celular e estão envolvidas na origem de meristemas, promovendo crescimento tanto ao tecido desorganizado como para órgãos definidos. Estes reguladores promovem também florescimento e germinação. A principal auxina natural é o ácido Indol-3-acético (AIA) (Fig.4), identificado em 1928, e as principais auxinas sintéticas são: Ácido Indol Butírico (AIB) (Fig.5), Ácido Naftaleno Acético (ANA) (Fig.6) e Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) (Fig.7) (Pasqual *et al.*, 1997).



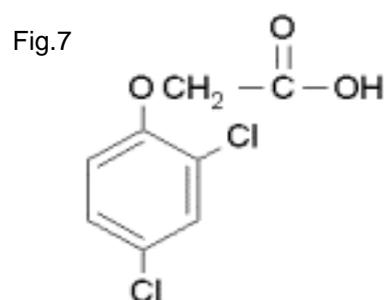
Ácido indolacético (AIA)



Ácido indolbutírico (AIB)



Ácido naftalenoacético (ANA)



Ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D)

2.9. Aclimação

A aclimação, é a etapa de transplântio que compreende a transferência das plântulas adquiridas *in vitro* para a casa de vegetação. Esta transferência é crítica, e representa em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação, tornando fatores como: substrato, umidade, tipo e qualidade do sistema radicular da plântula, importantes para se obter sucesso na sobrevivência das mesmas (Gattapaglia e Machado, 1990).

Em geral, plântulas de raízes curtas são mais desejáveis, pois facilitam o manuseio na hora do transplântio e encontram-se numa fase de crescimento ativo, facilitando o “pegamento” da plântula no novo substrato.

Ainda são poucos os trabalhos que relatam os detalhes de transplântio e aclimação de espécies cultivadas *in vitro*, assim como, as dificuldades e as soluções encontradas durante este processo, principalmente no que se refere à espécies florestais.

Em trabalhos com macieira (*Malus sp.*), Pereira e Fortes (2001), conseguiram realizar a aclimação de 90% das plântulas adquiridas *in vitro*, transplantando-as em bandejas de semeadura, com substrato composto de terra de mato, casca de arroz carbonizada e esterco bovino na proporção 3:1:1 (v/v), previamente esterilizados com brometo de metila, sob uma folha de sombrite e plástico transparente durante duas semanas, onde eram irrigadas diariamente.

Já Santos *et al.* (2004), trabalhando com grevília (*Grevillea robusta* A. Cunn), uma espécie florestal de origem australiana, utilizada para reflorestamento, conseguiram aclimatar 100% das plântulas, transferindo-as para tubetes de plástico em casa de vegetação, contendo um substrato misto composto de 35% de casca de arroz carbonizada, 35% de vermiculita e 35% de substrato comercial, sob uma umidade relativa do ar acima de 80% e temperaturas entre 22 e 28°C.

Ambos trabalhos de transplântio e aclimação mencionados acima, compreendiam substratos com boa retenção de umidade, não compactos, com drenagem e aeração satisfatórios para o sistema radicular das espécies. Portanto, estes fatores podem ser tomados como primordiais para o sucesso da aclimação.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estabelecer um protocolo para propagação *in vitro* de *Aniba rosaeodora* Ducke, a partir de brotações apicais, segmentos nodais e fragmentos foliares.

3.2 Específicos

- Propor um tratamento que possibilite a descontaminação superficial das brotações apicais, segmentos nodais e de fragmentos foliares de *Aniba rosaeodora* Ducke;
- Determinar qual concentração e regulador de crescimento dentre as auxinas: ácido indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D) e da citocininas: 6 – benzilaminopurina (BAP) e tidiazuron (TDZ), é o mais adequado para a formação de brotos, raiz e calo nos explantes utilizados;
- Propor um protocolo para a aclimação das plântulas enraizadas *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas - EST/UEA, situado em Manaus - AM.

4.1 Aquisição de sementes e pré-tratamento do material vegetativo.

Sementes de *Aniba rosaeodora* Ducke (Fig.8) foram coletadas na Reserva Adolpho Ducke (AM-010) e levadas ao laboratório de cultura de tecidos vegetais para um pré-tratamento de assepsia. As sementes foram imersas em solução de Benomyl ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) durante 24 horas, e, em seguida, postas para germinar em bandejas plásticas contendo areia lavada e vermiculita (Fig.9), sendo irrigadas diariamente até a aquisição de plântulas jovens (Fig.10), para que fosse realizada, a coleta das brotações apicais, segmentos nodais e folhas, explantes estes utilizados no presente estudo.

Após a germinação das sementes, as plântulas em desenvolvimento (Fig.10), receberam pulverizações quinzenais de solução de Benomyl ($4,0 \text{ g.L}^{-1}$), na tentativa de minimizar o aparecimento de contaminação fúngica no material vegetativo, na etapa de descontaminação superficial dos explantes.

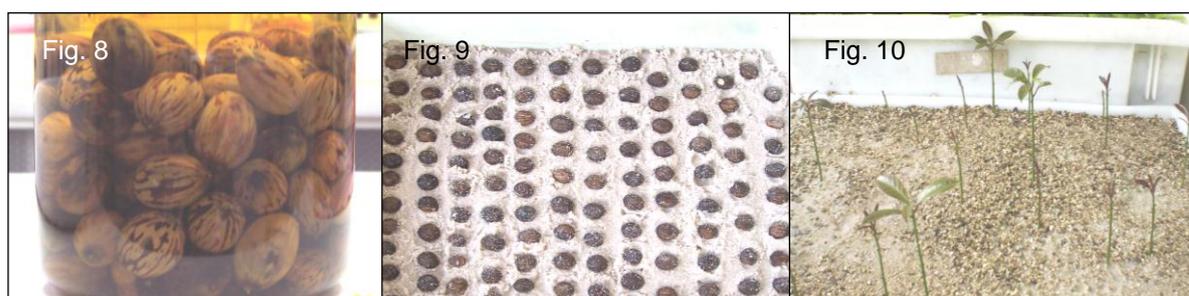


Figura 8. Sementes de pau-rosa; Figura 9. Sementes postas para germinar em bandejas plasticas contendo areia lavada e vermiculita; Figura 10. Plântulas germinadas após 50 dias.

4.2 Descontaminação superficial dos explantes.

4.2.1 Ápices e Segmentos Nodais

Após o intervalo de 2 a 3 meses, brotações apicais e segmentos nodais (Fig. 12) foram coletados das plântulas (Fig. 11), lavados em água corrente e submetidos a três tratamentos distintos de assepsia. Cada tratamento era composto por 60 repetições, realizados na Câmara de Fluxo Laminar. Foram utilizados como produtos desinfestantes: solução de BenomyI ($4,0 \text{ g.L}^{-1}$), e solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial com 2,0 a 2,5% p/p do princípio ativo), com 3 gotas do agente emulsionante tween, em concentrações e tempo de exposição diferentes (Tabela 1), e, em seguida, lavados com água destilada autoclavada.

Após a esterilização superficial, os explantes foram podados (Fig. 13), e, em seguida inoculados (Fig. 14) em tubos de ensaio (20 X 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog), com as soluções I, II e III reduzidas pela metade, acrescido de 30g de sacarose e 8g de ágar, com pH ajustado para 5,8, esterilizado em autoclave por 15 minutos a uma temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de 1,2 atm.

Tabela 1: Tratamentos utilizados na assepsia dos ápices e segmentos nodais de *Aniba rosaeodora* Ducke.

Imersão e tempo de exposição				
Trat ^{os}	Nº de Repetições	H ₂ O	BenomyI (4g.L^{-1})	Hipoclorito de sódio + 3 gotas de tween
I	60	15 min.	2 hs	15% - 10 min.
II	60	15 min.	12 hs	20% - 20 min.
III	60	30 min.	24 hs	20% - 20 min.

Após a inoculação, os explantes foram levados à estufa do tipo B.O.D. (Fig. 15), mantidos no escuro durante 48 horas a uma temperatura de 26°C , com intuito de evitar a oxidação dos mesmos. Passado as 48 horas, os explantes foram conduzidos à sala de crescimento (Fig. 16) nas seguintes condições ambientais: fotoperíodo de 16 horas luz, temperatura de $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de 70%, e uma luminosidade com $52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância.

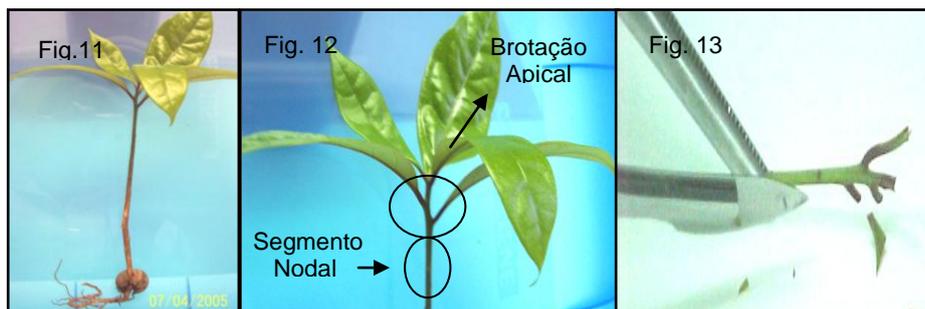


Figura 11. Plântula de *Aniba rosaeodora* Ducke, germinada em casa de vegetação; Figura 12. Detalhe dos explantes utilizados no processo de assepsia; Figura 13. Detalhe da poda realizada nos explantes após assepsia.



Figura 14. Detalhe de uma brotação em meio de cultura, após uma semana realizada a assepsia; Figura 15. Estufa do tipo B.O.D.; Figura 16. Sala de Crescimento.

4.2.2 Fragmentos Foliare

Folhas maduras de *Aniba rosaeodora* Ducke (Fig. 17 e 18), foram coletadas e lavadas em água corrente, e submetidas a dois distintos tratamentos de assepsia na Câmara de Fluxo Laminar. Os tratamentos constavam de imersão em solução de Benomyl (4g.L^{-1}) e solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial com 2,0 a 2,5% p/p do princípio ativo) com 3 gotas de tween, em concentrações e tempo de exposição diferentes, mostrados na Tabela 2. Em seguida, as folhas maduras foram lavadas com água autoclavada em abundância e postas sobre azulejo branco medindo 14 cm X 14 cm, onde receberam cortes na parte mediana (Fig. 19), originando os fragmentos utilizados como fonte de explantes. Depois, os fragmentos foliares foram inoculados em placas de petri (Fig. 20), contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog), com as soluções I, II e III reduzidas pela metade, acrescido de 30g de sacarose e 8g de ágar, com pH ajustado para 5,8, esterilizado em autoclave por 15 minutos a uma temperatura de 121 °C e pressão de 1,2 atm.

Tabela 2: Tratamentos utilizados na assepsia dos fragmentos foliares de *Aniba rosaeodora* Ducke.

Imersão e tempo de exposição				
Trat ^{os}	Nº de Repetições	H ₂ O	Benomyl (4g.L ⁻¹)	Hipoclorito de sódio + 3 gotas de Tween
I	80	15 min.	4 hs.	15% - 10 min.
II	80	30 min.	20 hs.	20% - 15 min.

Após a inoculação, os fragmentos foliares foram levados à estufa do tipo B.O.D., mantidos no escuro durante 48 horas a uma temperatura de 26°C, com intuito de evitar a oxidação. Passado 48 horas, foram conduzidos à sala de crescimento (Fig. 21) nas mesmas condições ambientais mencionadas no experimento anterior.



Fig.17. Folhas maduras de *Aniba rosaeodora* Ducke. Fig.18. Detalhe das folhas utilizadas no processo de assepsia; Fig.19. Detalhe dos cortes medianos, que originaram os fragmentos utilizados como fonte de explantes.

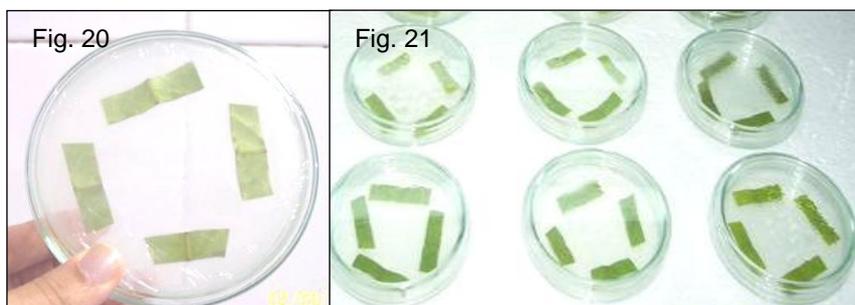


Fig.20. Fragmentos foliares inoculados em placas de petri, contendo meio de cultura MS.; Fig.21. Explantes incubados na sala de crescimento, após 48 horas realizada a assepsia.

4.3 Indução de brotação, enraizamento e formação de calo nos ápices e segmentos nodais.

Após a avaliação do índice de sobrevivência, as brotações apicais e segmentos nodais visualmente sadios foram sujeitos a um experimento de indução de formação de brotos, raiz e calo. Depois de estabelecidos *in vitro*, os explantes foram inoculados em meio de cultura MS, com as soluções I, II e III reduzidas pela metade, acrescido de 30g de sacarose, 9g de ágar, adicionado com distintas dosagens de reguladores de crescimento, BAP nas concentrações: 0,0 e 4,0 mg.L⁻¹, AIA nas concentrações: 0,0; 3,0 e 6,0 mg.L⁻¹ e ANA nas concentrações: 0,0; 3,0 e 6,0 mg.L⁻¹, 2,4-D nas concentrações: 0,0; 3,0 e 6,0 mg.L⁻¹ e suas respectivas combinações, de acordo com a tabela 3.

Após a inoculação, os explantes foram levados à sala de crescimento, mantidos no escuro por cinco dias, para evitar a degradação dos reguladores de crescimento contidos no meio de cultura, e depois, 10 dias a um fotoperíodo de 16 horas/luz, temperatura de 27°C ± 2°C e umidade relativa do ar de 70%, para que absorvessem a quantidade necessária de reguladores de crescimento, sem que houvesse algum problema de toxicidade, e conseqüentemente, inibição dos resultados esperados, ou seja, inibição de broto, raiz e calo.

Passados 10 dias de incubação no meio de cultura acrescido com reguladores de crescimento, os explantes foram transferidos para o meio de cultura MS com as soluções I, II e III reduzidas pela metade, acrescido de 30g de sacarose, 8g de ágar e avaliados após noventa dias.

Tabela 3: Dose em mg.L⁻¹ dos reguladores de crescimento (R.C.): ANA, AIA, 2,4-D e BAP, utilizados no experimento para indução de broto, raiz e calo em ápices e segmentos nodais de *Aniba rosaeodora* Ducke.

Trat ^o	Dose dos R.C. (mg.L ⁻¹)	Trat ^o	Dose dos R.C. (mg.L ⁻¹)
T ₁	Testemunha	T ₁₀	0,0 de ANA + 4,0 de BAP
T ₂	3,0 de ANA + 0,0 de BAP	T ₁₁	3,0 de ANA + 4,0 de BAP
T ₃	3,0 de ANA + 0,0 de BAP	T ₁₂	6,0 de ANA + 4,0 de BAP
T ₄	0,0 de AIA + 0,0 de BAP	T ₁₃	0,0 de AIA + 4,0 de BAP
T ₅	3,0 de AIA + 0,0 de BAP	T ₁₄	3,0 de AIA + 4,0 de BAP
T ₆	6,0 de AIA + 0,0 de BAP	T ₁₅	6,0 de AIA + 4,0 de BAP
T ₇	0,0 de 2,4 - D + 0,0 de BAP	T ₁₆	0,0 de 2,4 - D + 4,0 de BAP
T ₈	3,0 de 2,4 - D + 0,0 de BAP	T ₁₇	3,0 de 2,4 - D + 4,0 de BAP
T ₉	6,0 de 2,4 - D + 0,0 de BAP	T ₁₈	6,0 de 2,4 - D + 4,0 de BAP

4.4 Indução de organogênese nos fragmentos foliares.

Após a avaliação do índice de contaminação, os fragmentos foliares visualmente saudáveis foram sujeitos a um experimento de indução de organogênese, utilizando reguladores de crescimento em meio de cultura. Os fragmentos foram inoculados em meio de cultura MS, com as soluções I, II e III reduzidas pela metade, acrescido de 30g de sacarose, 9g de ágar, adicionado com reguladores de crescimento, BAP (5,0 mg.L⁻¹), TDZ (5,0 mg.L⁻¹), ANA (5,0 mg.L⁻¹), AIA (5,0 mg.L⁻¹), 2,4-D (5,0 mg.L⁻¹), de acordo com a tabela 4.

Após a inoculação, os explantes foram levados à estufa do tipo B.O.D., onde permaneceram durante 48 horas a uma temperatura de 26°C, e em seguida foram levados para sala de crescimento, mantidos no fotoperíodo de 16 horas/luz, a uma temperatura de 27°C ± 2°C e umidade relativa do ar de 70%, onde após 45 dias seriam avaliados.

Tabela 4. Dose em mg.L⁻¹ dos reguladores de crescimento (R.C.): BAP, TDZ, ANA, AIA e 2,4-D, utilizados no experimento para indução de organogênese em fragmentos foliares de *Aniba rosaeodora* Ducke

Tratamento	Dose do R.C. (mg.L ⁻¹)
Testemunha	Meio MS sem R.C.
F1	5,0 de BAP
F2	5,0 de TDZ
F3	5,0 de ANA
F4	5,0 de AIA
F5	5,0 de 2,4-D

4.5 Aclimação das plântulas enraizadas *in vitro*.

As plântulas alongadas *in vitro* com aproximadamente 8 cm de altura (Figs. 22 e 23), foram postas em copos plásticos, e avaliadas em três diferentes tipos de substrato para o processo de aclimação. O primeiro e o segundo substratos, foram compostos por: terra-preta, barro e areia nas proporções 2:1:1 e 1:2:1 (v/v), cobertos por vermiculita. O terceiro substrato foi composto somente por vermiculita. Após o transplante, as plântulas foram cobertas por sacos de plástico transparentes (Fig.24), com intuito de simular uma estufa, e, conseqüentemente, evitar a perda de água.

As plântulas recebiam irrigação diária, com pulverizações de adubo ouro-verde na concentração de 20ml.L.⁻¹, de três em três dias, e após 30 dias, foi avaliado o índice de sobrevivências das mudas.



Fig. 22. Plântula com a raiz principal medindo 10,5 cm de comprimento; Fig. 23. Detalhe das plântulas enraizadas *in vitro*. Fig. 24 Detalhe do processo de aclimatação.

4.6 Análise de dados da fase de descontaminação superficial dos explantes utilizados

A análise da fase de descontaminação superficial dos ápices, segmentos nodais e folhas, foi realizada calculando-se o índice de sobrevivência do material inoculado em meio de cultura, tendo sido verificado o número de explantes contaminados por fungos e bactérias.

4.7 Desenho experimental e análise de dados da fase de indução de brotos, raiz e formação de calos nos ápices e segmentos nodais.

A coleta de dados para indução de brotos e raízes nos explantes, foi realizada verificando-se o número de brotos e raízes adquiridos *in vitro* para cada explante dentro dos tratamentos. Porém, no que se referiu à indução de calos, valores numéricos de zero a dois foram estipulados para medição deste parâmetro. O valor zero foi atribuído aos explantes que não apresentaram formação de calo; valor um para explantes que apresentaram pouca formação de calos, e valor dois para explantes que apresentaram muitos calos.

O delineamento experimental utilizado para esta fase, foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 9 X 2, totalizando 18 tratamentos, com 15 repetições cada.

As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico ESTAT, versão 2.0. Os dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$, e em seguida, foi realizada a análise de variância e comparação das médias dos tratamentos, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.8 Desenho experimental e análise de dados da fase de indução de organogênese dos fragmentos foliares.

A coleta de dados para indução de organogênese foliar foi realizada verificando-se a intensidade da formação de calos adquiridos por cada explante dentro dos tratamentos. Valores numéricos de zero a dois foram atribuídos para esta medição. O valor zero representava os explantes que não obtiveram formação de calo, o valor um representava os explantes que apresentaram pouca formação de calo, e o valor dois representava os explantes que apresentaram muitos calos.

O delineamento experimental utilizado para a fase de indução de organogênese dos fragmentos foliares, foi o em blocos ao acaso, constando de 6 tratamentos, com 8 blocos cada, sendo cada bloco com 2 repetições.

As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico ESTAT, versão 2.0, com os dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$. Em seguida, foi realizada a análise de variância e comparação das médias dos tratamentos, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.9 Análise de dados da fase de aclimação das plântulas

Para a análise da fase de aclimação das plântulas adquiridas *in vitro*, foi calculado o índice de sobrevivência do material vegetativo, após 20 dias de transplante para os substratos testados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Desinfestação dos ápices e segmentos nodais.

O tratamento III, cujos explantes receberam lavagem em água corrente durante 30 minutos, seguido de imersão em solução de benomyl (4g.L^{-1}) durante 24 horas, e em seguida imersão em solução de hipoclorito de sódio a 20% + tween 20 durante 20 minutos, foi o mais eficiente no processo de descontaminação dos ápices e segmentos nodais de pau-rosa, promovendo uma média de 81,7% de sobrevivência dos mesmos, onde 18,3% foi contaminado por fungos, não havendo contaminação por bactérias (Tabela 5).

Porém o tratamento I, cujos explantes receberam a assepsia com menor concentração e tempo de exposição aos produtos desinfestantes, promoveu o menor índice de sobrevivência dos explantes, com uma taxa de 86,6% de contaminação, sendo 21,6% promovida por fungos e 65% por bactéria. Contudo nenhum dos tratamentos utilizados promoveu a oxidação dos explantes.

Tabela 5: Efeito da concentração e tempo de exposição dos produtos desinfestantes utilizados no processo de assepsia em ápices e segmentos nodais de *Aniba rosaeodora* Ducke.

Tratº	Sobrevivência	Oxidação	Contaminação %	
	%	%	Fungo	Bactéria
I	13,4	0	21,6	65
II	66,4	0	33,6	0
III	81,7	0	18,3	0

Em estudos com erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), Santos *et al.* (2005) desinfestaram segmentos nodais desta espécie, realizando uma pré-assepsia que constava de: lavagem em água corrente por 30 minutos, seguido de imersão em detergente a 30% por 10 minutos, seguido de lavagem com água esterilizada. Em seguida, os explantes foram levados a câmara de fluxo laminar, e foram tratados com Benlate (2g.L^{-1}) por 15 minutos, e em seguida imersos em solução de hipoclorito de cálcio a 5% por 10 minutos, e posteriormente lavados em água auto-clavada, o que proporcionou uma taxa de 46,43% de sobrevivência.

Estes resultados confirmam, portanto, que a desinfestação é a etapa de maior dificuldade para o estabelecimento de uma cultura *in vitro*, no qual as concentrações das soluções desinfestantes, assim como, as combinações dos princípios ativos e o tempo de exposição variam de acordo com a espécie trabalhada.

No caso do pau-rosa, verificou-se que as concentrações e o tempo de exposição, devem ser maiores quando comparadas a outras espécies florestais como a grevílea (*Grevillea robusta* Cunn). Santos *et al.* (2004), por exemplo, desinfestaram tufos (brotações múltiplas) desta espécie, utilizando uma solução contendo apenas 1g.L^{-1} de Benomyl por 15 minutos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% acrescida de 2 gotas de Tween 20 por 15 minutos. Este protocolo comparado ao do presente estudo, foi menos agressivo, mostrando, portanto, o quanto é importante verificar a sensibilidade do tecido vegetal da espécie em estudo, para o estabelecimento do tratamento de desinfestação a ser utilizado.

Em outro trabalho com *Aniba rosaeodora* Ducke, Handa *et al.*, (2005), utilizaram um protocolo de assepsia mais agressivo para esta espécie. O mesmo constava de imersão em solução de Benomyl (400mg.L^{-1}) por 12 horas, seguido de imersão em Agrimicina (300mg.L^{-1}) por 1 hora, em seguida, em etanol a 70% com Tween 20 por 90 segundos e por fim, imersão em solução de NaClO a 10% por 10 minutos. No caso, os explantes utilizados na desinfestação, foram gemas axilares oriundas de rebrotas de mudas de pau-rosa cultivadas em casa de vegetação. Porém em seus resultados, verificou-se que este protocolo promoveu elevada taxa de contaminação fúngica e bacteriana no material utilizado, com um índice de 48% de sobrevivência dos mesmos. Este resultado quando comparado ao do presente trabalho, mostra a importância da origem do material propagativo e a escolha dos produtos desinfestantes, assim como suas concentrações e tempo de exposição a serem utilizados nos protocolos de assepsia.

Hoje, estudos relatam a importância do uso de pré-tratamentos com fungicidas, tanto com sementes germinadas em casa de vegetação, quanto em mudas jovens oriundas de regeneração natural, principalmente, no que se refere às espécies florestais, pois estes pré-tratamentos, reduzem drasticamente o aparecimento de contaminação dos explantes quando levados ao cultivo *in vitro*. Deste modo, o estabelecimento de diversas espécies vegetais na cultura de tecidos, terá o custo do processo de assepsia, baratiado em laboratórios, eliminando-se, assim, a utilização de meios de cultura contendo antibióticos e fungicidas.

5.2 Desinfestação dos fragmentos foliares.

Em relação ao estabelecimento do protocolo de assepsia para os fragmentos foliares, o tratamento II, cujos explantes receberam lavagem em água corrente durante 30 minutos, seguido de imersão em solução de Benomyl (4g.L^{-1}) durante 20 horas, e em seguida imersão em solução de hipoclorito de sódio a 20% com 3 gotas de Tween 20 durante 15 minutos, foi o mais eficiente no processo de descontaminação dos explantes, promovendo uma média de 80% de sobrevivência, onde 13,75 % de contaminação foi promovida por fungos e 6,25% foi promovida por bactérias (Tabela 6).

Já o tratamento I, apresentou o menor índice de sobrevivência dos explantes, 22,5%. Dos 77,5% explantes contaminados, 53,75% apresentaram contaminação por fungos e 23,75% apresentaram contaminação por bactérias. Porém, nenhum dos tratamentos promoveu oxidação nos fragmentos foliares.

Tabela 6 – Efeito da concentração e tempo de exposição dos produtos desinfestantes utilizados no processo de assepsia em fragmentos foliares de *Aniba rosaeodora* Ducke.

Tratº	Sobrevivência	Oxidação	Contaminação %	
	%	%	Fungo	Bactéria
I	22,5	0	53.75	23.75
II	80	0	13.75	6.25

Estes resultados condizem com os obtidos no processo de assepsia dos ápices e segmentos nodais de *Aniba rosaeodora* Ducke, do presente estudo. Os fragmentos foliares responderam bem aos mesmos produtos desinfestantes utilizados. Porém, foi verificado, a necessidade de redução do tempo de exposição dos explantes aos produtos desinfestantes, pois o tipo de explante trabalhado, as folhas, eram mais sensíveis aos tratamentos propostos.

Resultados similares com *Arachis correntina* uma leguminosa, foram obtidos por Mroginski *et al.*, (2002), ao utilizarem concentrações e tempo de exposição baixos. Discos foliares desta espécie foram imersos em etanol 70% durante 30 segundos, e em seguida, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1%, acrescida com uma gota de Tween 20 durante 12 minutos.

Já Cerqueira *et al.* (2002), trabalhando com folhas de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma asteraceae com princípios medicinais, utilizaram imersão em álcool a 70% por 30 segundos, e em seguida, imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 30%, sob agitação por 10 minutos.

Outro exemplo a ser citado, é o estudo de Lédo *et al.* (2005) com explantes foliares de caju (*Anacardium occidentale* L.). Os autores desinfestaram os explantes, utilizando imersão em álcool etílico a 70% por dois minutos, e em seguida, imersão em hipoclorito de sódio comercial a 50%. O tratamento promoveu 80% de sobrevivência dos explantes e 4% de oxidação dos mesmos.

Com estes exemplos verifica-se que, explantes foliares utilizados na cultura de tecidos, devem receber uma desinfestação menos agressiva quando comparados a tecidos mais lenhosos como no caso de segmentos nodais, verificando-se sempre a origem do material propagativo, o pré-tratamento, e os produtos desinfestantes a serem utilizados, independente, de qual seja a espécie trabalhada.

5.3 Indução de brotos, raiz e calo nos ápices e segmentos nodais.

5.3.1 Brotos

O resultado da análise de variância para indução de brotos nos ápices e segmentos nodais de pau-rosa (Tabela 7), indica que os tratamentos envolvendo diferentes doses de auxinas diferem ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, e que as diferentes doses de citocinina não apresentaram efeito significativo para este parâmetro. Porém, nota-se que a interação entre as duas classes de reguladores de crescimento (auxina X citocinina), proporciona um efeito significativo ao nível 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Análise de variância para os tratamentos referentes a indução de brotos em ápices e segmentos nodais de *Aniba rosaeodora* Ducke.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Auxinas	8	8.4287	1.0536	6.54 **
Citocinina	1	0.2823	0.2823	1.75 NS
Auxinas X Citocinina	8	2.6822	0.3353	2.08 *
Coefficiente de Variação (%)	31.3035 (\bar{y})			
Desvio Padrão (%)	0.4014			

** - Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F.

* - Significativo a 5% de probabilidade pelo Teste F.

NS - Não significativo

(\bar{y}) - Índice elevado resultante da variabilidade dos explantes utilizados, pois os mesmos, não são oriundos da mesma planta matriz.

A comparação das médias pelo teste de Tukey (Tabela 8), indica que o tratamento T15 contendo 4,0 mg.L⁻¹ de BAP + 6,0 mg.L⁻¹ de AIA (Fig.25), e o tratamento T12 contendo 4,0mg.L⁻¹ de BAP + 6,0 mg.L⁻¹ de ANA, apresentaram as maiores médias para indução de brotos em ápices e segmentos nodais de pau-rosa, com uma média de 1,50 e 1,45 brotos/explante, respectivamente, diferindo estatisticamente dos tratamentos T8 (3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D), T17 (4,0 mg.L⁻¹ de BAP + 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D) e T18 (4,0 mg.L⁻¹de BAP + 6,0 de 2,4-D mg.L⁻¹), que apresentaram as menores médias, 0,87, 0,91 e 0,77 brotos/expante respectivamente

Estes resultados mostram, portanto, que as citocininas utilizadas em meio de cultura, com determinadas auxinas, são ótimas indutoras de brotos em explantes vegetais na cultura de tecidos (Grattapaglia e Machado, 1998). A exemplo disto, podemos citar Bellintani *et al.* (2005), que ao inocularem segmentos nodais oriundos de plantas geminadas *in vitro* de *Orthophytum albopictum* Philcox (Bromeliaceae), em meio MS com concentrações reduzidas pela metade, suplementado com 0,65 µM de ANA e 1,11 µM de BAP, induziram a melhor formação de brotos nesta espécie. Já Santos *et al.* (2005), ao trabalharem com segmentos nodais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), utilizaram concentrações maiores destes reguladores, 0,05 mg.L⁻¹ de ANA com 0,75 mg.L⁻¹ de BAP, conseguindo uma média de 6,0 brotos/explante, revelando desta forma, resultados semelhantes ao do presente estudo.

Mantovani *et al.* (1999), trabalhando com segmentos nodais de caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch), uma espécie florestal de interesse econômico industrial, devido as qualidades de sua madeira, também conseguiram induzir 2,0 brotos por segmento nodal, utilizando somente 1,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Tabela 8 – Médias* referentes ao número de brotos, raízes e calos formados por explante de *Aniba rosaeodora* Ducke, obtidos *in vitro*, para os tratamentos envolvendo diferentes tipos, concentrações e combinações de reguladores de crescimento.

Dose dos hormônios (mg.L ⁻¹)	--- Resposta dos ápices e segmentos nodais ---		
	Nº/ explante		
Tratamentos	Nº de brotos	Nº de raízes	Formação de calo
T₁ (Testemunha)	1,4048 Aa	0,9272 BCb	1,0545 Ba
T₂ (3,0 de ANA + 0,0 de BAP)	1,4189 Aa	1,6851 Aa	1,1580 Ba
T₃ (3,0 de ANA + 0,0 de BAP)	1.2938 Aba	1,3945 Aa	1,2140 Ba
T₄ (0,0 de AIA + 0,0 de BAP)	1,4048 Aa	0,9272 Bb	1,0545 Ba
T₅ (3,0 de AIA + 0,0 de BAP)	1,3755 Aa	1,2083 Aba	1,2745 ABa
T₆ (6,0 de AIA + 0,0 de BAP)	1,2638 Aba	1,1350 Ba	1,3458 ABa
T₇ (0,0 de 2,4-D + 0,0 de BAP)	1,4048 Aa	0,9272 BCa	1,0545 Ba
T₈ (3,0 de 2,4-D + 0,0 de BAP)	0,8797 BCb	1,0092 Ba	1,2508 Ba
T₉ (6,0 de 2,4-D + 0,0 de BAP)	1,1678 Aba	0,9595 ABCa	1,3911 ABa
T₁₀ (,0 de ANA + 4,0 de BAP)	1,3837 Aa	0,8775 Ba	1,2745 ABa
T₁₁ (3,0 de ANA + 4,0 de BAP)	1,3852 Aa	0,7071 Ca	1,1687 ABa
T₁₂ (6,0 de ANA + 4,0 de BAP)	1,4549 Aa	0,7999 Ba	1,2638 ABa
T₁₃ (0,0 de AIA + 4,0 de BAP)	1,3837 Aa	0,8775 BCa	1,2745 ABa
T₁₄ (3,0 de AIA + 4,0 de BAP)	1,2846 Aba	0,8344 Ba	1,3328 ABa
T₁₅ (6,0 de AIA + 4,0 de BAP	1,5025 Aa	0,8775 BCa	1,2853 ABa
T₁₆ (0,0 de 2,4-D + 4,0 de BAP)	1,3837 Aa	0,8775 Ba	1,2745 Aba
T₁₇ (3,0 de 2,4-D + 40,0 de BAP)	0,9142 Ba	0,7071 Ca	1,3566 A
T₁₈ (6,0 de 2,4-D + 4,0 de BAP)	0,7761 Ca	0,7071 Ba	1,4516 A

* Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas para as auxinas (ANA, AIA E 2,4-D) e minúsculas para citocinina (BAP), não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a literatura, as citocininas atuam, conceitualmente, na quebra da dominância apical e na indução de crescimento de brotações em segmentos nodais, e, dentre elas, o BAP destaca-se, pois seu uso na maioria das vezes, estimula maior produção

da parte aérea. Porém o uso em excesso, causa toxicidade nos explantes, promovendo a formação de calo (Grattapaglia e Machado, 1998), como visto no tratamento T18 do presente estudo, da qual combina a citocinina BAP com a auxina 2,4-D.

Em frente aos resultados obtidos no experimento para multiplicação, foi verificado, que a definição do tipo e concentração ótima de citocinina, combinada ou não com auxinas, constitui um passo importante e comum para o ajustamento de meios de cultura. Embora as auxinas, conceitualmente, não sejam necessárias nos meios de multiplicação, elas são utilizadas com intuito de estimular o crescimento das partes aéreas. Segundo Lundergan e Janick (1979), citados por Hu e Wang (1983), essa classe de fitoreguladores, anula o efeito que as citocininas têm sobre o alongamento das culturas, agindo em conjunto, no estímulo ao enraizamento do explante inicial, e na manutenção do caule único com dominância apical, implementando desta forma, um sistema em que novos segmentos nodais são formados como forma de multiplicação.

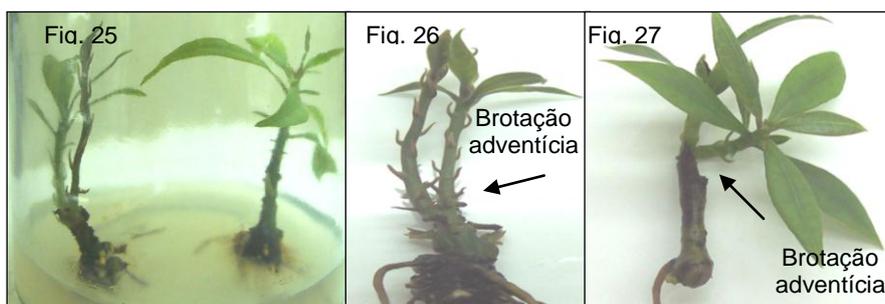


Fig.25. Plântulas de *Aniba rosaeodora* Ducke, alongadas *in vitro*, contendo em meio de cultura $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA; Fig. 26 e 27. Detalhe de brotações adventícias adquiridas em ápices e segmentos nodais da espécie.

5.3.2 Raiz

Em relação ao parâmetro enraizamento, o resultado da análise de variância, mostra que os tratamentos envolvendo diferentes doses de citocinina não apresentaram efeito significativo para este parâmetro. Porém, verifica-se que as doses isoladas das auxinas, assim como, a interação destas com a citocinina, proporcionam um efeito significativo ao nível 1% de probabilidade para este parâmetro (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise de variância para os tratamentos referentes a indução de raiz em ápices e segmentos nodais de *Aniba rosaeodora* Ducke.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Auxinas	8	9.9082	1.2385	7.52 **
Citocinina	1	0.0594	0.0594	0.36 NS
Auxinas X Citocinina	8	6.1064	0.7633	4.63 * *
Coeficiente de Variação (%)	41.8907 ^(y)			
Desvio Padrão (%)	0.4058			

** - Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F.

NS - Não significativo

^(y) - Índice elevado resultante da variabilidade dos explantes utilizados, pois os mesmos, não são oriundos da mesma planta matriz.

De acordo com as médias obtidas pelo teste de Tukey (Tabela 8), o tratamento T2 contendo 3,0 mg.L⁻¹ de ANA, demonstrou mais eficiência na indução de raízes em ápices e segmentos nodais de pau-rosa (Figuras de.28 a 31), apresentando uma média de 1,68 raízes/explante, seguido do tratamento T3, contendo 6,0 mg.L⁻¹ de ANA, cuja média foi 1,39, diferindo-os estatisticamente dos demais tratamentos. Porém os tratamentos T11, T17 e T18, que continham a maior dose da citocinina combinada com as auxinas ANA e 2,4-D, apresentaram a menor média para a indução de raízes nos explantes de pau-rosa, ou seja, 0,70 raízes/explante.

Estes resultados, no que diz respeito ao enraizamento de explantes na cultura de tecidos, confirmam o efeito satisfatório da auxina ANA, segundo a literatura. Em estudos de Rezende *et al.* (2005), por exemplo, brotações de gérbera (*Gerbera jamesonii*) enraizaram utilizando 4,0 mg.L⁻¹ de ANA, apresentando uma média de 4,8 raízes/explante. Já Lopes *et al.* (2001), trabalhando com ápices de mogno (*Swietenia macrophylla* King), obtiveram uma média de 2,9 raízes/expante, utilizando 2,0 mg.L⁻¹ de ANA, e ao trabalharem com as brotações laterais da mesma espécie obtiveram 2,8 raízes/explante, utilizando 5,0 mg.L⁻¹ de ANA.

As auxinas, segundo Haissing (1973), são os únicos reguladores de crescimento que aumentam consistentemente a formação de primórdios radiculares, pelo menos, em tecidos que apresentam certa predisposição ao enraizamento. Porém, não se sabe ao certo, se auxinas naturais ou sintéticas podem, sozinhas, induzir esses primórdios radiculares, pois certas espécies enraízam com dificuldade, ou não enraízam na presença delas, indicando que outros fatores influenciam na função de primórdios radiculares.

No entanto, a concentração ótima dada a uma planta, que ao mesmo tempo, pode ser insuficiente ou elevada para outra, pode afetar diretamente na qualidade das raízes. Isso mostra, que a reação do tecido *in vitro* depende da concentração da auxina, ou do seu balanço com uma citocinina, para que, então, se tenha uma resposta satisfatória na regeneração de uma espécie (Cresswell e Nitsch, 1975).

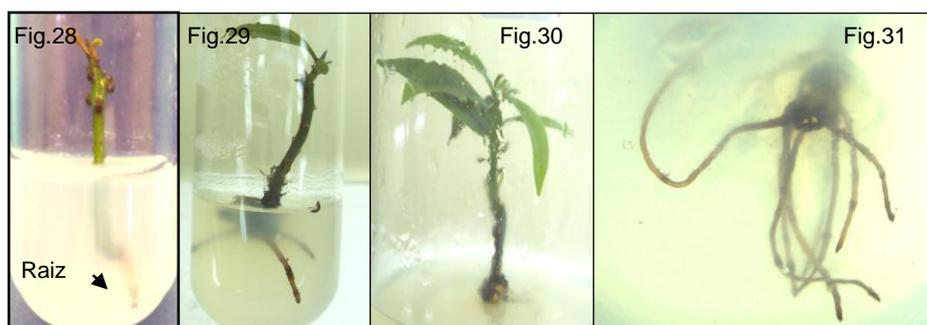


Fig.28. Ápice de *Aniba rosaeodora* Ducke, iniciando o processo de enraizamento em meio MS, contendo $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, após 15 dias de incubação; Fig. 29. Segmento nodal contendo três raízes após 45 dias em meio de cultura; Fig.30. Detalhe da parte aérea; 31. Detalhe do enraizamento após 90 dias de incubação.

5.3.3 Formação de calo.

Para a formação de calo, o resultado da análise de variância (Tabela 10) mostra que as doses da citocinina BAP, combinadas ou não, com os diferentes tipos e doses das auxinas, não possuem efeito significativo para este parâmetro. Porém, as doses isoladas das auxinas proporcionaram um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 10 - Análise de variância para os tratamentos referentes a indução calo em ápices e segmentos nodais de *Aniba rosaeodora* Ducke.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Auxinas	8	2.4802	0.3100	3.80 **
Citocinina	1	0.0922	0.0922	1.13 NS
Auxinas X Citocinina	8	0.7699	0.962	1.18 NS
Coefficiente de Variação (%)	22.8599 (y)			
Desvio Padrão (%)	0.2855			

** - Significativo a 1% de probabilidade pelo Teste F.

NS - Não significativo

(y) - Índice elevado resultante da variabilidade dos explantes utilizados, pois os mesmos, não são oriundos da mesma planta matriz.

Na tabela de médias dos tratamentos (Tabela 8), verifica-se que o tratamento T18, contendo no meio de cultura $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, foi o melhor indutor para a formação de calo em ápices e segmentos nodais de pau-rosa, com uma média de 1,45 calos/explante (Figuras de 32 a 34), não diferindo estatisticamente do tratamento T17, contendo $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, cuja média foi 1,39. Já ao contrário destes, o tratamento T1, representando a testemunha, cujo meio de cultura não continha reguladores de crescimento, apresentou a pior média na formação de calos na espécie, 1,05 por explante. (Tabela 8)

Estudos com resultados semelhantes confirmam a ação da auxina 2,4-D, no que diz respeito à formação de calos em tecidos vegetais. Segundo Skoog e Miller, citados por Assis e Teixeira. (1998), a reação de um tecido *in vitro* depende do balanço entre a auxina e citocinina. Para os autores, o aumento da concentração de auxina, induz a formação de raízes; enquanto o aumento da concentração de citocinina, induz a formação de gemas adventícias; já uma relação intermediária entre as duas classes, induz a formação de calo.

Em estudos de Soares *et al.* (2005), foi verificado que segmentos nodais de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), obtiveram uma média de 100% de calogênese, utilizando somente 2,4-D nas concentrações de 1,0 a 3,0 mg.L^{-1} . Já Barbosa *et al.* (2001), induziram a calogênese em segmentos nodais de andiroba (*Carapa guianenses* Aublet), combinando citocinina e auxina: BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) + 2,4-D ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), porém no mesmo trabalho não obtiveram calogênese nos segmentos inoculados em meio WPM, na ausência de reguladores de crescimento, ao contrário do pau-rosa, que mesmo inoculado em meio MS, com as concentrações das soluções estoque I, II e III reduzidas pela metade, conseguiram induzir uma média 1,05 calos/explante, como dito anteriormente.

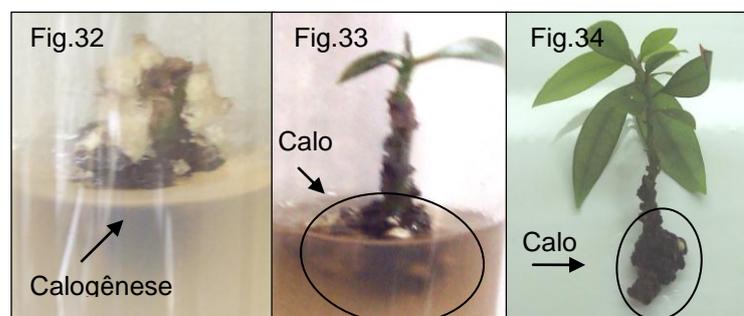


Fig.32. Ápice de *Aniba rosaeodora* Ducke, totalmente envolvido por calo;
Fig. 33. Segmento nodal *in vitro* contendo na base a formação de calo;
Fig. 34. Detalhe da calogênese formada na base do explante.

Embora a forma de propagação da maioria das espécies arbustivas e florestais seja por meio de mudas obtidas de sementes, a perda do poder germinativo é considerada um dos principais problemas neste método, pois dificulta o armazenamento e a preservação de estoques genéticos superiores. Em frente disso, a cultura de calos hoje, tem permitido estabelecer *in vitro* e propagar em grande escala, diversas dessas espécies, principalmente as medicinais. No entanto, ainda estão em fase inicial de exploração, as possíveis mudanças no tecido vegetal capaz de induzir essa formação de calos (Santos *et al.*, 2003).

Nesta técnica, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento mostra-se de fundamental importância para o estabelecimento da competência e determinação de órgãos especializados. Porém, quando uma determinada espécie não possui a capacidade de regenerar um órgão especializado, a aglomeração de células (formação de calo) pode ser utilizada para outros fins, como por exemplo, a produção de metabólitos secundários de interesse medicinal ou industrial (Kerbaudy, 1998).

5.4 Indução de organogênese dos fragmentos foliares

De acordo com os resultados obtidos na análise de variância para a indução de calo em fragmentos foliares de *Aniba rosaeodora* Ducke (Tabela 11), os tratamentos envolvendo diferentes tipos de reguladores de crescimento em meio de cultura, não apresentaram efeito significativo entre si, e nem entre os blocos.

Tabela 11 - Análise de variância referente à indução de organogênese em fragmentos foliares de *Aniba rosaeodora* Ducke.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Blocos	7	1.9353	0.2765	0.82 NS
Tratamentos	5	0.8181	0.1636	0.48 NS
Coefficiente de Variação	46.69 ^(y)			
Desvio Padrão	0.5813			

NS - Não significativo

^(y) - Índice elevado resultante da variabilidade dos explantes utilizados, pois os mesmos, não são oriundos da mesma planta matriz.

Verifica-se, no entanto, de acordo com a tabela geral de médias (Tabela 12), que os tratamentos F3 contendo em meio de cultura 5,0 mg.L⁻¹ de ANA (Fig. 37) e o F5 contendo 5,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Fig. 38a e 38b), obtiveram as maiores médias de formação de calo, ambos com 1,4 calos/explante, porém não se diferenciam estatisticamente dos demais tratamentos.

Tabela 12 - Médias* referentes à formação de calo em fragmentos foliares de *Aniba rosaeodora* Ducke, obtidos *in vitro*, para os tratamentos envolvendo diferentes tipos de reguladores de crescimento.

Trat ^o	Test.	F1	F2	F3	F4	F5
Médias *	1.0 A	1.2 A	1.2 A	1.4 A	1.3 A	1.4 A

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

Esses resultados estão de acordo com Pasqual *et al.* (1997), os quais consideram essencial o uso de auxinas para promover a formação e crescimento de calos em tecidos vegetais. Porém, em trabalhos de Abbade *et al.* (2005,) verificou-se que a formação de calos em explantes foliares de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), apresentou-se satisfatória combinando 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, em meio de cultura, ou seja, houve a necessidade do uso de ambas classes de reguladores de crescimento.

Trabalhando com folhas jovens de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb), Santos *et al.* (2005), também obtiveram resultados semelhantes, induzindo 90,27% dos explantes ao utilizarem 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ combinado com 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Já Moraes *et al.* (2001), trabalhando com segmentos foliares de cumaru (*Dipterix odorata* (Aubl.) Willd.), induziram calo utilizando BAP e 2,4-D nas concentrações: 1,0 e 2,0; 1,0 e 2,5; 1,5 e 1,5 (mg.L⁻¹) respectivamente. Porém, Costa *et al.* (2005), obtiveram calogênese em explantes foliares de pimenta-longa (*Piper hispidinervum*), ao utilizarem 5,0 mg.L⁻¹ de ANA em meio de cultura e Santiago *et al.* (2005) ao combinarem 27,135 µM e 2,685 µM de 2,4-D e ANA, respectivamente, interagindo com BAP a 8,88 µM.

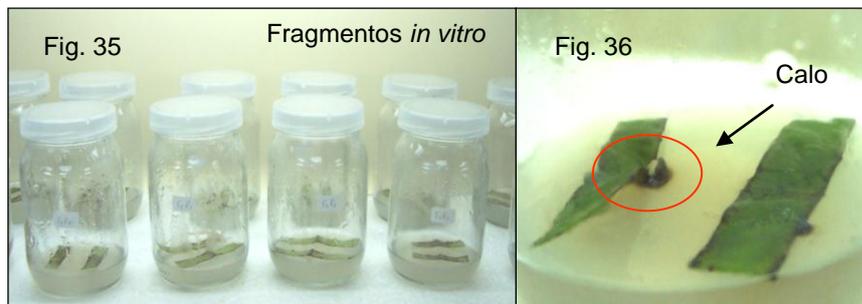


Fig.35. Fragmentos foliares *in vitro*, dispostos em sala de crescimento.;
 Fig.36. Formação de calo em fragmentos foliares de *Aniba rosaeodora* Ducke, inoculados em meio MS, contendo $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA.



Fig.37. Detalhe da formação de calo a partir das nervuras principal e secundária, cujo meio continha $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA.; Figs. 38a e 38b. Detalhe da formação de calo nos fragmentos foliares, inoculados em meio MS, contendo $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, após 40 dias de incubação.

Tais resultados quando comparados ao do presente projeto, mostraram que os fragmentos foliares de pau-rosa são capazes de responder à calogênese sem a presença de reguladores de crescimento em meio de cultura, ou com uso independente de uma auxina ou citocinina, e que tanto as nervuras principais como as secundárias possuem capacidade de formar calos, facilitando desta forma, a indução de organogênese.

Talvez em trabalhos futuros, estes resultados sejam otimizados ao combinarmos o uso das duas classes de reguladores de crescimento. Assim, poderemos ter melhores resultados para este tipo de indução, até chegar, à formação de órgãos especializados, como gemas e raízes, com a total regeneração da espécie estudada.

Outra hipótese a ser considerada, é, utilizarmos este material para a produção de calos em suspensão celular, com o propósito econômico de se extrair óleo essencial da espécie, criando-se desta forma, novas alternativas de produção e extração desta matéria-prima.

5.5 Aclimação

Dos tratamentos utilizados no processo de transplântio e aclimação das plântulas de pau-rosa adquiridas *in vitro*, nenhum dos substratos utilizados mostraram-se eficientes para a adaptação das plântulas as novas condições ambientais. Em todos os tratamentos, o índice de sobrevivência das mesmas foi zero em menos de 30 dias após o transplântio.

Todas as plântulas apresentaram-se necrosadas (Fig. 41) com perda de folhas (Fig. 42), e aparecimento de fungos em algumas repetições. A única diferença observada entre os tratamentos utilizados, foi que as plântulas transplântadas para o substrato contendo apenas vermiculita, resistiram mais tempo no substrato, aproximadamente 25 dias após o transplântio. Já as plântulas transplântadas em substratos contendo terra-preta, barro e areia, resistiram aproximadamente 10 dias.

Poucas são as espécies florestais aclimatadas segundo a literatura. Dousseau *et al.* (2005), por exemplo, conseguiram aclimatar plântulas de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich), transplântando-as para tubetes contendo Plantmax®, em viveiro sob diferentes níveis de sombreamento, obtendo um índice superior a 80% de sobrevivência das mudas. Já Pereira *et al.* (2001), aclimataram 90% de plântulas de macieira utilizando substrato composto de terra de mato, casca de arroz carbonizada e esterco bovino na proporção 3:1:1 (v/v), previamente esterilizados com brometo de metila.

Telles *et al.* (2005), trabalhando com caquizeiro (*Diospyrus kaki* L.), conseguiram uma percentagem de sobrevivência das plântulas adquiridas *in vitro*, abaixo de 50%, aclimatando-as em casa-de-vegetação, em copos de plástico de 250 mL com substrato Plantmax®, sem cobertura. Porém, no mesmo trabalho, eles conseguiram aclimatar 9,5% de plântulas colocadas no mesmo substrato, cobertas com copo de plástico transparente de 300 mL.

Essa diferença na percentagem de sobrevivência entre os dois tratamentos pode ter ocorrido, devido à elevação da temperatura dentro do copo, no tratamento cujas plantas possuíam cobertura, causando a morte das mudas e favorecendo o desenvolvimento de fungos no substrato. Este resultado assemelha-se com o do presente estudo, levando-nos a pensar, portanto, que, plântulas de pau-rosa adquiridas *in vitro*, são muito sensíveis ao processo de aclimação. Portanto, a temperatura e umidade relativa são pontos estratégicos para que haja boa adaptação da espécie na hora de aclimatá-las.



Fig.39. Vista aérea do início da necrose foliar; em uma plântula de *Aniba rosaeodora* Ducke, após 3 dias de transplântio; Fig.40. Vista frontal.



Fig.41. Plântula totalmente necrosada após 10 dias de transplântio para o substrato contendo areia, barro e vermiculita; Fig.42. Início da perda das folhas.

6. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste estudo, verifica-se que:

- A desinfestação de ápices, segmentos nodais e folhas de pau-rosa, utilizando benomyl (4g.L^{-1}) e hipoclorito de sódio a 20% (água sanitária comercial) acrescido de tween 20, proporciona uma redução satisfatória no aparecimento de fungos e bactérias nestes explantes quando cultivados *in vitro*;
- O meio MS acrescido da citocinina BAP ($4,0\text{ mg.L}^{-1}$), combinada com a auxina AIA ($6,0\text{ mg.L}^{-1}$) ou ANA ($6,0\text{ mg.L}^{-1}$), proporciona a melhor indução de brotos em ápices e segmentos nodais de pau-rosa;
- A auxina ANA acrescida ao meio MS na concentração de $3,0\text{ mg.L}^{-1}$ propicia a melhor indução de raízes em ápices e segmentos nodais de pau-rosa;
- A melhor formação de calo em ápices e segmentos nodais de pau-rosa, é proporcionada ao utilizar a citocinina BAP ($4,0\text{ mg.L}^{-1}$) combinada com a auxina 2,4-D ($6,0\text{ mg.L}^{-1}$) em meio MS;
- Os fragmentos foliares de pau-rosa respondem bem à formação de calo, ao utilizar-se as auxinas ANA ou 2,4-D isoladamente em meio MS, na concentração de $5,0\text{ mg.L}^{-1}$, quando cultivados *in vitro*;
- Os substratos contendo terra-preta, barro, areia e vermiculita, não são eficientes no processo de aclimação das plântulas de pau-rosa enraizadas *in vitro*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo descreveu protocolos referentes à assepsia, indução de broto, raiz e calo em brotações apicais, segmentos nodais e fragmentos foliares de pau-rosa, mostrando que estes explantes utilizados possuem a capacidade de formar e regenerar plântulas completas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), demonstrando que a técnica de cultura de tecidos vegetais, pode ser utilizada como uma nova alternativa para reprodução da espécie.

Porém, no que diz respeito, ao processo de aclimação de pau-rosa, novos protocolos devem ser determinados e testados, para que se feche o ciclo da propagação gerada *in vitro*.

Assim, os resultados gerados neste estudo, servirão, no futuro, para realização de novos protocolos trabalhados com a espécie, com o intuito de otimizar o processo de multiplicação *in vitro* da mesma, assim como, a sua aclimação, gerando novos conhecimentos e alternativas para sua reprodução e exploração.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbade, L.C.; Paiva, R.; Paiva, P.D.O.; Nogueira, G.F. 2005. Indução de calos de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes concentrações de 2,4-D e BAP. **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** V.23. N.2. p.635

Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M.A.L. 1995. Automation and environmental control in plant tissue culture. **Kluwer Academic Publishers.** 500 p.

Araújo, V.C.; Corrêa, G.C.; Maia, J.M.S.; Marx, M.C.; Magalhães, M.T.; Silva, M.L.; Gottlieb, O.R. 1971. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. **Acta Amazônica** 1(3): 45 – 47.

Assis, T.F.; Teixeira S.L. 1998. Enraizamento de plantas lenhosas (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Vol. I. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ. Brasília. p. 261 – 296.

Barbosa, A.S.A.; Vieira, I.M.S.; Monteiro, A.L.C.; Serra, A.G.P. 2001. Calogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais de andiroba (*Carapa guianenses* Aublet) testando diferentes combinações de BAP e 2,4-D. In: **Anais do IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal. REDBIO.** Resum. 01-135.

Bellintani, M.C.; Brito, A.L.; Santana, J.R.F.; Dornelles, A.L.C. 2005. Efeito de ANA e BAP na micropropagação de *Orthophytum albopictum* Philcox e *Orthophytum* sp. (Bromeliaceae). **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** V.23. N.2. p.608

Bickford E.D.; Dunn, S. 1978. **Lighting for plant growth.** The University Press, Ohio.

Bórem, A.; Vieira, M.L.C. 2005. **Glossário de Biotecnologia.** Viçosa, 158 p.

Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. 1998. Meios nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol. I. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH. Brasília. p. 87 – 132.

Cerqueira, E.S.; Pinto, J.E.B.P.; Moraes, A.R.; Castro, N.E.A.; Cardoso, M.G.; Lameira, O.A. 2002. Indução de calos em erva-de-touro (*Trindax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Rev. Cienc. Agrotec.** Lavras. V.26. N.2. p. 301 – 308.

Cid, L.P.B. 2002. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Rev. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 8p.

Costa, F.H.S.; Pereira, J.E.S. 2005. Seleção de auxinas para indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* visando o estabelecimento de cultivo de células em suspensão. **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** V.23. N.2. p.656

Costa, L.G.S.; Ohashi, S.T.; Daniel, O. 1995. **O pau-rosa – *Aniba rosaeodora* Ducke**. Belém: FCAP. Serviço de Documentação e Informação. 15p.

Cresswell, R.J.; Nitsch, C. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. 1975. **Planta**. V. 125. p. 87 – 90.

Dantas, A.C.M.; Nesi, A.N.; Machado, L.B.; Haerter, J.; Fortes, G.R.L. 2002. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. **Rev. Brasileira de Agrociência**. V.8. N.1. P. 19-23.

Debergh, P.; Maene, L. 1984. Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. **Parasitica** 40: 60 – 75.

Dosseau, S.; Alavarenga, A.A.; Castro, E.M.; Soares, R.P.; Emrich, E.B.; Nery, F.C.; Soares, F.P. 2005. Aclimatização de plântulas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Ipê-amarelo). **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** V.23. N.2. p.602

Ducke, A. 1938. **Lauraceas aromáticas do Amazonas**. Reunião Sul Americana de Botânica 3: 55 – 74

Fereol, L. ; Ducreux, G. 1981. Multiplicação vegetativa e eliminação dos fenômenos de degenerescência nos clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados *in vitro*. **Acta Amazônica** 11(2):213-226.

Grattapaglia, D.; Machado, M.A. 1998. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol. I. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ. Brasília. p.183 - 260.

Grout, B.W.W. 1990. Meristem tip culture. In: Pollard, J.W.; Walker, J.M., ed. **Methods in molecular biology: plant cell and tissue culture**. New Jersey: Human Press. 597p.

Gupta, P.K.; Mascarenhas, A.F; Jagannathan, V. 1981. Tissue culture of forest trees-clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. **Plant Science Letters**. V.20. p. 195 – 201.

Haissing, B.E. 1973. Influences of auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development. **New Zealand Journal of Forestry Science**. V.4. N.2. p. 311 – 323.

Haldeman, J.H.; Thomas, R.L.; McKamy, D.L. 1987. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **Hort. Science**, v.22, p. 306 – 307.

Handa, L.; Sampaio, P.T.B.; Quisen, R.C. 2005. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazônica**. Vol. 35 (1). p. 29 -33.

Hauptmann, R.M.; Widholm, J.M.; Paxton, J.D. 1985. Benomyl: a broad spectrum fungicide for use in plant cell and protoplast culture. **Plant Cell reports**. V. 4, pp. 129 – 132.

Hu, C.Y.; Wang, P.J. 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. Yamada, Y. eds. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. p. 117 - 227

Jeong, B.R.; Fujiwara, K.; Kozai, T. 1995. Environmental control and photoautotrophic micropropagation. **Horticultural Review**. 17 : 123 – 170.

Kerbaui, G.B. 1998. Competência e determinação celular de células e tecidos de plantas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Vol. II. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH. p.519 - 531.

Kozai, T.; Kubota, C.; Jeong, B.R. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 51:49 – 56.

Kozai, T.; Tanaka, K.; Jeong, B.R.; Fujiwara, K. 1993. Effect of relative humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. J. Jpn. **Soc. Hort. Science**. 62 (2): 413 – 417.

Kozai, T.; Kushihashi, S.; Kubota, C.; Fujiwara, K. 1992. Effect of the difference between photoperiod and period temperatures, and photosynthetic photon flux density on the shoot length and growth of potato plantlets *in vitro*. J. Jpn. **Soc. Hort. Science**. 61 (1):93 – 98.

Kubitzki, K.; Renner, S. 1982. Lauraceae 1 (*Aniba* and *Aiouea*). **Flora Neotropica**. Monograph 31. New York Botanical Garden. New York – US. 125p.

Lebowitz, F.J. 1995. **Plant Biotechnology, a laboratory manual**.

Lédo, A.S.; Santana, M.C.S.; Barbosa, S.B.S.C. 2005. Desinfestação de explantes foliares de caju e graviola para cultivo *in vitro*. **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** V.23. N.2. p.593

Lopes, S.C.; Lameira, O.A.; Fortes, G.R.L.; Nogueira, R.C.; Pinto, J.E.B.P. 2001. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **CERNE.** V.7. N 1. p. 124 – 128.

Loureiro, A.A.; Silva, M.F.; Alencar, J.C. 1979. **Essências madeireiras da Amazônia.** Vol.II. INPA-SUFRAMA. Manaus - AM. 254 p.

Mantovani, N.C.; Franco, E.T.H.; Guerra, M.P.; Hoppe, J.M. 1999. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morottoni* (Aubl.) Dcne. Et Planch. **Rev. Ciência Florestal.** V.9. N.1. p. 47 – 61.

Marques, A.S.J.; Varela, V.P.; Melo, Z.L. 1999. Influência da cobertura e do sombreamento do canteiro na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). **Acta Amazônica** 29 (2):303-312.

May, P.H.; Barata, L.E.S. 2004. **Rosewood exploration in the Brazilian Amazon: Optins for sustainable production.** Economic Botany 58(2). New York Botanical Garden. New York – US. pp. 257 – 265.

Mitja, D.; Lescure, J.P. 1996. Du bois pour du parfum: lê bois de rose doit-il disparaître. Pp. 93 – 102 In: **La forêt en jeu. L'extractivisme em Amazonie cebtrale.** Ed. L. emperaire. Éditions de L'Orstom, UNESCO.

Miyashita, Y.; Kitaya, Y.; Kozai, T.; Kimura, T. 1995. Effects of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets *in vitro*: using light emitting diode as a light source for micropropagation. **Acta Hort.** 393: 189 – 194.

Moraes, M.; Vieira, I.M.S.; Filho, A.R.; Serra, A.G.P. 2001. Calogênese de segmentos foliares de cumaru (*Dipterix odorata* (Aubl.) Willd.) sob a ação de 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) e BAP (6-Benzilaminopurina). **In: Anais do IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal.**

Morini, S.; Fortuna, P.; Sciutti, R.; Muleo, R. 1990. Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots culture *in vitro*. **Advances Hort. Science.** 4: 163 – 166.

Mroginski, E.; Rey, H.Y.; Mroginski, L.A. 2002. Obtención de plantas a partir del cultivo *in vitro* de explantes foliares de *Arachis correntina* (leguminosae). **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas – IBONE/ UNNE.** Resum: A – 036. 4p.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology.** V.25, p.135 – 166.

Ohashi, S.T.; Rosa, L.S.; Santana, J.A. 1997. Brazilian rosewood oil: sustainable production and oil quality management. *Perfum e Flavorist*: 22:1-4.

Pasqual, M.; Ramos, J.D.; Hoffmam, A.; Carvalho, G.R. 1997. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologias e aplicações – meios de cultura.** UFLA/FAEPE. Lavras – Minas Gerais. 127 pág.

Peres, L.E.P. 2002. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Rev. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** Nº 25. P. 44 – 48.

Pereira, J.E.S.; Fortes, G.R.L. 2001. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Rev. Bras. Fruticultura.** Vol.23. Nº 2. Jaboticabal. 6p.

Ramalho, M.; Santos, J. B.; Pinto, C. B. 1997. **Genética na Agropecuária.** 6º Edição. São Paulo: Globo. 359 p.

Rezende, R.K.S.; Paiva, L.V.; Paiva, R.; Torga, P.P.; Silva, A.A.N. 2005. Efeito do ANA (ácido naftaleno acético) no enraizamento de gérbera (*Gerbera jamesonii*). **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** V.23. N.2. p.611

Rosa, L.S.; Ohashi, S.T.; Silva, A.S. 1999. Efeito da profundidade de semeadura na germinação de sementes do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Rev. Ciências Agrárias** **31: 29 – 36.**

Rosa, L.S.; Sá, T.D.A.; Ohashi, S.T.; Barros, P.L.C.; Silva, A.J.V. 1997. **Crescimento e sobrevivência de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) oriundas de três precedências, em função de diferentes níveis de sombreamento, em condições de viveiro.** Boletim da Faculdade Agrária do Pará. 28:37-62.

Sampaio, P.T.B.; Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C. 2003. **Manual de Sementes da Amazônia. Fascículo 3: Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke – Lauraceae).** MCT/INPA/PPFA/JICA. 6p

Sampaio, P.T.B. 1987. **Propagação vegetativa do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) pelo método de estaquia.** Tese de mestrado, INPA-FUA. 114p.

Santiago, E.J.A.; Paiva, R.; Nogueira, R.C.; Nogueira, G.F.; Soares, F.P. 2005. Calogênese em explantes foliares de pimenta longa pela utilização de ANA, BAP e 2,4-D. **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** Vol.23. N.2. p.590.

Santos, D.C.; Wendling, L.; Dutra, L.F.; Fracaro, L.C. 2005. Assepsia para o estabelecimento *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** Vol.23. N.2. p. 638

Santos, B.R.; Paiva, R.; Nogueira, R.C.; Stein, V.C.; Alvarenga, A.A.; Deuner, S. 2005. Obtenção de brotações de pequizeiro pela utilização de ANA e BAP. **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** Vol.23. N.2. p. 623

Santos, B.R.; Paiva, R.; Nogueira, R.C.; Alves, J.D.; Deuner, S. 2005. Indução de calos *in vitro* em explantes foliares de pequizeiro. **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** Vol.23. N.2. p. 629

Santos, D.C.; Wendling, I.; Grossi, F. 2004. Efeito de diferentes combinações de fitorreguladores e vitaminas *in vitro* e *ex vitro* de *Grevillea robusta* Cunn. Comunicado Técnico 112. Embrapa Florestas. 6p.

Santos, C.G.; Paiva, R.; Paiva, P.D.O.; Paiva, E. 2003. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi. **Rev. Ciênc. Agrotec.**V.27. N.3. p.571-577.

Schloupf, R.M. ; Barringer, S.A. ;Splittstoesser W.E. 1995. A review of hyperhydricity (vitrification) in tissue culture. Plant Growth Regul. Soc. Of Amer. Quartely. 23 (3) : 149 – 158

Schuch, M.W.; Erig, A.C.; Silva, L.C. 2003. Indução de brotações em gema apical e axilar do porta-enxerto de macieira 'EM-9' cultivadas *in vitro*. **Rev. Bras. Fruticultura.** v.25 n.2.

Skoog, F.; Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues culture *in vitro*. In: **Symposium of Society for Experimental Biology**, V.11. p.118 – 131.

Soares, F.P.; Paiva, R.; Oliveira, L.M.; Paiva, P.D.O. 2005. Calogênese *in vitro* de segmentos caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Rev. Assoc. Bras. Hortic.** V.23. N.2. p.632

Spironello, W.R.; Barbosa, A. P.; Leite, A.M.C.; Quisen, R.; Sampaio, P.T.B. 2001. Ecologia reprodutiva, manejo e conservação do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Pp. 289 In: **Anais do V Congresso de Ecologia do Brasil.** Porto Alegre-RS.

Sudam. 1972. **Extrativismo do Pau-rosa (*Aniba ducke* Koster, *Aniba rosaeodora* Ducke). Aspectos sócio-econômicos: a silvicultura da espécie.** Documentos da Amazônia 3(1/4):5-55.

Telles, C.A.; Biasi, L.A. 2005. Enraizamento *in vitro* e aclimatização em casa de vegetação do caqui (*Diospyros kaki* L.). **Rev. Ciência Agrotec.** V. 29. N.2. p. 401 – 404.

Torres, C.A.; Teixeira, S.L.; Pozzer, L. 1998. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. **In:** Torres, A.C.; Caldas, L.S.; BUSO, J.A. (eds) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Vol. I. EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPH. Brasília. p.133 – 146

Torres, A.C. ; Caldas, L.S. 1990. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecido de Plantas.** ABCT/EMBRAPA-CNPH. Brasília. 433p.

Vieira, A.N. 1972. A silvicultura do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). II. Estudos sobre métodos de propagação. **Acta Amazônica** 2 (1): 51 -58.

Yu, D.; Meredith, C.P. 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **Journal of the American Society for Horticultural Science.** V.111. p. 972 – 975.

Ziv, M.M.G.; Halevy, A.H. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. **Plant Cell Tissue Org.** 2 : 55 – 65.

Universidade do Estado do Amazonas
Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal
Manaus - Amazonas



Lyana Silva Jardim
Autora

Seminário público apresentado no dia 17.04.06 às 10:00

UEA



SECT
Secretaria de Estado de
Ciência e Tecnologia