

Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).

Lucia HANDA¹, Paulo de Tarso B. SAMPAIO², Regina Caetano QUISEN³

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estabelecimento *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) livres de contaminações e de oxidação fenólica. As gemas foram obtidas da rebrota de mudas cultivadas em viveiro e os embriões a partir de sementes em diversos estágios de maturação. Para a assepsia dos explantes foram utilizados dois antibiótico (Ampicilina e Agrimicina), etanol (70%) e hipoclorito de sódio, em concentrações e tempo de exposição variando em função do tratamento. Para o controle da oxidação foram utilizados imersão em ácido ascórbico (250 mg/l) e PVP (Polivinilpirrolidona) no meio Murashige & Skoog (MS). O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente ao acaso com tratamentos e repetições em função do tipo de explante. Foi observado 71% de sobrevivência e 53% de germinação de embriões tratados com hipoclorito de sódio (50% e 2% de cloro ativo) por 10 minutos e inoculados em meio MS contendo 20 mg/l de água de côco após 45 dias. As gemas das rebrotas de mudas tratadas com solução de Sulfato de Estreptomicina (Agrimicina) na concentração de 500 mg/l (1h) apresentaram 51% de sobrevivência. Quando submetidas ao pré-tratamento com o emprego de bomba a vácuo (180 mmHg) contendo a Agrimicina (500 mg/l), apresentaram 25% de sobrevivência.

PALAVRAS-CHAVE

Pau-rosa, Cultura de tecidos, Embriões, Rebrota

Culture in vitro of rosewood (Aniba rosaeodora Ducke) embryos' seeds and buds explants.

ABSTRACT

This study deals with the establishment in vitro of Aniba rosaeodora Ducke explants, free from fungal and endogenous contaminations and phenolic oxidation. Bud explants and embryos' seeds from many maturation stages were used in this trial. The explants were disinfected with Ampicilin antibiotic, Streptomycine Sulphate (Agrimicina), etanol (70%), sodium bipoclorite in many concentrations and exposure time according to the type of explant. For the phenolic oxidation control, the immersion on ascorbic acid and PVP (Polyvinilpirrolidone) in culture medium were used. The explants were inoculated in MS medium. The statistical design was the completely randomized and the treatments and repetitions varied according to the type of explant adopted. After 45 days, 100% of survival and 53% of germination in embryos were observed, which had been desinfested by sodium bipoclorite (50%) for 10 minutes and inoculated in MS medium, supplemented with 20 ml of coconut water. Satisfactory results (51% of survival) were observed in bud's explants, which had been treated by immersion in 300 mg.l⁻¹ of Agrimicina and 25% when submitted in 500 mg.l⁻¹ on vacuum pre-treatment.

KEYWORDS

rosewood, Aniba rosaeodora Ducke, tissue culture, embryoculture, buds

¹ Eng^a Florestal, M.Sc., INPA/UA, Manaus, AM, Brasil, lhanda@bol.com.br

² Eng^o Florestal, Dr., Pesquisador INPA/CPST, Manaus, AM, Brasil, sampaio@inpa.gov.br

³ Eng^a Florestal, M.Sc., Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil, rquisen@cpaa.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) é uma espécie de notável valor econômico, devido ao potencial econômico do óleo obtido por destilação das folhas, galhos, madeira e raízes, produto com grande demanda no mercado nacional e internacional devido ao seu uso como fixador na indústria de perfumes.

O corte indiscriminado de todos os indivíduos adultos em idade de reprodução além de causar a erosão genética, impossibilitou a regeneração natural, causando uma drástica redução das populações naturais, fato que levou o IBAMA a incluí-la na lista de espécies ameaçadas de extinção.

Estudos indicam que a propagação do pau-rosa é viável por sementes (Araújo, 1967; Rosa *et al.*, 1993), estacas (Sampaio, 1988) e por mudas de regeneração natural (Alencar & Araújo, 1980; Sampaio *et al.*, 2000). Entretanto, a baixa e irregular produção de sementes aliado a elevada predação por pássaros, insetos e roedores, tem limitando a produção de mudas visando a recomposição das populações naturais e os plantios *ex-situ* (Ohashi *et al.*, 1995). O desenvolvimento de técnicas de reprodução, a exemplo da cultura de tecidos, constitui-se numa alternativa de reprodução de genótipos superiores.

A cultura de tecidos consiste num conjunto de técnicas nas quais um explante é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (Cestari, 1975; Hartman & Kester, 1990; FAO, 1993; Pasqual *et al.*, 1998). Assim, diversas partes da planta como gemas, meristemas apicais, embriões, segmentos de caule, extremidade de raízes e outras, podem ser cultivadas *in vitro* em meio nutritivo apropriado em ambiente asséptico (Grattapaglia & Machado, 1998).

Por estarem alojados em ambiente asséptico dentro da semente, os embriões são considerados fontes de explante que apresentam baixos índices de contaminação (Pierik, 1997; Hu & Ferreira, 1998). Por meio do cultivo *in vitro* pode-se determinar as necessidades nutricionais e fisiológicas dos embriões; superar a dormência em certos tipos de sementes em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma e obter fonte de explantes com tecido de elevada totipotência (Henao, 1991; Pierik, 1997; Hu & Ferreira, 1998).

Alguns fatores são levados em consideração na cultura de embriões, como escolha do meio adequado, utilização dos reguladores de crescimento, a liberação de compostos fenólicos, estágio de desenvolvimento do embrião e condições da planta matriz (Pierik, 1997; Andrade, 1998; Pasqual *et al.*, 1998).

Dependendo do seu crescimento e desenvolvimento, as exigências nutricionais são diferenciadas para promover o crescimento *in vitro* dos embriões (Pasqual & Pinto, 1988; Ribeiro *et al.*, 1997). Embriões imaturos necessitam de 8 a 12% de sacarose, sais minerais e vitaminas (Pasqual & Pinto, 1988; Henao, 1991), enquanto os embriões maduros requerem de 2 a 3% de sacarose, germinam e crescem em meio inorgânico (Hu & Ferreira, 1998; Pierik, 1997). As maiores concentrações de sacarose para embriões imaturos deve-se às características heterotróficas destes, enquanto que os embriões maduros são quase autotróficos (Hu & Ferreira, 1998).

A água de côco pode ser usada como suplementação do meio de cultura, fornecendo açúcares e outros glicídios, aminoácidos e suas amidas, fitormônios e outros metabólitos, como forma de suprir as exigências nutricionais dos embriões, em especial, os imaturos (Henao, 1991; Roca & Mroginski, 1991; Hu & Ferreira, 1998). O uso de reguladores de crescimento associados com a ausência de luz (escuro por 15 dias) e temperatura entre 22 a 28°C aceleram o processo de desenvolvimento dos embriões e evitam a oxidação (Pierik, 1997; Hu & Ferreira, 1998).

Em diversas espécies florestais tem-se obtido resultados que indicam a possibilidade de obtenção, num curto espaço de tempo, de grandes quantidades de novas plantas a partir de um único explante em subcultivos periódicos. A propagação *in vitro* do pau-rosa torna-se uma alternativa para conservação e utilização do potencial econômico desta espécie, por meio da multiplicação de genótipos selecionados, disponibilizando ao produtor mudas para plantios *ex-situ* e enriquecimento de florestas nativas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar técnicas de assepsia de embriões e gemas apicais de mudas de pau-rosa cultivadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os embriões retirados das sementes em diversos estágios de maturação, foram imersos por uma noite em Benomyl (300 mg/l). Na câmara de fluxo laminar, foram imersos em etanol (70%) acrescido de Tween-20 por um minuto e trinta segundos, seguido de hipoclorito de sódio (50%) por 10 minutos, seguidos das três lavagens em água destilada e autoclavada. A seguir foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de Murashige & Skoog (1962), com pH ajustado em 6,2 e adição de 0,5 g/l de antioxidante PVP (Polivinilpirrolidona), 1,8 g/l de fitagel, água de côco (0, 10, 20 ml) e sacarose (0, 5, 10 e 15%) para estimular a germinação. O experimento contou com 12 tratamentos, com 10 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância e comparação de média dos tratamentos pelo teste de Tukey.

Os experimentos foram instalados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no Km 29 da Rodovia AM-010, Manaus, AM.

As gemas axilares e terminais foram obtidas das rebrotas das mudas cultivadas em casa de vegetação da Embrapa Amazônia Ocidental. No período de 180 dias que antecederam a instalação dos experimentos *in vitro*, a cada 15 dias as mudas foram tratadas com fungicida Benlate 500 (metil-1 (butilcarbomil)-2-benzimidazol carbamato) na concentração de 3 g/l. A cada três meses foram realizadas adubações de NPK na proporção de 1:2:1.

No primeiro experimento, o pré-tratamento foi realizado a partir da imersão das gemas em Benomyl (400 mg/l) por 12 horas. Na seqüência, foram imersos em Agrimicina (0, 300, 400 e 500 mg/l), etanol (70%) com Tween-20 por 90 segundos e em hipoclorito de sódio (10%) por 10 minutos e lavadas em

água destilada. Os explantes foram inoculados em meio MS com suplementação de sacarose a 3% e ágar a 0,7%. Este experimento contou com 4 tratamentos e 10 repetições.

No segundo experimento foi combinado Agrimicina com o antibiótico Ampicilina. O pré-tratamento consistiu na imersão por 48 h em Benomyl (400 mg/l). Em seguida, o material recebeu tratamento com bomba a vácuo em solução combinada entre Agrimicina (0,300, 500 mg/l) e Ampicilina (0, 300, 500 mg/l). Posteriormente, os explantes passaram pelo processo normal de desinfestação, com etanol (70%) com Tween-20 por 90 segundos e hipoclorito de sódio (20% e 2% de cloro ativo) por 10 minutos. O meio adotado foi o MS com suplementação de sacarose a 3% e ágar a 0,7%. Foram testados 7 tratamentos com 10 repetições.

Os dados foram submetidos a análise de variância e comparação de médias dos tratamentos pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise de variância revelou que existem diferenças significativas entre os tratamentos para a porcentagem de germinação dos embriões e sobrevivência (Tabela 1). Observa-se que o tratamento 3, não apresentou contaminação fúngica e bacteriana, resultando na maior porcentagem de sobrevivência (100%) dos embriões inoculados após 45 dias. Os tratamentos 4, 6, 7 e 10 apesar da contaminação por fungos (19 a 58%) e bactérias (0 a 3%) apresentaram as maiores porcentagens de germinação dos embriões (34 a 53%). A germinação de embriões assépticos *in vitro* se constitui um fato promissor para propagação desta espécie. Considerando que a assepsia e o manuseio das sementes durante a retirada dos embriões podem ser otimizados, a contaminação fúngica e bacteriana poderá ser reduzida, aumentando a probabilidade da propagação *in vitro* do pau-rosa.

O controle da oxidação em explantes cultivados *in vitro* é de fundamental importância para o sucesso da cultura. As diferenças significativas entre as médias de porcentagem de oxidação (5% Tukey), revelam que os tratamentos 4 e 12 foram mais eficientes para reduzir a oxidação dos embriões pela menor liberação de fenóis no momento da inoculação (Tabela 1). Deve-se considerar que o alto teor de substâncias fenólicas liberadas pelos embriões de pau-rosa, pode estar associado com a habilidade técnica e o tempo no isolamento de embriões no momento da excisão. Estudos revelam que a oxidação fenólica foi limitante no estabelecimento da cultura de embriões imaturos de manga (*Mangifera indica*), recomendando-se a troca constante de meio de cultura e o uso de antioxidantes (Rodriguez, 1989). Outros estudos indicam que a manutenção das culturas no escuro por 7 a 15 dias reduz a oxidação fenólica de embriões e endosperma de andiroba (*Carapa guianensis*) (Amaral *et al.*, 1997).

Após 45 dias, foi observado que existem diferenças significativas entre as médias de porcentagem de germinação dos embriões de pau-rosa (Teste de Duncan). O tratamento 4, com 5% de sacarose, apresentou 53% de germinação. Foi observado primórdios foliares e a formação de radícula em explantes dos tratamentos 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, evidenciando que as concentrações de sacarose e água de côco favoreceram o estabelecimento e desenvolvimentos dos embriões de pau-rosa (Tabela 1).

Foram testados diferentes tipos de assepsia dos embriões de pau-rosa neste estudo. Embriões de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) submetidos à temperatura de 40°C por 30 minutos e assepsia com hipoclorito de sódio por 30 minutos apresentaram 95% de embriões assépticos (Souza *et al.*, 1997). Embriões de *Cedrela odorata*, apresentaram 100% de germinação com assepsia em hipoclorito de sódio (2%) e adição de 1% de

Tabela 1 - Médias da porcentagem de oxidação, sobrevivência e germinação dos embriões de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) após 45 dias.

Tratamento	Sacarose (%)	Água de côco (mg/l)	Contaminação (%)		Oxidação (%)	Sobrevivência (%)	Germinação (%)
			Fungo	Bactéria			
1	0	0	28	0	2 abc	72 abc	8 c
2	0	10	10	0	3 abc	90 ab	9 c
3	0	20	0	0	4 abc	100 a	25 bc
4	5	0	19	3	0 c	71 abc	53 a
5	5	10	30	4	1 bc	70 abc	25 bc
6	5	20	20	0	7 a	80 ab	48 ab
7	10	0	58	3	1 bc	42 bc	42 ab
8	10	10	38	3	6 ab	62 abc	18 bc
9	10	20	69	5	1 bc	31 bc	18 bc
10	15	0	19	0	2 abc	81 ab	34 ab
11	15	10	59	6	4 abc	41 bc	19 bc
12	15	20	89	7	0 c	11 c	10 c

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

sacarose em meio de cultura (Gomes *et al.* 1997). Embriões imaturos de *Coffea* sp., a utilização de 0,5% de bicloreto de mercúrio proporcionou 100% de embriões assépticos (Andrade, 1998).

Gemas apicais da rebrota de mudas cultivadas na casa de vegetação quando cultivadas *in vitro* apresentaram elevadas contaminações fúngicas e por bactérias endógenas (Tabela 2). A menor porcentagem de contaminação foi obtida pelo tratamento 2, com 33% de contaminação fúngica e 29% de contaminação bacteriana mediante a imersão por 1 hora em solução contendo Agrimicina a 300 mg/l, evidenciando a eficácia parcial do Sulfato de Estreptomicina para o estabelecimento *in vitro* dos explantes (Tabela 2). Observa-se que o uso de maiores concentrações de agrimicina (400 e 500 mg/l) reduziu de maneira significativa a contaminação por bactérias. Entretanto, é necessário novos testes envolvendo maiores concentrações de antibiótico e tempos de exposição (Tabela 2).

A aplicação quinzenal de fungicidas nas mudas na casa de vegetação e a coleta dos explantes das brotações mais recentes contribuíram para diminuir a incidência de bactérias endógenas em explantes cultivados *in vitro*. Estudos indicam que o material proveniente de mudas mantidas na casa de vegetação são ideais para o cultivo *in vitro*, por serem menos propensas a contaminações (Wiechetch, 1990). Neste estudo, a dificuldade da esterilização dos brotos apicais e axilares tem sido uma barreira para cultura *in vitro* do pau-rosa.

O uso de antibióticos, como a Rifampicina, em meio de cultura visando controlar a contaminação por bactérias endógenas foi utilizado em gemas laterais de mamoeiro (Cornélio & Haridasan, 1995). Resultados similares em *Canella sassafras* foram observados por Wang *et al.* (1991).

Na Tabela 3, observa-se o efeito da combinação dos tratamentos com Agrimicina e Ampicilina visando o controle da contaminação por fungos e bactérias dos explantes da rebrota das mudas, mediante o emprego de vácuo na desinfestação dos explantes. As menores porcentagens de contaminação fúngica (40%) foram obtidas nos tratamentos 3 e 5, pela combinação de Agrimicina e Ampicilina, ambas na concentração de 300 mg/l, embora não tenha diferido estatisticamente de 2, 4, 6 e 7. A maior porcentagem de sobrevivência foi observada no tratamento 5.

Neste estudo não foi possível a identificação das bactérias endógenas desta espécie, o que dificultou o uso de um antibiótico específico para a eliminação das bactérias. A combinação de Agrimicina e Ampicilina e as possíveis falhas na assepsia devido à elevada contaminação por fungos, contribuíram para a baixa porcentagem de sobrevivência *in vitro* dos explantes da rebrota de mudas de pau-rosa (Tabela 3).

Tabela 2 - Efeito da concentração de Agrimicina na desinfestação de rebrota de pau-rosa cultivadas *in vitro*.

Tratamentos	Agrimicina (mg/l)	Tempo (minutos)	Contaminação (%)		Oxidação (%)	Sobrevivência (%)
			Fungo	Bactéria		
1	0	60	80 a	87 a	6 a	0 a
2	300	60	33 b	29 b	3 a	48 c
3	400	60	76 a	44 b	2 a	13 ab
4	500	60	44 ab	26 b	2 a	51 c

* Nas colunas, as médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Efeito da concentração de Agrimicina e Ampicilina na desinfestação de rebrota de pau-rosa.

Tratamentos	Agrimicina (mg/l)	Ampicilina (mg/l)	Contaminação (%)		Oxidação (%)	Sobrevivência (%)
			Fungo	Bactéria		
1	0	0	100 a	50 a	80 a	0 a
2	300	0	56 ab	50 a	68 a	11 ab
3	300	300	40 b	50 a	73 a	18 b
4	300	500	59 ab	20 a	73 a	12 ab
5	500	0	40 b	30 a	82 a	25 b
6	500	300	47 ab	40 a	74 a	9 ab
7	500	500	50 ab	50 a	78 a	8 ab

* Nas colunas, as médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey

A toxidez de mais de vinte tipos de antibióticos foi examinada em culturas de protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*, verificando que a ação dos antibióticos a base de Ampicilina, Estreptomicina, Rifampicina, possuem amplo espectro de ação (Pollock *et al.* 1983).

A utilização de antibióticos é necessária no controle da contaminação por bactérias endógenas presentes nos explantes de pau-rosa. A utilização do vácuo no processo de desinfestação, permite o aumento da dilatação dos poros do explante e auxilia na penetração da solução (Pasqual *et al.*, 1998). Entretanto, os resultados indicam que a média de sobrevivência do material inoculado a vácuo ainda é baixa (Tabela 3), quando comparada ao processo tradicional de desinfestação (Tabela 2).

No entanto, quando comparado com a utilização de ápices e segmentos nodais, o ápice proveniente de rebrota, oferece melhores condições de isolamento para a organogênese direta *in vitro*.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1) As rebrotas tratadas com Sulfato de Estreptomicina (Agrimicina) na concentração de 300 mg/l indicaram 33% de contaminação fúngica e 29% de contaminação bacteriana, com 48% de sobrevivência.

2) A menor incidência por bactérias endógenas em explantes de rebrota das mudas está associada à época de

coleta e ao tipo de explante empregado e diminuiu, à medida que, brotações mais recentes foram utilizadas.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alencar, J. da C.; Araújo, V. C. de. 1980. Comportamento de espécies florestais amazônicas quanto à luminosidade. *Acta amazonica*, Manaus: INPA. 10(8): 435-444.
- Amaral, S. A.; Silva, A. T. A.; Mota, M. G. C.; Vieira, I. M. S. 1997. Uso de tratamentos como antioxidantes de explantes (embrião, endosperma) de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). In: *Seminário de Iniciação Científica da FCAP, 7.; Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, 1. Resumos*. Belém: FCAP p. 122-124.
- Andrade, L. M. C. O. 1998. *Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o caféiro*. Lavras: UFLA. 86p. Dissertação de mestrado.
- Araújo, V. C. de. 1967. *Sobre a germinação de Aniba* (Lauraceae). *I. A. duckei Kostermans* (Pau-rosa itaúba). Botânica. Manaus: Inpa, 23. 21 pp.
- Cestari, A. N. 1975. Cultura de tecidos. *Ciência e cultura*, 27(10):1056-1069.
- Cornélio, I. N.; Haridasan, P. 1995. Desinfestação de gemas laterais de mamoeiro (*Carica papaya* L.) provenientes de vários locais do Distrito Federal. In: *V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Resumos*. Lavras: UFLA. p. 136.
- FAO. 1993. *Ex situ* storage of seeds, pollen and *in vitro* cultures of perennial woody plant species. v.113. 83 pp.
- Gomes, A. P. do R.; Lameira, O. A.; Lopes, S. da C.; Menezes, I. C.; Leão, N. V. M. 1997. Germinação de embriões de cedro (*Cedrela odorata*) submetidos a diferentes concentrações de sacarose em relação a luminosidade. In: *Seminário de Iniciação Científica da FCAP, 7.; Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, 1. Resumos*. Belém: FCAP. p.275-276.
- Grattapaglia, D.; Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CNPQ. p.100-161.
- Hartman, H. T.; Kester, D. E.; Davies JR, F. T. D. 1990. *Plant propagation: principles and practices*. Prentice-Hall/Englewood Cliffs, New Jersey. 5 ed. p. 459-521.
- Henao, L. M. M. 1991. *Cultivo de tejidos vegetales*. Medellín: Universidad Nacional de Colômbia. 77p.
- Hu, C. Y.; Ferreira, A. G. 1998. Cultura de embriões. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Embrapa/CNPQ. p.371-393.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Ohashi, S. T.; Rosa, L. S.; Santana, J. A. 1995. *Diagnóstico Florestal do Pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke) no Brasil*. Funatura/ITTO.
- Pasqual, M.; Pinto, J. E. B. P. 1988. Cultura de embriões. *Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*, Brasília, v.9. p. 2-12.
- Pasqual, M.; Ramos, J. D.; Hoffman, A.; Carvalho, G. R. 1998. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – meios de cultura*. Lavras: UFLA/FAEPE. 127 p.il.
- Pasqual, M.; Hoffmann, A.; Ramos, J. D. 1998. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos*. Lavras: UFLA/FAEPE. 159 p.il.
- Pierik, R. L. M. 1997. *In vitro Culture of Higher Plants*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 348 p.
- Pollock, K.; Barfield, D. G.; Shields, R. 1983. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant cell reports*, 2: 36-39.
- Ribeiro, V. G. R.; Paqual, M.; Ramos, J. D.; Júnior, A. F. O.; Carvalho, G. R. 1997. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranjeira-pêra. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília: 32(11): 1147-1152.
- Roca, W. M.; Mroginski, L. A. 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicaciones*. Cali: CIAT. 970 p.
- Rodriguez, A. P. M. 1989. *Viabilidade do uso de diferentes explantes e variedades de manga (Mangifera indica L.) em cultura de tecido*. Piracicaba: ESALQ. 100pp. (Dissertação de mestrado)
- Rosa, L. S.; Ohashi, S. T.; Santana, J. A. S.; Oliveira, F. A. 1993. Estágio atual de conhecimento sobre a formação de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). In: *1º Congresso Florestal Brasileiro. Anais*. Curitiba: SBS-SBEF. p. 761.
- Sampaio, P. T. B. 1988. *Propagação vegetativa do pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke) pelo método da estaquia*. Manaus: INPA. 112pp. Dissertação de mestrado.
- Sampaio, P. T. B.; Vieira, G.; Gomes, L. A.; Leite, A.; Quisen, R. 2000. Regeneração natural com propágulos para produção de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em viveiro. In: *Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas* (6: 2000: Porto Seguro, BA). Rio de Janeiro: Instituto Ambiental Biosfera. p. 177.
- Souza, K. S. de; Nunes, H. da C. B.; Silva, S. P. G. da; Vieira, I. M. S.; Mota, M. G. da C. 1997. Produção *in vitro* de plântulas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). In: *Seminário de Iniciação Científica da FCAP, 7.; Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, 1. Resumos*. Belém: FCAP. p.371-373.
- Wang, P. J.; Hu, C. Y.; Chen, M. H. 1991. In: Bajaj, Y. P. S. 1991. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin: Springer-Verlag. p. 180-190.
- Wiecheteck, M. S. S. 1990. *Micropropagação de Eucalyptus viminalis Labill. a partir de material juvenil*. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 92 pp. Dissertação de mestrado.

**RECEBIDO EM 04/10/2002
ACEITO EM 29/12/2004**

