



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E PROPAGAÇÃO *IN VITRO*
DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke)

DANIVAL VIEIRA DE FREITAS

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, para obtenção do título de *Master Scientiae* em Ciências de Florestas Tropicais.

MANAUS
AMAZONAS – BRASIL
2005

DANIVAL VIEIRA DE FREITAS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PAU-
ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke)**

Orientador: Prof. Dr. LUIS ANTÔNIO SERRÃO CONTIM

Co-Orientador: Prof. Dr. CHARLES ROLAND CLEMENT

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, para obtenção do título de *Master Scientiae* em Ciências de Florestas Tropicais.

**MANAUS
AMAZONAS – BRASIL
2005**

Ficha catalográfica

Freitas, Danival Vieira
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E PROPAGAÇÃO IN VITRO DE PAU-ROSA
(*Aniba rosaeodora* Ducke) / Danival Vieira de Freitas – Manaus, UFAM/INPA,
2005.

58f.: il.

Dissertação (Mestrado) - INPA/UFAM, Manaus, 2005.

Orientador: Contim, Luis Antônio Serrão

Co-Orientador: Clement, Charles Roland

Área de concentração: Ciências Florestais / Conservação de Recursos
Genéticos

1. Citogenética. 2. Citometria de Fluxo. 3. Conservação genética. 4.
micropropagação.
I. Título.

Sinopse:

Realizou-se a caracterização genética de *Aniba rosaeodora* Ducke, espécie florestal da Amazônia ameaçada de extinção, referente à análise do conteúdo de DNA nuclear (ng) e a montagem do cariótipo; e ainda, o estabelecimento de um protocolo viável de micropropagação que possa ser utilizado na propagação e nos programas de melhoramento e conservação genética.

Palavras-chave: Citogenética; Citometria de Fluxo; Conservação genética; micropropagação.

Dedico a Deus,

aos meus Pais e meus irmãos,

e a Daniela ...

... eles sabem porque.

AGRADECIMENTO

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia (INPA) em especial a Coordenação de Pesquisas em Silvicultura Tropical, pela oportunidade e disposição de sua infraestrutura para realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos recursos concedidos para realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo apoio à participação em eventos científicos, para divulgação parcial deste trabalho .

Ao Professor Dr. Luis Antônio S. Contim, pela orientação, amizade, confiança em mim depositada no desenvolvimento deste trabalho e oportunidade de fazer parte de sua história como seu primeiro orientado.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal, pela estrutura fornecida para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), nas pessoas do Professor Carlos Carvalho do Departamento de Biologia Geral pela parceria na condução de diversas atividades de pesquisas, e ao Professor Acelino Couto Alfenas do Departamento de Fitopatologia pelo incentivo, amizade e ensinamentos transmitidos desde a iniciação científica.

Aos Pesquisadores Charles Roland Clement e Eduardo Ossamu Nagao, pela amizade, pelas sugestões e pelo aconselhamento.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões.

Aos colegas dos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetal (UFAM) e Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela amizade e auxílio nas atividades de pesquisa.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Ciências de Florestas Tropicais pela convivência e amizade.

Aos professores dos Programas de Ciências de Florestas Tropicais (CFT) e Genética, Biologia Evolutiva e Conservação, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da Coordenação de Silvicultura Tropical, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

São os meus sinceros agradecimentos!

ÍNDICE

RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I - CITOGENÉTICA E CITOMETRIA DE FLUXO	4
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1. Material vegetal	7
2.2. Citometria de Fluxo	7
2.3. Preparações citogenéticas	8
2.4. Análise de imagens	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
3.1. Citometria de Fluxo	10
3.2. Citogenética.....	11
CAPÍTULO II – MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PAU-ROSA (<i>Aniba rosaedora</i> Ducke) AMEAÇADO DE EXTINÇÃO	17
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Material Vegetal.....	21
2.2. Desinfestação e Isolamento do Material.....	22
2.3. Estabelecimento <i>in vitro</i>	24
2.4. Condições Ambientais das Culturas.....	25
2.5. Análise Estatística	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1. Desinfestação e Isolamento	26
3.2. Estabelecimento <i>in vitro</i>	31
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
5. BIBLIOGRAFIA	38

RESUMO

FREITAS, Danival Vieira, M.S., Instituto Nacional de Pesquisas, fevereiro de 2005.

Caracterização Genética e Propagação *in vitro* de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Orientador: Luis Antônio Serrão Contim. Co-Orientador: Charles Roland Clement

Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae) tem importância econômica e ecológica na região Amazônica. Como consequência desta importância econômica, as populações de pau-rosa têm sido dizimadas na floresta. Espécies de nove gêneros de Lauraceae têm seu cariótipo caracterizado com $n=x=12$ cromossomos na fase gametofítica. O gênero *Aniba* é um dos membros da família Lauraceae menos estudado e os genomas destas espécies são ainda desconhecidos. Os resultados da citogenética apresentaram um cariótipo com 12 pares ($2n=24$) de cromossomos relativamente pequenos, com tamanhos de 1.34 a 2.25 μm . Neste estudo foi identificado a presença da região organizadora do nucléolo no braço curto do cromossomo 7. O tamanho do genoma também foi determinado por citometria de fluxo com valor $2C = 2.32$ pg de DNA (aproximadamente 2.24×10^9 pares de bases). Dentro da necessidade de conservação e propagação da espécie. O objetivo era estabelecer um protocolo viável de micropropagação. A propagação *in vitro* de pau-rosa foi obtido utilizando meristema apical de plântulas em meio MS (Murashige & Skoog) suplementado com a combinação de 6 – Benzilaminopurine (BAP) e indole-3- acetic acid (AIA). Alta taxa de proliferação (4.50 brtações/explante) foi conseguido em 15 μM BAP +10 μM AIA. O enraizamento *in vitro* também foi alto (>60%) com 0

μM BAP + 25 μM AIA. Estes resultados sugerem que a combinação auxina e citocinina são uma alternativa importante para o sucesso na propagação *in vitro* de *A. rosaeodora*, embora requeira um estudo detalhado de cada tratamento para maximizar a proliferação das brotações e a formação de raízes.

ABSTRACT

FREITAS, Danival Vieira, M.S., Instituto Nacional de Pesquisas, fevereiro de 2005.

Genetic Characterization and *In vitro* Propagation of the Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke). Orientador: Luis Antônio Serrão Contim. Co-Orientador: Charles Roland Clement

Amazonian rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae) has ecologic and economic importance in the region. As a consequence of its economic importance, rosewood populations have been decimated in the forest. Species of nine genera of the Lauraceae family have characterized karyotypes with $n=x=12$ chromosomes in the gametophytic phase. The *Aniba* genus is one of the least studied members of the Lauraceae family and the genomes of these species are still undescribed. The karyotype was found to contain 12 pairs ($2n=24$) of relatively small submetacentric chromosomes, with lengths from 1.34 to 2.25 μm . The presence of the nucleolar organizer region in the short arm of chromosome 7 was identified. The genome size was determined by flow cytometry with a $2C$ value = 2.32 pg of DNA (approximately 2.24×10^9 base pairs). In this study, was developed also a system of micropropagation has been for the conservation of the genetic diversity of the rosewood. *In vitro* propagation of rosewood was achieved using seedling shoot tip explants on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with combination 6 – Benzilaminopurine (BAP) and indole- 3- acetic acid (AIA). The greatest proliferation rate (4.50 shoots/explant) was achieved in 15 μM BAP +10 μM AIA. Rooting *in vitro* was also greatest (up to >60%) with 0 μM BAP + 25 μM AIA. These results suggest

that the combination auxin and cytokinina is an alternative important of success *in vitro* propagation of *A. rosaeodora* although require individual optimizations of treatments to maximise shoot and root formation.

INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia é um ambiente de vasta biodiversidade. Devido à exploração florestal desordenada e a carência de tecnologias e fiscalização, várias espécies arbóreas de grande importância para a região estão em processo de extinção ou já foram, praticamente, extintas (Rosa *et al.*, 1997). Dentre estas espécies ameaçadas está o pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), pertencente à família das Lauráceas que se destacam das demais famílias pela sua importância econômica. *A. rosaeodora*, espécie arbórea endêmica da Amazônia apresenta alto valor comercial devido a presença de linalol como componente de seu óleo essencial. O linalol já representou o terceiro produto exportado da região amazônica nos anos de 1971 e 1972, sendo utilizado como fonte de matéria-prima nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e química. A grande demanda e alta cotação no mercado nacional e internacional do óleo essencial de pau-rosa promoveram uma crescente elevação dos preços que atingiram a cotação de US\$80,00 a US\$100,00/litro nos mercados de Manaus (Clay, 1992). Por esse motivo, as populações de pau-rosa foram dizimadas na Floresta Amazônica, existindo um pequeno número de indivíduos remanescentes em reservas florestais (principalmente a Reserva Florestal Adolpho Ducke - INPA/AM, Estação Experimental de Cura-Uma / PA e na gleba Camaçari / Silves-AM). Conseqüentemente houve uma redução crescente na exportação do óleo essencial pela falta de matéria prima. Este pequeno número de indivíduos reduziu também as fontes de variabilidade genética da espécie para programas de seleção, melhoramento e re-implantação da sua exploração no modelo de reservas extrativistas. Apesar da grande importância econômica para a região, são raras as

informações sobre esta espécie, principalmente genéticas, limitando o desenvolvimento de tecnologias de exploração. Outra limitação para a re-introdução da espécie neste modelo é a dificuldade na produção de mudas. O pau-rosa se propaga naturalmente por sementes, que são severamente predadas por pássaros, roedores e insetos. Por outro lado, estudos revelaram que o índice de pegamento de estacas de pau-rosa é próximo de 70% quando obtidas de ramos juvenis, mas há pouca disponibilidade de matrizes para a produção de mudas em grande escala (Sampaio, 1987). Assim, a abordagem biotecnológica e genética tentará suprir esta grande demanda de conhecimento por meio da análise cromossômica e propagação *in vitro*.

Os métodos biotecnológicos baseados em cultura de tecidos vegetais têm sido utilizados com sucesso para a propagação e estabelecimento de muitas espécies vegetais arbóreas que apresentam baixas respostas aos métodos convencionais de propagação e para a conservação *in vitro* de espécies ameaçadas de extinção, como o pau-rosa (Bonga e Von Aderkas, 1992; Negash et al., 2001; Sudharsan et al., 2003).

Dentre as espécies arbóreas, o grupo de gimnospermas é o mais estudado citogeneticamente, destacando-se estudos com coníferas e pináceas (Muratova e Sedelnikova, 2000). Um evento marcante para a citogenética de espécies arbóreas foi a descoberta da origem triplóide de *Populus tremula* L., sendo este o primeiro exemplo do potencial das informações citogenéticas no melhoramento dessas espécies (Scharbaum, 2000). Gêneros com *Eucalyptus* L. Herit, *Pinus* L., *Populus* L. e *Junglaus* L., em que predomina o hábito arbóreo, são os mais estudados do ponto de vista do melhoramento genético e biotecnológico (Studart-Guimarães et al.,

2003), evidenciando a falta de estudos botânicos e genéticos com espécies arbóreas nativas.

Nesta dissertação estão sendo apresentados os resultados da caracterização genética de *A. rosaeodora* Ducke, referente à análise do conteúdo de DNA nuclear (ng) e a montagem do cariótipo, e o estabelecimento de um protocolo viável de micropropagação que possa ser utilizado na propagação e nos programas de melhoramento e conservação genética.

CAPÍTULO I CITOGENÉTICA E CITOMETRIA DE FLUXO DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke – Lauraceae)

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é um ambiente de vasta biodiversidade e, ao mesmo tempo, um ambiente desconhecido (Bawa e Seidler, 1998). Devido à exploração florestal intensa, várias espécies de grande importância para a região estão em processo de extinção ou já foram, praticamente, extintas (Rosa *et al.*, 1997). O pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) é uma espécie tipicamente amazônica, que produz um óleo essencial com grande demanda e alta cotação no mercado nacional e internacional. Por esse motivo, as populações de pau-rosa foram dizimadas em seus centros de origem na Floresta Amazônica, existindo um pequeno número de indivíduos remanescentes em reservas florestais, principalmente no estado do Amazonas, Brasil, levando a sua inclusão na lista das espécies ameaçadas de extinção na Amazônia brasileira (IBAMA, 1992). O óleo extraído do pau-rosa é constituído em grande parte de linalol, utilizado como fixador na indústria de cosméticos (Vainstein *et al.*, 2001) e, pesquisas recentes, confirmaram sua utilização terapêutica, com propriedades farmacológicas anestésicas (Ghelardini *et al.*, 1999) e antimicrobianas (Rosa *et al.*, 2003; Inouye *et al.*, 2001), potencializando o desenvolvimento de novos fármacos a base desta substância.

A família Lauraceae é composta por 52 gêneros e aproximadamente 2500 - 3000 espécies classificadas (Ribeiro *et al.*, 1999), tendo distribuição fitogeográfica do tipo tropical e subtropical, com concentração nos neotrópicos e sudeste da Ásia,

sendo que os únicos gêneros encontrados em climas temperados são *Lauros*, *Lindera*, *Litseea*, *Persea* e *Sassafras*. Esta família possui espécies de difícil identificação e, no caso do Pau-rosa, é comum a confusão com espécies do gênero *Ocotea* (Ribeiro *et al.*, 1999). O gênero *Aniba* apresenta somente uma espécie não arbórea (*Aniba lancifolia*), e as restantes são, em sua maioria, plantas arbóreas (Takhtajan, 1997), sendo que na região amazônica encontram-se três espécies de grande porte: *A. canelilla*, *A. férrea* e *A. rosaeodora* (Kubitzki e Renner, 1982). Existem evidências indicando que os centros de diversidade do gênero *Aniba* seriam a Amazônia da Guiana e Amazônia central (próximo à cidade de Manaus, Brasil). Espécies de pelo menos nove gêneros desta família, em sua maioria de clima temperado, tiveram o número de cromossomos quantificados, indicando que o número de cromossomos característico da família Lauraceae, na fase gametofítica, parece ser de $n=12$, com alguns casos de poliploidização (Goldblatt e Johnson 2000). Os gêneros *Adenodaphne* (Carr e McPherson, 1986), *Lindera* (Wu, 1995), *Machilus* (Sandhu e Mann, 1988), *Neolitsea* (Chatha e Bir, 1987), *Persea* (Chen, 1993), *Phoebe* (Sandhu & Mann, 1988) e *Sassafras* (Huang *et al.*, 1989) possuem $n=12$ para todas as espécies identificadas até o momento. O gênero *Litsea* (Huang *et al.*, 1988) possui apenas uma espécie com o número de cromossomos quantificado (*L. glutinosa*), com $n=24$, sendo que as outras cinco espécies identificadas deste gênero possuem $n=12$. O gênero *Lauros* é representado por espécies que possuem $2n=12X$, sendo que X varia de 3 a 6 (Todua, 1987).

Existe pouca informação sobre a estrutura do genoma das espécies do gênero *Aniba* (Lauraceae), como o número e a morfologia dos cromossomos e o tamanho do genoma. Apesar da grande importância científica, ecológica e

econômica de *A. rosaeodora*, as informações genéticas também são raras como nas demais espécies do gênero. Esta escassez de informações tem limitado o desenvolvimento de programas de melhoramento genético e ainda dificultado o desenvolvimento de tecnologias de exploração racional da espécie.

O presente capítulo teve como objetivo a caracterização citogenética do cariótipo e a quantificação de DNA do genoma nuclear da espécie *A. rosaeodora*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

As sementes das plântulas de *Aniba rosaeodora* utilizadas foram coletadas de indivíduos remanescentes de populações de regeneração natural, pertencentes às coleções da Reserva Florestal Adolpho Ducke/INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia Manaus/AM - Brasil) e da Reserva Florestal de Silves (AVIVE, Associação Vida Verde da Amazônia Silves/AM - Brasil). As sementes foram germinadas em câmaras de germinação durante 15 dias a 30 °C e cultivadas no viveiro de mudas florestais do INPA (308'S, 59052'W).

2.2. Citometria de Fluxo

O método utilizado foi descrito por Dolezel e Göhde, 1995, com pequenas modificações. Folhas jovens e vigorosas de pau-rosa foram lavadas, acondicionadas em recipiente contendo água destilada e mantidas a 4 °C. Fragmentos de folhas de 2 cm² foram cortados em 1 mL de solução tampão de lise Otto I (0,1 M de ácido cítrico monohidratado mais 0,5% (v/v) Tween 20). A suspensão foi filtrada em uma tela com poros de 40 µm de diâmetro, e transferida para tubos. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e a camada de núcleos ressuspensa em tampão. A suspensão nuclear foi separada em duas alíquotas. Uma amostra foi corada com solução de 15 µM de DAPI em tampão Otto-II (0.4 mM Na₂HPO₄.12H₂O) por 15

minutos no escuro , e a outra com iodeto de propídio (PI) mais 50 µg/ml RNase, em tampão Otto-II, por 30 minutos. A análise da suspensão nuclear foi realizada por um citômetro de fluxo Partec II/III (Partec GmbH, Munster Germany), equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO-100 W) e filtros (KG 1, BG 38, GG 435) para UV. Para iodeto de propídio foi utilizado um laser de íon argônio de 480 nm (20 mW) com TK 560 e RG 610 filtros. Amostras de *Raphanus sativus* CV Saxa (Valor 2C = 1,11 pg DNA) foram utilizados como padrão interno, e foram cedidas pelo Dr Jaroslav Dolezel (Instituto de Botânica Experimental, Republica Tcheca). Três folhas jovens de cada três plantas e, aproximadamente, 10 mil núcleos de cada planta foram analisados pelo programa FlowMax[®] Partec[™]. Amostragens com valores de coeficientes de variação acima de 3% foram desconsiderados. Os resultados apresentados em pg foram transformados para pares de base como descrito por Bennett e Smith (1976).

2.3. Preparações citogenéticas

Raízes de plântulas de Pau-rosa foram tratadas com solução de 5 µM de Oryzalina durante 3 h, a 30 °C. Em seguida, foram lavadas em água destilada por 15 min e fixadas em solução metanol/ácido acético (3:1), a -20 °C. Após 24 hs, as raízes foram lavadas e maceradas com solução de Flaxzyme:água destilada (1:10) a 35 °C por 90 min. As radículas foram lavadas por 20 min em água destilada, fixadas 3X em solução metanol:ácido acético (3:1) e armazenadas a -20 °C. A preparação citogenética foi preparada pela técnica da dissociação celular do meristema apical (Carvalho e Saraiva, 1997) e secas ao ar. Posteriormente, as lâminas foram coradas

em solução de Giemsa 5% em tampão fosfato (pH 6.8) por 5min, lavadas duas vezes em água destilada e secas ao ar em placa aquecida a 50 °C.

2.4. Análise de imagens

Vinte imagens de metáfase de boa qualidade foram capturadas por uma vídeo-câmera conectada ao microscópio OlympusTMBX60, com objetiva de imersão 100X, e processadas em computador MacintoshTM (G4). As análises da morfologia dos cromossomos foram realizadas pelo programa Image SXM (Rasband, 1997). Os braços de cada cromossomo foram medidos em pixels e convertidos para escala de micrômetros. O índice centromérico foi determinado segundo o critério de classificação morfológica dos cromossomos (Guerra,1986).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Citometria de Fluxo

A análise simultânea da suspensão de núcleos no citômetro de fluxo gerou histogramas com picos correspondentes à média dos núcleos em G1/G0 contendo DNA. O pico de *Raphanus sativus* cv. Saxa foi calibrado para o canal 100 (padrão com valor $2C = 1.11$ pg DNA). Os resultados dos núcleos corados com DAPI de três amostras de *Aniba rosaeodora* apresentaram picos G1/G0 no canal 212, 213 e 214, correspondendo ao valor médio de $2C = 2,36$ pg DNA (**Figura 1a**). As mesmas amostras de núcleo em suspensão de *Aniba rosaeodora* coradas com PI geraram picos G1/G0 no canal 201, 209 e 211, correspondendo ao valor médio de $2C = 2,32$ pg DNA (**Figura 1b**). As duas populações de pau-rosa apresentaram picos com cobertura semelhante, ou seja, não existe diferença no conteúdo de DNA. A segunda mensuração do conteúdo de DNA ($2C = 2,32$ pg DNA) é equivalente a 2.24×10^9 pares de bases.

A citometria de fluxo se apresenta como opção nos estudos de genomas vegetais. Esta ferramenta facilita a rápida seleção do nível de ploidia, da determinação do tamanho do genoma, ou de uma conveniente detecção do modo de reprodução (Doležel, 1997).

O conhecimento do tamanho do genoma tem recebido cada vez mais atenção nos últimos anos, sendo muito importante em diversas áreas de investigação. Este conhecimento tem sido bastante útil em estudos de relações filogenéticas (Zoldos *et al.* 1998; Lysák *et al.* 1999; Torrell e Valles, 2001; Moscone *et al.* 2003; Suda *et al.*

2003), na análise de possíveis correlações entre o tamanho do genoma e características fisiológicas e agronômicas (Biradar *et al.*, 1994).

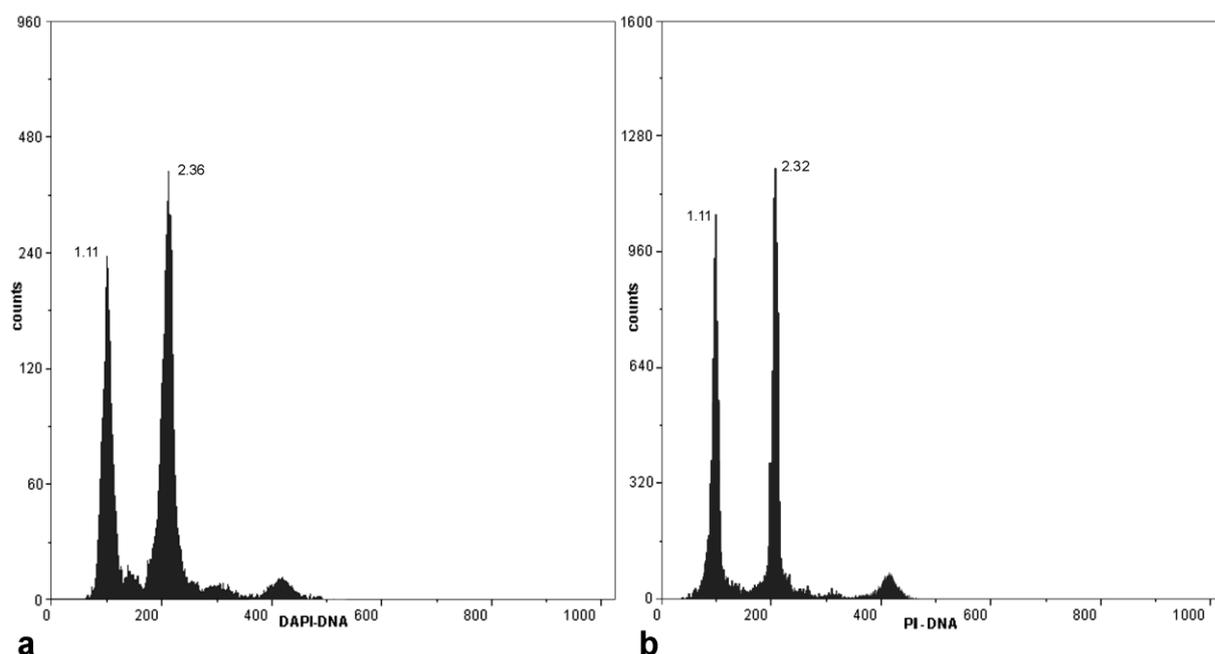


Figure 1 Histograma-DNA com picos G1/G0 resultado de processos simultâneos de suspensão nuclear de tecidos de folhas jovens (a) *Raphanus sativus* CV Saxa (padrão interno: $2C=1.11$ pg) e *Aniba rosaeodora* ($2C=2.36$ pg) corado com DAPI, e (b) *Raphanus sativus* CV Saxa e *Aniba rosaeodora* ($2C=2.32$ pg) corado com iodeto de propídio.

3.2. Citogenética

Associando-se metodologias citogenéticas e de sistemas de análise de imagem obteve-se metáfases com adequada qualidade citogenética (**Figura 2**) para caracterização morfológica e montagem do kariograma (**Figura 3**). A morfologia dos cromossomos do pau-rosa foi caracterizada, com valores dos comprimentos dos braços em micrômetros e classificados em pares de homólogos (**Tabela 1**). A espécie é representada por um conjunto de cromossomos submetacêntricos ($2n=24$)

relativamente pequenos, com variações no comprimento de 1,34 a 2,25 μm . Conforme critérios de classificação sugeridos por Guerra (1986), todos os cromossomos foram numerados em ordem decrescente de tamanho (1 a 12). A região organizadora do nucléolo foi identificada pela presença da constrição secundária nos braços curtos dos cromossomos 7 (**Figura 2**). Nenhuma diferença no cariótipo foi observada entre as populações.

A presença de nucléolos unidos aos cromossomos condensados (**Figura 2**) não é comum após o tratamento com herbicidas em preparações citológicas. Resultados similares foram observados também em *Capsicum* sp e em *Bixa orellana* de (dados não apresentados).

O conjunto haplóide, verificado na espécie *A. rosaeodora*, corresponde ao número básico de cromossomos ($x=12$) característico da maioria das espécies de Lauraceae. Estes dados já foram verificados em pelo menos nove gêneros desta família (Goldblatt e Johnson 2000). Embora o número característico de cromossomos seja conservado, o índice nuclear do DNA varia consideravelmente entre os membros da família das lauraceae e os resultados estão dentro da escala previamente relatada.

Coletivamente estes resultados descrevem as características básicas da organização do genoma de *A. rosaeodora*, como a quantificação do conteúdo de DNA nuclear, o número e a morfologia dos cromossomos da espécie.

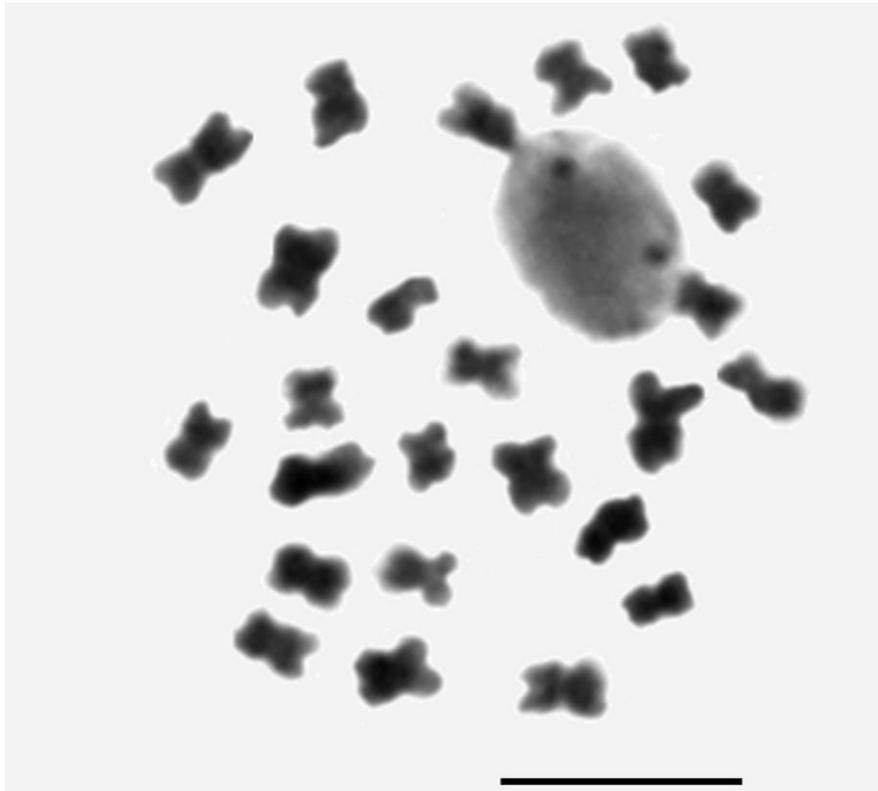


Figure 2 Cromossomos em metáfase obtidos de células radiculares de pau-rosa pré-tratadas com 5 mM de oryzalina e coradas com solução de Giemsa, apresentando $2n=24$ cromossomos. A região organizadora do nucléolo pode ser identificada no braço curto do par de cromossomos com constrição secundária e satélite, associada com o nucléolo. Note que após o tratamento com herbicida os cromossomos estão condensados como a morfologia padrão do C-metáfase quando o nucléolo permanece unido à constrição secundária. Bar = 5 μ m.

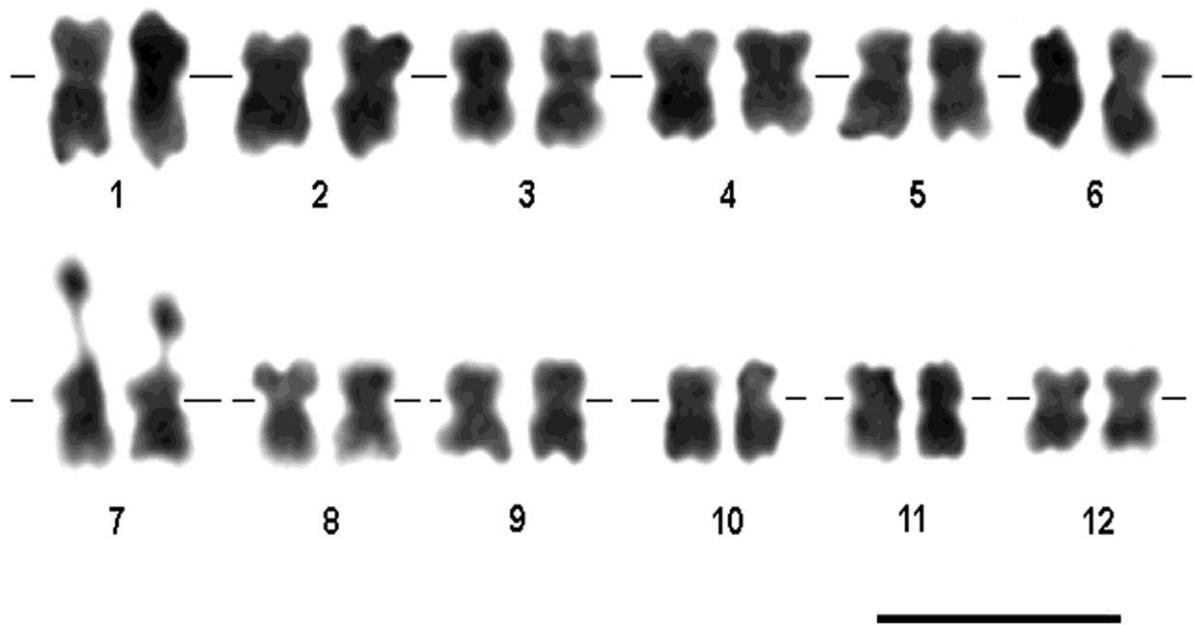


Figure 3 Cariograma ($2n = 24$) do conjunto de cromossomos Figura 3. Os 12 pares de cromossomos submetacêntrico (incluindo o par 7 apresentando a constrição secundária NOR) estão presentes. Note que a abertura evidente no braço curto do par 7 foi produzida pelo estiramento da região satélite. Os nucléolos foram digitalmente removidos da imagem original. Bar = 5 μ m.

Tabela 1 Análises e classificação da morfologia dos cromossomos de *Aniba rosaeodora* (2n=24).

Cromossomo	Comprimento (μm)	Braço		r	cr	Classe	Tamanho Relativo (%)
		curto	longo				
1	2,25	0,89	1,36	1,53	39,6	SM	11,09
2	1,88	0,71	1,17	1,65	37,8	SM	9,27
3	1,80	0,69	1,11	1,61	38,3	SM	8,87
4	1,79	0,64	1,15	1,80	35,8	SM	8,82
5	1,76	0,61	1,15	1,89	34,7	SM	8,67
6	1,75	0,57	1,18	2,07	32,6	SM	8,62
7	1,62	0,46	1,16	2,52	28,4	SM	7,98
8	1,55	0,50	1,05	2,10	32,3	SM	7,64
9	1,55	0,50	1,05	2,10	32,3	SM	7,64
10	1,51	0,49	1,02	2,08	32,5	SM	7,44
11	1,49	0,50	0,99	1,98	33,6	SM	7,34
12	1,34	0,48	0,86	1,79	35,8	SM	6,60

Onde:

r = proporção entre os braços;

cr = razão centromérica;

SM = cromossomo submetacêntrico.

4. CONSIDERAÇÃO FINAL

O conteúdo de DNA nuclear pode ser estimado por diversos métodos, tais como a análise química, a densitometria (Feulgen) e citometria de fluxo. Mas a citometria de fluxo se apresenta como uma técnica simples, rápida, com custo relativamente baixo e com elevada precisão.

A técnica de citometria de fluxo associada à citogenética geram informações que podem auxiliar na determinação do nível de ploidia em plantas, e são relevantes para os estudos de melhoramento de plantas, fisiologia vegetal, ecologia e evolução.

Historicamente, quando estudos citogenéticos de espécies arbóreas são comparados aos de espécies cultivadas e/ou nativas com valor econômico, sua limitação é evidente, restringindo-se as informações básicas sobre a estrutura genômica e a inclusão dessas espécies em programas de melhoramento e conservação.

CAPÍTULO II MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke) AMEAÇADO DE EXTINÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A conservação dos recursos genéticos de plantas é de suma importância para a manutenção da disponibilidade de germoplasma para programas de melhoramento de plantas (Normah *et al.*, 1997; Vengadesan *et al.*, 2002; Sudhersan *et al.*, 2003). Os métodos biotecnológicos baseados nas técnicas de cultura de tecidos *in vitro* propiciam a regeneração, propagação maciça e auxilia a domesticação de genótipos superiores de populações selvagens, em programas de melhoramento de espécies florestais para o sucesso do manejo e reflorestamento (Al-Wasel, 2000; Ndoye *et al.*, 2003).

A cultura de tecidos tem deste modo, auxiliado na conservação de germoplasmas e utilização da diversidade genética, principalmente quando as técnicas convencionais de propagação são difíceis de serem empregadas, isto é, a conservação de sementes não é viável, apresentando baixo ou longo tempo para germinação e “gene-banks” são considerados caros ou de risco, (Bonga e Von Aderkas, 1992; Ashmore, 1997; Al-Wasel, 2000; Negash *et al.*, 2001; Vengadesan *et al.*, 2002).

Aniba rosaeodora Ducke. (Lauraceae), conhecida por pau-rosa (Br.), rosewood (Eng.) e bois de Rose Femelle (Fr.) é uma espécie florestal endêmica na Amazônia, mas ameaçada de extinção. Historicamente, teve sua origem comercial na Guiana Francesa e no território do Amapá e no Pará (May e Barata, 2004). O

pau-rosa é conhecido mundialmente pela suas características aromáticas e a mais de um século, a espécie tem sido largamente utilizada para extração de óleo essencial rico em linalol e fragrâncias para indústria de perfumes (Alencar e Fernandes, 1978). Recentemente pesquisas reportaram que o óleo essencial também pode apresentar propriedades químicas e terapêuticas como anestésico (Ghelardini *et al.*, 1999), anticéptico (Chao *et al.*, 2000; Inouye *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2003; Simic *et al.*, 2004) e fungicida (Vanneste, 2002), com potencial para o desenvolvimento de novos produtos. Nas últimas décadas a valorização do óleo essencial de pau-rosa desencadeou um processo de exploração desordenada, sendo agravada pela carência de tecnologias para exploração e uma ineficiente fiscalização, conduzido a sua inclusão na lista de espécies em perigo extinção no Brasil (IBAMA, 1992) e na lista vermelha divulgada pela União Internacional para Conservação da natureza (IUCN, 2004). Com base em uma série de discussões com produtores e outras organizações locais, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) promulgou uma lei de regulamentação, permitindo a extração controlada de pau-rosa da Amazônia, mas exigindo a preparação e aprovação de planos de manejo sustentável, e reflorestamento proporcional para extração (IBAMA, 1998).

A. rosaeodora é propagada naturalmente por sementes, entretanto o ciclo de floração é bastante irregular (Santana, 2000) e os cultivos produzem plantas heterogêneas relacionadas com a qualidade e produção do óleo essencial (Santos, 2004), sendo que poucas técnicas tem sido desenvolvidas para propagação vegetativa da espécie. As sementes de pau-rosa ainda são recalcitrantes e intolerantes à refrigeração impossibilitando sua estocagem (Sampaio, 2003). A

germinação ocorre entre 60 a 120 dias após o plantio com taxas que variam de 37 a 90% (Alencar e Fernandes, 1978). Outro problema que limita a produção de mudas de pau-rosa por sementes é a severa predação por pássaros da família Psitacidae e Ranfastídeos que atacam os frutos antes da maturação. Durante a fase intermediária de desenvolvimento até a maturação completa dos frutos ocorre alta infestação de insetos, principalmente por uma espécie de coleóptero (Curculionidae), do gênero *Heilipus*, e um *Lepidoptera*. Além disto, cutias predam os frutos após a queda no solo (Spironello *et al.*, 2003). Todas estas razões acima produzidas pelo pau-rosa propiciam um alvo apropriado para propagação *in vitro*.

Diversas técnicas de cultura de tecidos estão disponíveis para as espécies florestais. Estas incluem a micropropagação, organogênese, variação somaclonal, mutagênese e embriogêneses somática (Hartmann, 2002). Os avanços significativos nas técnicas de micropropagação, especialmente de espécies lenhosas, promoveram seu uso intensivo em relação às demais técnicas, por permitir a fixação de ganhos genéticos nas populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes. Conseqüentemente, a propagação clonal em larga escala de espécies incipientemente domesticadas seria dependente unicamente de uma eficiente capacidade de produção laboratorial (Vaz e Nogueroles, 1981).

Sendo assim, o emprego da técnica de micropropagação apresenta-se como alternativa para a propagação de genótipos superiores e conservação *ex situ* ou *in vitro* de *A. rosaeodora*. Este estudo pioneiro foi conduzido para desenvolver um protocolo de desinfestação e micropropagação de *A. rosaeodora*, como parte dos

esforços para conservação da espécie. Todavia, os resultados deste trabalho podem ser utilizados em futuros estudos, para verificação da viabilidade de um sistema de micropropagação de pau-rosa usando explantes de árvores elites.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Frutos de *A. rosaeodora* foram coletados de populações nativas da Reserva Florestal Adolpho Ducke - INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil), localizada no km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010). A Reserva tem uma área de 100 km² (10 x 10 km) e está situada na periferia de Manaus, coordenadas 02° 53' de latitude S e 59° 58' de longitude W (**Figura 1**). A variação altitudinal entre os platôs originais e as partes mais baixas é de aproximadamente 60 m. O solo é caracterizado como argiloso (latossolo amarelo). A coleta ocorreu em Julho de 2004 (estação seca) em duas matrizes situadas na região de vertente. Os frutos foram coletados do solo próximos as matrizes. Os frutos foram lavados em água corrente para remover a mucilagem na face das sementes, em seguida foram colocadas em bandejas de 40 x 20 cm com areia lavada para germinar em casa de vegetação, no setor de Silvicultura Tropical do INPA em Manaus. Após 60 dias as mudas receberam pulverizações periódicas com o fungicida benomyl na concentração de 1 g.L⁻¹ por aplicação durante todo o período de coleta de explantes.

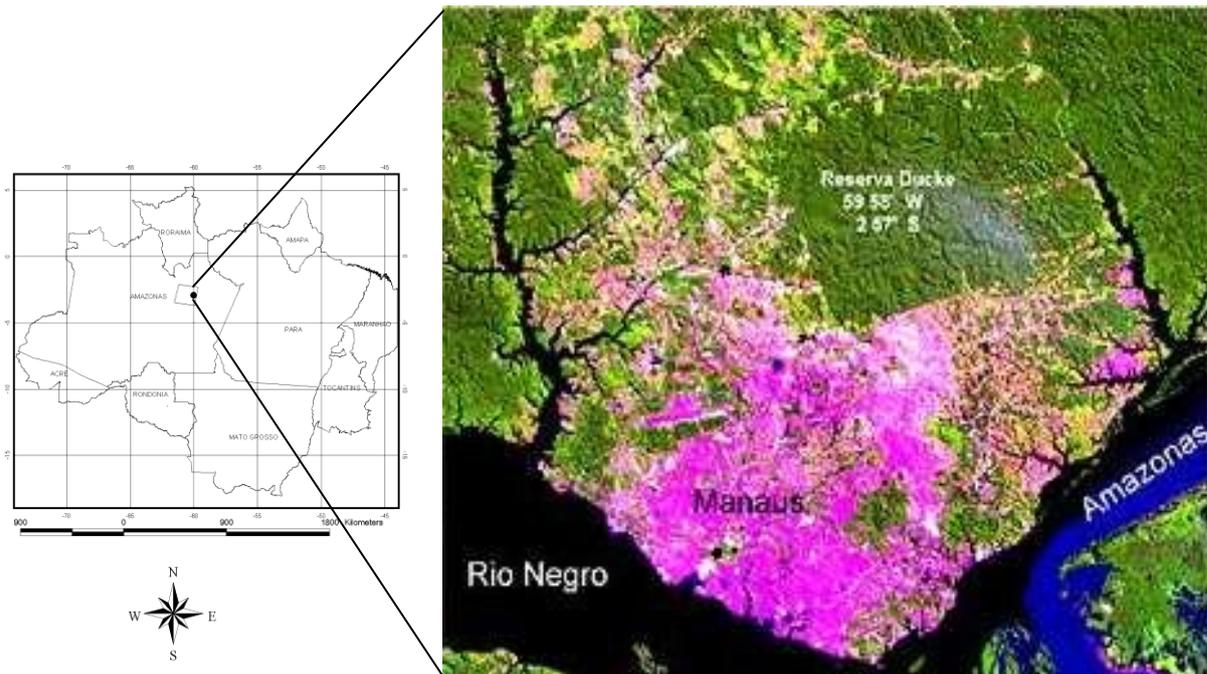


Figura 1 Mapa com os estados que fazem parte da Amazonia Brasileira. O ponto em destaque na figura representa o local de coleta do material vegetal.

2.2. Desinfestação e Isolamento do Material

A retirada dos explantes foi feita a partir das plântulas mantidas em casa-de-vegetação com três meses de idade (**Figura 2A**). Ápices caulinares foram utilizados como explantes primários, os quais foram submetidos a três tratamentos para desinfestação, passando inicialmente por uma lavagem rápida em água destilada contendo de Tween 20 (2 gotas Tween/100mL de H₂O), seguida de um enxágüe em água destilada. A seguir, foram realizados imersões com diferentes tempos de exposição dos explantes (2, 3 e 5 minutos) em álcool etílico, a 70% (v/v), sendo posteriormente, mergulhados em hipoclorito de sódio comercial (água sanitária), a 2,5% (v/v) (3,5 e 10 minutos), e finalmente, mantidos em água destilada autoclavada. Foram avaliados dois agente solidificante para o isolamento com meio

MS (Murashige e Skoog, 1962). No tratamento I e II foi empregado 8 g.L⁻¹ de Agar e, no tratamento III, 2,5% de Agarose mais 500 mg.L⁻¹ de benomil (**Tabela 1**). O pH dos meios foi ajustado para 5,7 antes da inclusão do Agar ou Agarose. Posteriormente, os meios foram distribuídos em alíquotas de 10 ml por tubo de ensaio e autoclavados a 121°C, sob pressão de 1 kg.cm⁻², durante 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes (2,0 a 3,0 cm de comprimento) foram transferidos para tubos de ensaio (25 X 150 mm) contendo o meio básico MS autoclavado e estocados na sala de incubação (**Figura 2B e 2C**). Esse experimento foi realizado utilizando-se no mínimo 50 explantes/tratamento. Após 20 dias foram avaliadas as percentagens de sobrevivência, oxidação e contaminação por fungos e bactérias.

Tabela 1 Efeito do período de exposição ao hipoclorito, álcool e imersão em água destilada estéril na desinfestação de explantes de *A. rosaeodora*, UFAM/INPA, Manaus, 2004.

Tratamentos	Substrato	Hipoclorito	Álcool	Agente Gelificante	Benomy I
	Germinação	Exposição (min.)	Exposição (min.)	Meio de cultura	mg.L⁻¹
I	Terra preta	3	2	Agar	-
II	Areia lavada	3	2	Agar	-
III	Areia lavada	10	5	Agar	-
IV	Areia lavada	10	5	Agarose	500

2.3. Estabelecimento *in vitro*

Os explantes que sobreviveram ao estabelecimento inicial, seguido de tratamentos para desinfestação e antioxidação, foram transferidos para o meio de multiplicação contendo Reguladores de Crescimento de Plantas (PGRs). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, perfazendo 12 tratamentos com combinações de BAP (0; 5; 15 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e AIA (0, 10, 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) nos meios MS (**Tabela 2**). O pH foi ajustado para 5,7 antes da inclusão de 9 g.L^{-1} de Agar e posteriormente, o meio foi distribuído em alíquotas de 10 ml por tubo de ensaio e autoclavados a 121 °C, sob pressão de 1 kg.cm^{-2} , durante 20 minutos. Cada tratamento era composto de 16 explantes/tratamento. As culturas foram avaliadas após 6, 7 e 8 semanas com relação ao crescimento, número de raízes e brotações múltiplas aproveitáveis (>5 mm) por explante.

Tabela 2 Esquema do delineamento inteiramente casualizado (fatorial 4x3), composto por 12 tratamentos com diferentes concentrações da combinação BAP e AIA, utilizado para o estabelecimento *in vitro*, Manaus, INPA/UFAM, 2004.

		BAP			
		0 $\mu\text{M.L}^{-1}$	5 $\mu\text{M.L}^{-1}$	15 $\mu\text{M.L}^{-1}$	25 $\mu\text{M.L}^{-1}$
AIA	0 $\mu\text{M.L}^{-1}$	T1	T2	T3	T4
	10 $\mu\text{M.L}^{-1}$	T5	T6	T7	T8
	25 $\mu\text{M.L}^{-1}$	T9	T10	T11	T12

Onde: T = Tratamento.

2.4. Condições Ambientais das Culturas

Nas fases de isolamento, crescimento, obtenção de raízes e brotações múltiplas, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com controle de temperatura ($25 \pm 2^{\circ} \text{C}$), fotoperíodo (16 h) e intensidade luminosa ($25 \mu\text{E s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$). Com exceção do tratamento III que após o isolamento permaneceu no escuro nos primeiros sete dias com o intuito de impedir a oxidação e depois foi transferido para a sala de crescimento.

2.5. Análise Estatística

A significância dos efeitos dos tratamentos foi analisada pela variância, pelo Teste F. A variação entre as médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste de Duncan em nível de 0,05% de probabilidade utilizando o Sistema de Análise Estatística e Genética — SAEG (Euclides,1983). Para as análises estatísticas, os dados foram transformados em $\text{arc sen } (x/100)^{1/2}$.

3. RESULTADOS & DISCUSSÃO

3.1. Desinfestação e Isolamento

A obtenção de explantes livres de contaminação foi testada pelo tipo de substrato utilizado para a germinação de sementes e por diferentes tempos de exposição dos explantes às soluções de hipoclorito de sódio comercial 2,5% e etanol 50%. A percentagem de contaminação de explantes de pau-rosa com a utilização de terra preta como substrato para a germinação das sementes provocou um alto índice de contaminação (88,0%), inviabilizando praticamente todo o material para o cultivo. A utilização de areia lavada aumentou significativamente a recuperação de explantes livres de contaminação (tratamentos II, III e IV). A desinfestação dos explantes foi potencializada pelo aumento dos tempos de exposição às soluções de hipoclorito de sódio e etanol, que atuam principalmente sobre contaminantes exógenos. A melhor taxa de desinfestação foi observada após a imersão dos explantes por 10 min. em solução de hipoclorito de sódio, 5 min. em álcool e com a adição do fungicida benomil ao meio de cultura, apresentando uma taxa de contaminação de 26,75% (**Tabela 3**).

Após os tratamentos para a desinfestação, os explantes foram imersos por 1 hora em água destilada estéril e cultivados por sete dias no escuro. Este procedimento é justificado pela redução da presença de substâncias fenólicas exsudadas dos tecidos injuriados dos explantes e, por consequência, reduzindo a presença de oxidação fenólica. A oxidação fenólica foi observada nos tratamentos I, II e III, quando o agar foi utilizado como agente solidificante do meio de cultura, mas

foi completamente inexistente no tratamento IV, onde o agente solidificante foi a agarose (**Tabela 3**). Os melhores resultados de sobrevivência dos explantes foram obtidos com os tratamentos III e IV, não apresentando diferenças significativas de acordo com a análise de variância (**Tabela 3**). Embora o percentual de sobrevivência do tratamento IV (73,25%) seja superior ao do tratamento III (56,46%). Os índices de sobrevivência são inversamente proporcionais aos índices de contaminação e oxidação, visto que os explantes contaminados são considerados inadequados para as demais etapas in vitro.

No tratamento IV, o qual recebeu uma dosagem de 500 mg.L⁻¹ de benomyl, houve grande incidência de calos friáveis, de coloração clara, e o aparecimento de raízes adventícias (**Figura 2d**).

Tabela 3 Efeito do período de exposição ao hipoclorito, álcool e imersão em água destilada estéril na desinfestação de explantes de *A. rosaeodora*, UFAM/INPA, Manaus, 2004.

<i>Tratamentos</i>	<i>Contaminação</i>	<i>Oxidação</i>	<i>Sobrevivência</i>
	%	%	%
<i>I</i>	88,00 A	12 A	0 C
<i>II</i>	47,05 B	19,11 A	33.84 B
<i>III</i>	39,09 BC	3.64 B	56.46 A
<i>IV</i>	26,75 C	0 B	73.25 A
C.V.*	17,84	60,71	-
Quadrado Médio*	1,4	2,04	-

* Dados transformados ($\arcsen(x/100)^{0,5}$).

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 0,05 de probabilidade.

O estabelecimento do cultivo in vitro para espécies arbóreas de florestas tropicais ainda é considerado um desafio, devido às suas características intrínsecas. O passo inicial para o cultivo in vitro refere-se à desinfestação do material e o estabelecimento inicial. Neste período, além da contaminação dos explantes, a ocorrência de oxidação fenólica também é comum. De acordo com George (1993) a concentração e o tempo de exposição aos agentes desinfestantes utilizados dependem do material vegetal, e, diferentes partes da planta apresentam respostas variadas devido à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente elimina os microorganismos e não deve causar danos ou morte aos tecidos, permitindo a sobrevivência dos explantes. O pré-tratamento das plântulas com fungicida sistêmico Benomil e a desinfestação dos explantes com soluções de etanol 70% e hipoclorito de sódio 2,5% (tabela 1) mostrou-se eficiente para a descontaminação do material germinado em areia lavada, com maior eficiência quando usados tempos de imersão mais elevados na desinfestação (tabela 2). A elevada taxa de contaminação no tratamento I pode estar relacionada com o substrato utilizado, a terra preta, por apresentar alta carga microbiana.

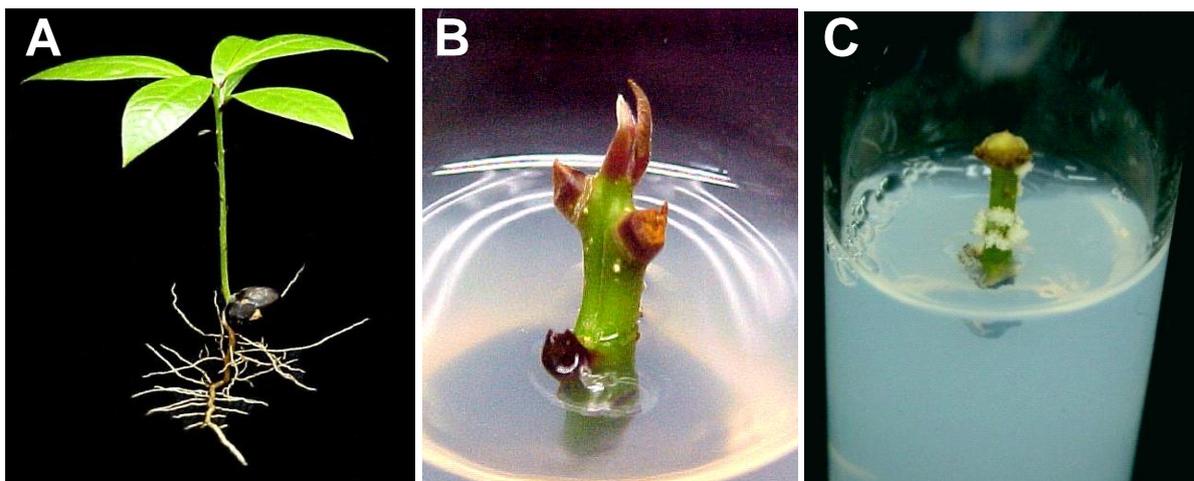


Figura 2 Estabelecimento *in vitro* de *A. rosaeodora*. Morfologia dos explantes de Pau-rosa *in vitro* em meio básico (MS). A) Plântula com dois meses de idade mantidas em casa de vegetação, fonte de explantes. B) Explantes na fase de estabelecimento e desinfestação. C) Indução de calos friáveis e enraizamento em resposta ao benomyl.

A oxidação fenólica derivada da oxidação de metabólitos liberados pelos explantes foi eficientemente inibida pela imersão dos explantes por uma hora em água estéril após a desinfestação e a manutenção do material no escuro durante a primeira semana de cultivo. O cultivo direto do material após a desinfestação e a não ambientação no escuro promovem alto índice de oxidação fenólica, inviabilizando o cultivo (dados não mostrados). O efeito positivo da ambientação dos explantes no escuro ou em baixa intensidade luminosa, durante as primeiras semanas de cultivo, foi observado por Durand-Cresswell et al., (1982) em (espécie). Este procedimento permitiu reduzir a taxa de oxidação fenólica, resultando em melhores índices de sobrevivência dos explantes em cultivo.

Uma baixa taxa de oxidação fenólica foi observada nos explantes de *Aniba rosaeodora* submetidos aos tratamentos I e II, com uma redução significativa no tratamento III. Isto indica que o maior tempo de exposição aos agentes

desinfestantes também teve efeito significativo na redução da oxidação fenólica. A ausência de oxidação fenólica foi obtida com o tratamento IV, quando o agar foi substituído pela agarose como agente de solidificação do meio. O agar parece contribuir para o aparecimento da oxidação em explantes vegetais em meio de cultura, e, o nível de oxidação parece estar associado à qualidade e quantidade de agar utilizado (Ziv e Halevy, 1983). Essas foram medidas que certamente reduziram os percentuais de oxidação nesse trabalho.

Alguns trabalhos de propagação *in vitro* têm mostrado um efeito aditivo do benomyl em cultura de tecidos vegetais. Moreira (1993) e Da Silva et al. (2002) mostraram os efeitos positivos do benomil sobre a propagação *in vitro* de *Citrus sunki* e *Ananas comosus*, respectivamente. A adição de Benomil ao meio de cultura produz efeitos similares aos observados com a adição de reguladores de crescimento, como o aumento do aparecimento de calos e maior número de raízes (Salgado et al., 2001; Da Silva et al., 2002). Chang e Huang (1995), estudando o desenvolvimento de explantes de crisântemo, observaram que o tratamento com benomyl (1000 ppm) + ANA (1000 ppm) promoveu maior crescimento das raízes. Não está claro se a causa deste efeito hormonal é causado pela atuação direta da própria molécula do fungicida, que apresenta semelhanças estruturais com as moléculas de citocininas (Thomas, 1973) ou, se, ocorrem mudanças no ingrediente ativo durante a esterilização do meio de cultura e aparecimento de outros compostos desconhecidos (Skene, 1972). Em contraste, Carvalho et al. (1996), não observaram nenhum efeito da adição do Benomyl ao meio sobre a propagação *in vitro* de *Coffea arabica*. Outros trabalhos mostraram ainda um efeito negativo do Benomil sobre a

sobrevivência, multiplicação e crescimento de explantes de *Eucaliptus* sp. (Watt, Gauntlett e Blakeway 1995) e crisântemo (Wu, 1996).

3.2. Estabelecimento *in vitro*

As combinações de auxinas e citocininas no meio visam aumentar a eficiência da multiplicação das brotações de um determinado explante. Neste trabalho, o número e o tamanho das raízes e brotações por explantes, variaram drasticamente com a variação dos níveis de BAP e AIA no meio basal. Em alguns tratamentos, houve a iniciação da formação de calos de consistência friável e coloração branca, localizados principalmente no caule, embora não tenham se desenvolvido (**Figura 3E**). Collet e La (1987, 1988) observaram que uma breve indução com auxina propiciava menor formação de calo. Já para Welander e Snygg (1987), a formação de calos está muito ligada às concentrações endógenas de AIA.

Para o número de brotos, em todos os tratamentos com uso de AIA e na ausência de BAP, o número máximo de brotações formadas por explante foi o T9 (> 3) (**Figuras 3E**). Quando combinado com BAP no meio, ocorreu a maior formação de brotações no tratamento T7 (15 $\mu\text{M L}^{-1}$ BAP e 10 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIA) com média de 4,50 brotos/explantes, seguido do tratamento T11 (15 $\mu\text{M L}^{-1}$ BAP e 25 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIA) com 3,92 brotos/explantes. Em geral, altos níveis de BAP inibem a proliferação de brotações/explante (Sancak, 1999). Entretanto, a eficácia das citocininas em promover o desenvolvimento de brotos *in vitro* em espécies florestais é bem documentada (McCown e Sellmer, 1987; Bhatt e Dhar, 2004). É sabido que a adição de baixas concentrações de auxinas junto com citocininas aumenta a percentagem

do estabelecimento, assim como o número de brotações em espécies florestais (Rathore *et al.*, 1991). Nestas, a combinação de auxina e citocininas parece ser positiva para o número e o comprimento dos brotos, visto que em outras espécies de plantas, o crescimento das brotações foi inibido e estimulou somente a multiplicação dos brotos (Bhatt e Dhar, 2004). Em trabalho com macieira, Yui (1990) observou melhores resultados com a aplicação de 5 mg L⁻¹ de BAP, independente de ANA, comprovando que aquele regulador de crescimento (BAP) deve ser incorporado ao meio de cultura para permitir uma taxa de multiplicação de brotos.

Os dados obtidos referentes ao ganho em altura encontram-se na **Tabela 4**. Similar ao número de brotos, o tamanho deles também foi influenciado significativamente pelas diferentes concentrações de BAP e AIA no meio (**Figura 3**). Os maiores comprimentos foram observados com o T8 (23,2 mm), no meio contendo 25 µM. L⁻¹ de BAP e 10 µM. L⁻¹ AIA, estatisticamente superior aos demais. Bidwell (1979) relata que AIA e outras auxinas naturais não se acumulam em grandes quantidades nas células devido à existência de processos naturais de inativação, sendo menos eficientes no crescimento que as auxinas sintéticas, as quais se acumulam e permanecem por um período relativamente longo ao serem aplicadas de forma exógena; também são mais estáveis devido à existência de poucos sistemas enzimáticos que as ataquem facilmente, acumulando-se às vezes a ponto de serem fitotóxicas, a exemplo do que ocorreu com o T12 (7,9 mm) que obteve taxa de crescimento inferior ao tratamento controle T1 (9,5 mm).

Em *Daphne gnidium* (Thymeleaceae) o crescimento das brotações induzido por citocininas foi significativamente aumentado pela presença de auxina (AIA) e em algumas espécies, baixas concentrações de auxinas podem promover o crescimento

de gemas axilares pela contenção do efeito inibitório de altas concentrações de citocininas na elongação das brotações (Gavidia *et al.*, 1996). Resultados similares foram obtidos com culturas de *A. rosaeodora*, com combinações de altas concentrações de BAP com concentrações menores de AIA.

O sucesso da micropropagação de algumas espécies florestais é frequentemente limitado pela forma recalcitrante das raízes adventícias (Nunes *et al.*, 2002), o que não ocorreu com pau-rosa. Neste trabalho o máximo de porcentagem de enraizamento (61,5%), foi conseguido com tratamentos com altas concentrações de auxina (**Tabela 4**). O tratamento T9 (25,0 $\mu\text{M. L}^{-1}$ de AIA e 0,0 $\mu\text{M. L}^{-1}$ de BAP) apresentou o melhor desenvolvimento radicular com raízes de até 7,21 mm de comprimento médio (**Tabela 4**). As concentrações de 10,0 e 25 $\mu\text{M L}^{-1}$ de AIA combinadas com 5,0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de BAP também promoveram o enraizamento, embora com baixos percentuais. O enraizamento de diferentes espécies arbóreas frutíferas por Zatký e Molnár (1986), sugere que a acidificação é complementar a ação das auxinas. O efetivo enraizamento de explantes de *Symonanthus bancroftii* foi obtido apenas em pH 5,5 (Panaia *et al.*, 2000), e pH 4,0 foi requerido para duas espécies de *Santalum* (Barlass *et al.*, 1980). Outros estudos realizados com algumas espécies da Austrália preferem o meio um pouco mais ácido (Williams *et al.*, 1985; Taji e Williams, 1996). Neste estudo os tratamentos com maiores concentrações de auxina induziram a iniciação radicular, indicando que o processo de enraizamento de *A. rosaeodora* requer condições mais ácidas.

Tabela 4 Número médio e tamanho médio de brotos e raízes de meristemas apicais de *A. rosaeodora*, em diferentes concentrações da combinação BAP e IAA. INPA/UFAM, Manaus, 2004/2005.

BAP	IAA	Resposta dos explantes				
<i>uM</i>		Tamanho das raízes (mm)	Número de raízes	Enraizamento (%)	Tamanho das brotações (mm)	Número de brotações
	0	0 c	0.0 bc	0	9.5 ± 0.5 bc	0.19 ± 0.1 f
0	10	8.5 ± 2.8 a	0.17 ± 0.09 b	16.7	11.4 ± 1.82 bc	3.0 ± 0.17 bcd
	25	7.21 ± 2.2 a	0.90 ± 0.28 a	61.5	10.3 ± 1.61 bc	3.15 ± 0.08 bc
5	0	0	0.0 bc	0	17.2 ± 2.01 b	2.19 ± 0.12 d
	10	5.0 ± 1.3 b	0.13 ± 0.12 bc	12.5	13.8 ± 3.00 b	1.46 ± 0.20 e
	25	2.0 ± 0.5 bc	0.07 ± 0.06 bc	6.3	11.6 ± 2.26 bc	1.23 ± 0.07 e
15	0	0 c	0.0 bc	0	11.3 ± 0.41 bc	2.44 ± 0.17 cd
	10	0 c	0.0 bc	0	12.3 ± 2.22 bc	4.50 ± 0.45 a
	25	0 c	0.0 bc	0	11.6 ± 0.31 bc	3.92 ± 0.13 ab
25	0	0 c	0.0 bc	0	12.9 ± 1.38 bc	2.58 ± 0.15 cd
	10	0 c	0.0 bc	0	23.2 ± 2.85 a	1.42 ± 0.31 e
	25	0 c	0.0 bc	0	7.9 ± 2.1 c	1.17 ± 0.28 e

* Nas colunas, médias acompanhadas do erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Duncan ≤ 0,05).

As raízes apresentavam-se pouco esbranquiçadas e sem ramificações, ou seja, não houve a formação de raízes secundárias ou pêlos absorventes (**Figura 3C**). Zaniolo 2002) trabalhando com explante de erva-mate elevou significativamente a taxa de enraizamento de explantes que foram previamente tratados com auxinas e posteriormente transferidos para o meio WPM/2 + 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, quando

comparados com os explantes que foram mantidos somente em meio com auxina. Isso pode ser explicado pelo fato da primeira fase ser dependente de auxina e o crescimento e alongamento das raízes ser inibido pela mesma (James e Thurbon, 1979). Esses resultados confirmam os obtidos por (Chalupa, 1981; Ribas e Zanette, 1992; Gupta *et al.*, 1993) com maiores taxas de enraizamento quando o mesmo foi realizado em duas fases. A concentração e o tempo de exposição ao tratamento com auxinas são fatores críticos para a indução de raízes e para os clones de *Quercus* testados, o carvão ativado beneficiou a qualidade das brotações, o desenvolvimento do sistema de raízes e a maior formação de raízes laterais (Sanchez *et al.*, 1996).

Os piores resultados de enraizamento ocorreram nos demais tratamentos com ausência de AIA e altas concentrações de BAP (15 e 25 $\mu\text{M L}^{-1}$). O menor enraizamento na ausência de AIA deve estar relacionado à necessidade de auxina exógena para estimular a rizogênese, o que, segundo Gratapaglia e Machado (1998), é comum em partes aéreas provenientes da multiplicação. Pelo fato do não enraizamento na presença de concentrações elevada de BAP, segundo Pierik (1990), as citocininas são muito ativas na indução e regeneração de explantes, mas inibem a formação de raízes e também previnem o crescimento destas. O percentual de enraizamento obtidos no T9 (>60%), segundo Sol e Solo (1987) estão dentro dos índices comerciais, considerado próximo de 70% de enraizamento.

Finalizando, os resultados obtidos até o momento são passos iniciais na micropropagação de Pau-rosa, sendo necessários novos estudos visando uma maior eficiência na multiplicação e desenvolvimento da tecnologia de propagação desta espécie.

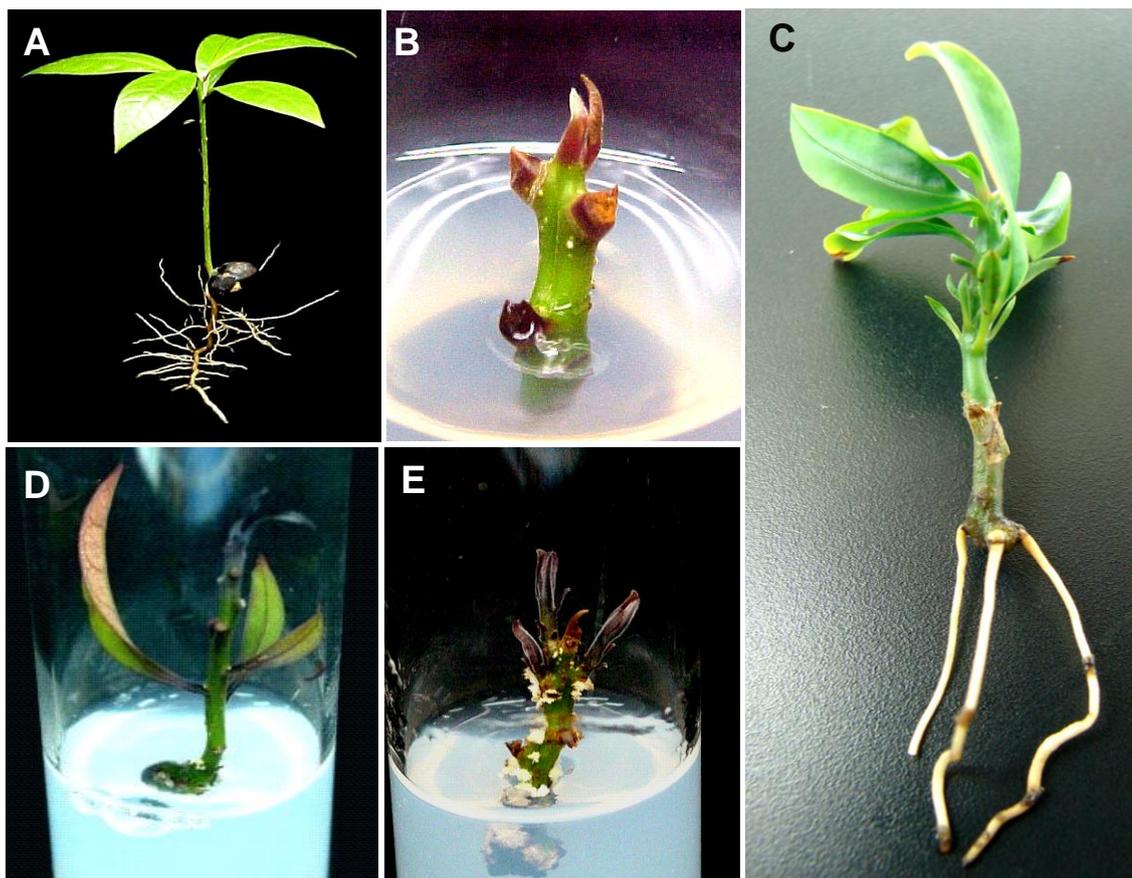


Figure 2 Estabelecimento *in vitro* de *Aniba rosaeodora* em meio MS com diferentes concentrações de IAA e BAP depois de 8 semanas de cultivo. A) Plântulas (fonte de explantes) com aproximadamente três meses no viveiro. B) Explantes estabelecidos assépticamente antes do cultivo *in vitro*. C) Enraizamento de explante em meio suplementado com 25 μM IAA. D) Desenvolvimento das brotações em resposta ao estabelecimento *in vitro* em meio suplementado com 25 μM IAA and 10 μM de BAP. E) Indução de múltiplas gemas adventícias cultivado em meio suplementado com 15 μM BAP e 10 μM IAA.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo descreve um procedimento para estabelecimento e propagação clonal de *A. rosaeodora* pela indução de múltiplas brotações e enraizamento *in vitro*. Os resultados deste estudo, inédito para a espécie, mostram que as técnicas de cultura de tecidos podem iniciar um papel importante na conservação e propagação clonal dos genótipos elites de *A. rosaeodora*, ricos em óleo essencial de elevadas propriedades cosméticas e farmacêuticas.

Deste modo, explantes de Pau-rosa obtidos a partir de ápices caulinares de plântulas jovens apresentaram bom desempenho no estabelecimento em cultivo *in vitro*. A metodologia utilizada foi eficiente em eliminar a contaminação microbiana e inibir o processo de oxidação fenólica, permitindo uma alta taxa de sobrevivência dos explantes. Adicionalmente observamos que a adição de Benomyl no meio de cultivo, além de reduzir a contaminação fúngica, apresentou também um efeito positivo no estabelecimento inicial, induzindo o aparecimento de calos friáveis e raízes adventícias. A tecnologia gerada pelo trabalho viabiliza o estabelecimento *in vitro* da espécie, permitindo o armazenamento e a multiplicação do germoplasma da espécie *in vitro*, com contínua oferta de material vegetal para análises laboratoriais em programas de melhoramento genético.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alencar JC & Fernandes NP (1978). Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies. I. Pau-rosa (*Aniba duckei* (kostemans)). *Acta Amazônica*, 8: 523–54.
- Al-Wasel AS (2000). Micropropagation of *Acacia seyal* Del. *in vitro*. *Journal of Arid Environments*, 46: 425–431.
- Ashmore ES (1997). Status reports on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI, Rome, Italy.
- Barlass M; Grant WJR; Skene KGM (1980). Shoot regeneration *in vitro* from native Australian fruit bearing trees – Quandong and Plum Bush. *Aust. J. Bot.*, 28: 405–409.
- Bawa KS and Seidler R (1998). Natural forest management and conservation of biodiversity in tropical forests. *Conservation Biol* 12(1): 46-55.
- Bennett MD and Smith JB (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 274: 227-274.
- Bhatt ID and Dhar U (2004). Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. – Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *African Journal of Biotechnology*, 3(10): 534 - 540.
- Bidwell RSS (1979). *Fisiologia vegetal*. AGT Editor, México.
- Biradar D P; Bullock DG; Rayburn AL (1994). Nuclear-DNA amount, growth, and yield parameters in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 88 (5): 557-560.

- Bonga JM and Von Anderkas P (1992). *In vitro* Culture of Tree. Kluwer Academic Publisher, Boston, U.S.A, p. 327.
- Carr GD and McPherson G (1986). Chromosome numbers of New Caledonian plants. *Anna Mo Bot Gard.* 73(2): 486-489.
- Carvalho CR and Saraiva LS (1997). High-resolution HKG-banding in Maize Mitotic Chromosomes. *J Plant Res.*, 110: 417-420.
- Chalupa, V. (1981) *In vitro* propagation of birch (*Betula verrucosa* Ehrl.). *Biologia Plantarum*, 23: 472 - 474.
- Chang CS; Huang SC (1995). Studies on growth of chrysanthemum cuttings in different storage conditions before rooting. *Bulletin of Taichung District Agricultural Improvement Station*, 49: 9-18.
- Chao SC; Young DG; Oberg CJ (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12 (5): 639-649
- Chatha GS and Bir SS (1987). Population analysis of some woody species from Palni Hills, south India. *J Cytol Genet*, 22: 83-94.
- Chen R-Y (1993). Chromosome Atlas of Chinese Fruit Trees and Their Close Wild Relatives. *Chromosome Atlas of Chinese Principal Economic Plants*.
- Clay JW et al. (1999) Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 409p.
- Collet GF and La CL (1987). Role of auxin during *in vitro* rhizogenesis of rose and apple tree. *Acta Horticulturae*, 212 : 273 - 80.

- Collet GF and La CL (1988). Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. II- Enracinement *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M.25, 26, 27, MM 106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill (A). Revue Suisse de Viticulture. D'Arboriculture. et d'Horticulture, Nyon 20(2) : 131-138.
- Da Silva AB.; Pasqual M; Maciel ALR; Moreira MA; Dutra LF (2002). Influência da benzilaminopurina e do benomyl na proliferação *in vitro* de abacaxizeiro. Ciênc. agrotec., 26(6):1190-1196.
- Doležel J and Göhde W (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. Cytometry, 19:103-105.
- Doležel J (1997). Application of flow cytometry for the study of plant genomes. J. Appl. Genet., 38: 285-302.
- Durand-Cresswell R; Boulayl M; Franclet A (1982). Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: Tissue Culture in Forestry. Bonga & Durazan, eds. MartinusNijhoff. The Hague. p. 15-151.
- Euclides RF (1983). Sistema para Análise Estatística e Genética. SAEG, Viçosa, 57p.
- Gavidia I; Pérez-Bermúdez P; Segura J (1996). Micropropagation of bay laurel (*Daphne gnidium* L.). J. Hort. Sci., 71: 997 – 983.
- George EF (1993). Plant propagation by tissue culture: the technology. Edington: Exegetics Limited, vol. 1, 574 p.
- Ghelardini C; Galeotti N; Salvatore G; Mazzanti G (1999). Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. Planta Med, 65: 700 - 703.

- Goldblatt P and Johnson DE (2000). Index to Plant Chromosome Numbers 1996-1997. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 81: i-xi, 1-188.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998). Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. & Buso, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, p. 183-260.
- Guerra MS (1986). Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* Rev Bras Genét 9: 741-743.
- Gupta P K; Timmis R; Carlson WC (1993). Somatic embryogenesis: a possible tool for large scale propagation of forestry species. In: SOH, W. Y.; LIU, J. R.; KOMANINE, A. (Ed.) Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants. Korean Society of Plant Tissue Culture, p. 18-37.
- Hartmann HT; Kester DE; Davies JR; Geneve RL (2002). Plant propagation: principles and practices. 7^a.ed. New Jersey: Prentice-Hall. 880 p.
- Huang S-f Z-f; Zhao Z-Y; Huang X-x (1989). Chromosome counts on one hundred species and infraspecific taxa. Acta Bot Sin 5:161-176.
- Huang SY; Wang Z; Shi X (1988). Plant Chromosome counts (4). Subtrop Forest Sci & Technol 16: 25-30.
- Kubitzki K and Renner S (1982). Lauraceae I (Aniba and Aiouea). Flora neotropica. Monography number 31. The New York Botanical Garden. New York.
- IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio-Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). (1998). Portaria No. 01/98. Brasília, Brazil.

- IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio-Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). (1992) Portaria No. 037/92-N: lista oficial de espécies de flora brasileira ameaçadas de extinção. Brasília, Brazil.
- Inouye S; Takizawa T; Yamaguchi H (2001). Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Major Constituents Against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. *J Antimicrob Chemoth*, 47: 565 – 573.
- IUCN (2004). World Conservation Union. <http://www.redlist.org> – Consultada em janeiro de 2004.
- Lyzak MA ; Dolezelova M ; Horry JP ; et al. (1999). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in Musa. *Theoretical and Applied Genetics*, 98:1344-1350.
- James DJ and Thurbon IJ (1979). Rapid in vitro rooting of the apple rootstock M-9. Ashford. *Journal of Horticultural Science*, 54(4): 309 - 311.
- May PH and Barata LES (2004). Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: Options for sustainable production. *Economic Botany*, 58(2): 257-265.
- McCown BH and Sellmer JC (1987). General media and vessels suitable for woody plant cultures. In: Bonga, J.M., Durzan, D.J. (Eds.), *Tissue culture in forestry - General principles and biotechnology*. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht. Boston, vol. 2, p. 4-6.
- Moreira MA (1993). Efeito do benomyl e ácido indolbutírico na propagação in vitro do porta-enxerto Citrus sunki Hort. ex Tan. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- Moscone E A; Baranyi M; Ebert I; Greilhuber J; Ehrendorfer F; Hunziker AT (2003). Analysis of nuclear DNA content in Capsicum (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. *Annals of Botany* 92 (1): 21-29.

- Murashige T and Skoog F (1962). A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Muratova EN and Sedelnikova TS (2000). Karyotypic variability and abnormalities in populations of conifers from Siberia and the Far East. In.: Guttenberger H; Borzan SE; Hartman TPV (Eds.). *Cytogenetics Studies of Forest Trees and Shrubs : review, present status, and outlook on the future*. Zvolen, Slovakia : Arbora Publishers, p.09-19.
- Ndoye M; Diallo I; Gassama YK (2003). *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree, *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. *African Journal of Biotechnology*, 2(11): 421-424.
- Negash A; Krens F; Schaart J; Visser B (2001). *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 107–111.
- Normah MN; Hamidah S; Ghani FD (1997). Micropropagation of *Citrus halimii*- an endangered species of South-east. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50: 225–227.
- Nunes EC et al. (2002). *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 259-268.
- Panaia M; Senaratna T; Bunn E; Dixon KW; Sivasithamparam K (2000). Micropropagation of the critically endangered Western Australia species, *Symonanthus bancroftii* (F.Muell.) L.Haegi (Solanaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 23-29.
- Pierik RLM (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*, p. 69-82.

- Rasband W (1997). Image SXM 1.61. A public domain software for image analysis, written at the US National Institute of Health, extensions by Steve Barrett and available from the Internet by anonymous ftp from zippy.nimh.nih.gov.
- Rathore TS; Singh RP; Shekhawat NS (1991). Clonal propagation of desert teak (*Tecomella undulata*) through tissue culture. *Plant Sci.*, 79: 217-222.
- Ribas LLF and Zanette F (1992). Propagação da macieira cv. Gala através da cultura de meristemas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 4:(1): 39-43.
- Ribeiro JELS; Hopkins MJG; Vicentini A; Sothers CA; Costa MAS; Brito JM; Souza MAD; Lohrman LG; Assunção PACL; Silva CF; Mesquita M; Rocópio LC (1999). Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. INPA/DFIP. 816p.
- Rosa LS; Sá TODA; Ohashi ST; Barros PLC; Silva AJV (1997). Crescimento e sobrevivência de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) oriundas de três procedências, em função de diferentes níveis de sombreamento, em condições de viveiro. *Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará. B FCAP*, nº 28, p. 37-62.
- Rosa MSS; Mendonça-Filho RR; Bizzo HR; Rodrigues IA; Soares RMA; Souto-Padrón T; Alviano CS; Lopes AHCS (2003). Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 47(6): 1895-1901.
- Salgado SML; Da Cunha RL; Niella GR; Teixeira H; Pasqual M (2001). Efeito da utilização de TDZ e benomyl na micropropagação do Crisântemo (*Dendranthema morifolium*). *Ciênc. agrotec.*, 25(2):274-280.

- Sampaio PTB (1987). Propagação vegetativa do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) pelo método da estaquia. Dissertação de Mestrado. INPA. Manaus. 112p.
- Sampaio PTB et al. (2003). Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) Lauraceae. Manual de Sementes da Amazônia, n.3: p1-6,
- Santana JAS (2000). Distribuição espacial da regeneração natural de *Aniba rosaeodora* (Pau-rosa). Rev. Ciênc. Agrár., Belém, 33: 37 – 48.
- Sancak C (1999). *In Vitro* Micropropagation of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Tr. J. of Botany, 23: 133 – 136.
- Sanchez MC; San-José MC; Ballester A ; Vieitez AM (1996). Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. Tree Physiology, 16(8): 673-680.
- Sandhu PS and Mann SK (1988). SOCGI plant chromosome number reports VIII. J Cytol Genet 24: 179-183.
- Santos EC (2004). Avaliação do óleo essencial produzido em rebrotos de *Aniba rosaeodora* Ducke cultivada na Reserva Florestal Ducke do INPA. 85 p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil.
- Schlarbaum SE (2000). Cytogenetics Studies of Forest Trees: Looking to the Past to Meet Challenges in the Future. In: Guttenberger H et al. Cytogenetics Studies of Forest Trees and Shrubs: Review, Present Status, and Outlook on the Future. Zvolen: Arbora Publishers, p. 9-19.
- Skene KGM (1972). Cytokinins like properties of the systemic fungicide benomyl. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 47(2): 179-182, 1972.

- Simic A; Sokovic MD; Ristic M; Grujic-Jovanovic S; Vukojevic J; Marin PD (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18(9): 713-717.
- Sol and Solo (1987). Enraizamento de estacas e micropropagação de *Eucalyptus*. Campinas, n. 15.
- Spironello WR; Sampaio PTB; Vieira G; Barbosa AP (2003). Reproductive ecology of the pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae) in a Central Amazon terra firme forest. *In: Projeto Jacaranda- fase 2: pesquisas florestais na Amazônia central.* (Ed.). Higushi N; Santos J; Sampaio PTB; Marengo RA; Ferraz J; Sales PC; Saito M; Matsumoto S. Manaus: INPA, 252 p.
- Studart-Guimarães C; Lacorte C; Brasileiro ACM (2003). Transformação genética em espécies florestais. *Ciência Florestal*, Santa Maria, 13(1): 167-178.
- Sudhersan C; AboEl M; Hussain J (2003). Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain plants. *Journal of Arid Environments*, 54: 133 – 147.
- Taji A and Williams R (1996). *Tissue Culture of Australian Plants*. University of New England, Armidale NSW, Australia.
- Thomas TH (1973). Growth regulatory effect of three benzimidazole fungicides on the germination of celery (*Apium graveoleus*) seeds. *Ann. Appl. Biol.*, Wellesbourne Warks, 74(2): 233-238.
- Todua BT (1987). Karyology of laurel species and forms. *Dokl Akad Nauk S.S.S.R., Ser Biol*, 3:445-452.
- Torrell M and Valles J (2001). Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44

(2): 231-238.

Vainstein A; Lewinsohn E; Pichersky E; Weiss D (2001). Floral fragrance. New inroads into an old commodity. *Plant Physiol* 127:1383-1389.

Vanneste JL; Hill RA; Kay SJ; Farrell RL; Holland PT (2002). Biological control of sapstain fungi with natural products and biological control agents: a review of the work carried out in New Zealand. *Mycol Res*, 106: 228–232.

Varty N (1996). Data collection forms for Brazilian Atlantic forest species.

Vaz RL and Nogueiroles J (1981). Micropropagação e influência do tempo de permanência em meio contendo floroglucinol no enraizamento de brotos apicais de pessegueiro e macieira. In: XII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Recife. Anais. Recife: SBF, p.1160-1165.

Vengadesan G; Ganapathi A; Amutha S; Selvaraj N (2002). In vitro propagation of *Acacia* species – a review. *Plant Science*, 163: 663 – 671.

Watt MP; Gauntlett BA; Blakeway -fungal agent cultures of *Eucalyptus grandis* South African Forestry Journal -27, Mar.

Welander M and Snygg O (1987). Effect of applied and endogenous auxin on callus and root formation of *in vitro* shoots of the apple rootstocks M26 and A2. *Annals of Botany*, 59(4): 439-443.

Williams RR; Taji AM; Bolton JA (1985). Specificity and interaction among auxins, light and pH in rooting of Australian woody species *in vitro*. *HortScience*, 20: 1052–1053.

Wu ZM (1995). Cytological studies on some plants of woody flora in Huangshan, Anhui Province. *J Wuhan Bot Res*, 13(2): 107-112.

Wu WS (1996). Development and production of biofungicide. Plant Pathology Bulletin -90

Yui E (1990) Multiplicação *in vitro* de porta- enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.). 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

Zaniolo RS; Zanette F (2002). Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. Scientia Agrária, 2: 1.

Zatkyo JM and Molnar I (1986). Adventitious root formation of different fruit species influenced by the pH of medium. In: Abstracts VI – International Congress Plant Tissue & Cell Culture, Series (p. 29).

Ziv M and Halevy AH (1983). Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. Hort Science, 18: 434-436.

Zoldos V; Pape D; Brown S; Panaud O; Siljak-Yakovlev S (1998). Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. Genome, 41: 162-168.

Suda J; Kyncl T; Freiova R (2003). Nuclear DNA amounts in Macaronesian angiosperms. Annals of Botany 92 (1): 153-164.

