

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE CAMU-CAMUZEIRO (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh)¹

Henriqueta da Conceição Brito NUNES²
Milton Guilherme da Costa MOTA³
Tatiani Yuriko Pinheiro KIKUCHI⁴
Irenice Maria dos Santos VIEIRA⁵
Sydney Itauran RIBEIRO⁶

RESUMO: O sucesso da aplicação das técnicas de cultura de tecidos é dependente do estabelecimento prévio da cultura que se quer estudar *in vitro*. Para a produção de plântulas assépticas, um dos principais problemas é o alto índice de contaminação de explantes obtidos diretamente de plantas de campo. Este trabalho objetivou avaliar a percentagem de germinação de sementes de camu-camuzeiro, em dois experimentos de germinação *in vitro*, visando a obtenção de plântulas assépticas. No primeiro experimento foram utilizadas cinco concentrações diferentes de ácido giberélico (AG₃) combinadas a cinco tipos de explantes obtidos a partir de sementes maduras de camu-camuzeiro, em um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x5. No segundo experimento, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3x4, utilizando ausência e presença de carvão ativado a 3g.L⁻¹, sementes em três estádios de maturação e quatro concentrações de AG₃ (0; 1; 2 e 4mg.L⁻¹). Os explantes foram inoculados em meio MS com pH 5,8, contendo 20g.L⁻¹ de sacarose e 2g.L⁻¹ de phytigel. A incubação foi feita em uma sala com fotoperíodo de 16h/luz/dia e temperatura de 25° ± 2°C, e a característica avaliada foi a percentagem de germinação. Nos dois experimentos, o número de explantes germinados foi baixo e independente do estádio de maturação, da presença de AG₃ e de carvão ativado no meio de cultura.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Germinação, Camu-camu, AG₃, Cultura de Tecidos.

GERMINATION *IN VITRO* OF CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh)

ABSTRACT: The success of tissue culture techniques is sometimes dependent on the previous establishment of the culture to be studied *in vitro*. The main problem for the production of aseptic

¹ Aprovado para publicação em 26.12.2002

² Engenheira Agrônoma, M.Sc., Professora Substituta da UEPA/CCNT. e-mail: quetanunes@bol.com.br

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do Departamento de Biologia Vegetal e Fitossanidade da FCAP. e-mail: mota@amazon.com.br

⁴ Engenheira Agrônoma, Bolsista do PIBIC/CNPq. e-mail: tatyuri@ig.com.br

⁵ Engenheira Agrônoma, Dra., Professora do Departamento de Química e Tecnologia da FCAP e Assessora Técnica da Diretoria da FCAP. e-mail: irenice@fcap.br ou mwi@amazon.com.br

⁶ Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. e-mail: sydney@cpatu.embrapa.br

plantlets is the high contamination of index explants obtained directly from the field. This research had the objective to evaluate the germination percentage of explants of camu-camu from two *in vitro* germination experiments in order to obtain aseptic plantlets. In the first experiment, a complete randomized experimental design in a 5x5 factorial scheme, with five concentrations of gibberilic acid (GA₃) applied to five kinds of explants from ripe seeds of camu-camu, was used. In the second experiment, a complete randomized experimental design in 2x3x4 factorial scheme, with presence or absence of activated coal at 3g.L⁻¹, seeds in three ripening phases and four concentrations of GA₃ (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0mg.L⁻¹, was used. The explants were inoculated in MS medium with pH of 5,8 containing 20g.L⁻¹ of sucrose and 2g.L⁻¹ of phytagel. The incubation was in a room with photoperiod of 16 H/light/day and temperature of 25° ± 2°C. The number of germinated explants was low independent of the ripening phase, the presence of GA₃ and of activated coal in the culture medium.

INDEX TERMS: GA₃, Tissue Culture.

1 INTRODUÇÃO

Considerando que o camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) é uma espécie selvagem, cujo processo de domesticação está no início (RIVA RUÍZ, 1994; CLEMENT; MÜLLER; CHAVEZ FLORES, 1982; MOTA; SILVA; BASTOS, 1997; SILVA et al., 1998; RIBEIRO et al., 2000), há necessidade de se desenvolverem programas de melhoramento, de forma a dispor de cultivares capazes de responder com eficiência a processos de cultivo. Para que as respostas de seleção sejam mais rápidas é importante contar com métodos de propagação assexuada que permitam a fixação de genótipos superiores (NORTH, 1979; PAIVA; VALOIS, 2001).

A micropropagação surge como método alternativo para uso na fixação de genótipos superiores em programas de melhoramento (MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994; FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998). Entretanto, para que os protocolos de micropropagação em camu-camuzeiro sejam desenvolvidos é fundamental que se disponha de plantas assépticas, visto que os explantes provenientes de plantas de campo, como:

segmentos apicais, axilares, foliares e de hipocotilo apresentam problemas de contaminação e oxidação.

A germinação de sementes e embriões *in vitro* tem sido usada em várias espécies de plantas, para a obtenção de explantes assépticos a serem utilizados em diversos estudos de propagação *in vitro* (ARELLO; PINTO, 1993; PASQUAL; BARROS, 1991 e 1992; NUNES; MOTA, 1993; PINTO et al., 1994; VERÁSTEGUI PEÑA; ESTRADA JIMÉNEZ; ROCA, 2001).

Em muitas espécies não domesticadas, a germinação encontra-se limitada a fatores intrínsecos e extrínsecos às sementes, e mesmo que sejam fornecidas condições favoráveis para que elas germinem, fatores inerentes como: a impermeabilidade do tegumento, presença de substâncias inibidoras, imaturidade e abortamento do embrião podem inibir a germinação (SANTOS, 1998). Segundo Pasqual e Pinto (1988), o carvão ativado pode absorver substâncias inibidoras do meio de cultura ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, promovendo o crescimento de embriões. A participação de reguladores de crescimento, destacando-se as giberelinas

que regulam vários processos fisiológicos, incluindo a germinação e a mobilização de reservas armazenadas no endosperma, pode melhorar a performance de várias espécies na fase de germinação, principalmente sob condições adversas (TAIZ; ZEIGER, 1998; BEVILAQUA et al., 1998), existindo várias informações sobre os efeitos do ácido giberélico (AG_3) em embriões extraídos de sementes dormentes que não germinaram mesmo sob condições ideais (PASQUAL; RIBEIRO; RAMOS, 1990).

O tempo e a percentagem de germinação de sementes de camu-camuzeiro *in vivo* têm apresentado respostas variadas. Riva Ruíz (1994) observou que a germinação tem início no 12º dia, obtendo-se até 90% de germinação durante os primeiros 50 dias, enquanto que Pinedo (1989) verificou que em sementes não escarificadas a germinação inicia após 34 dias de cultivo, atingindo cerca de 55% de germinação no 69º dia. Carvalho, Nascimento e Müller, (1998) observaram que 93% das sementes de camu-camuzeiro germinaram a partir do 16º dia, entretanto, Kikuchi et al. (1998), avaliando 12 populações de camu-camuzeiro proveniente do Rio Xingu, observaram que, em média, a germinação teve início no 36º dia, e a percentagem de germinação variou de 59,13% a 98,07%.

O trabalho objetivou avaliar a percentagem de germinação de sementes de camu-camuzeiro, em dois experimentos de germinação *in vitro*, visando a obtenção de plântulas assépticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram instalados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da

Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, utilizando-se sementes de camu-camuzeiro do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

Experimento 1:

Foram testadas diferentes concentrações de ácido giberélico - AG_3 (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0mg.L⁻¹), associadas a diferentes tipos de explantes de sementes maduras de camu-camuzeiro, como mostra a Figura 1: E₁- Sementes inteiras sem tegumento; E₂- Sementes inteiras sem tegumento com corte no lado oposto ao embrião; E₃- Sementes sem tegumento com 50% do endosperma e o embrião; E₄- Sementes sem tegumento com 25% do endosperma e o embrião e E₅- embrião. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5, com duas repetições/tratamento, e cada repetição constando de cinco tubos com uma semente cada, totalizando 250 tubos.

O tratamento de assepsia das sementes sem tegumento foi feito com imersão em solução de detergente líquido (1:3) por quinze minutos, seguida de imersão em NaOCl a 1% por trinta minutos. Após a assepsia, sob câmara de fluxo laminar, as sementes foram excisadas em diferentes tipos de explantes, e inoculadas isoladamente em tubos de ensaio (25x150mm), contendo cada tubo 10mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 20g.L⁻¹ de sacarose, 2g.L⁻¹ de phytagel e as cinco diferentes combinações de AG_3 , sendo o pH do meio ajustado para 5,8. Após a inoculação, os tubos foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16h/luz/dia e temperatura de 25° ± 2°C.

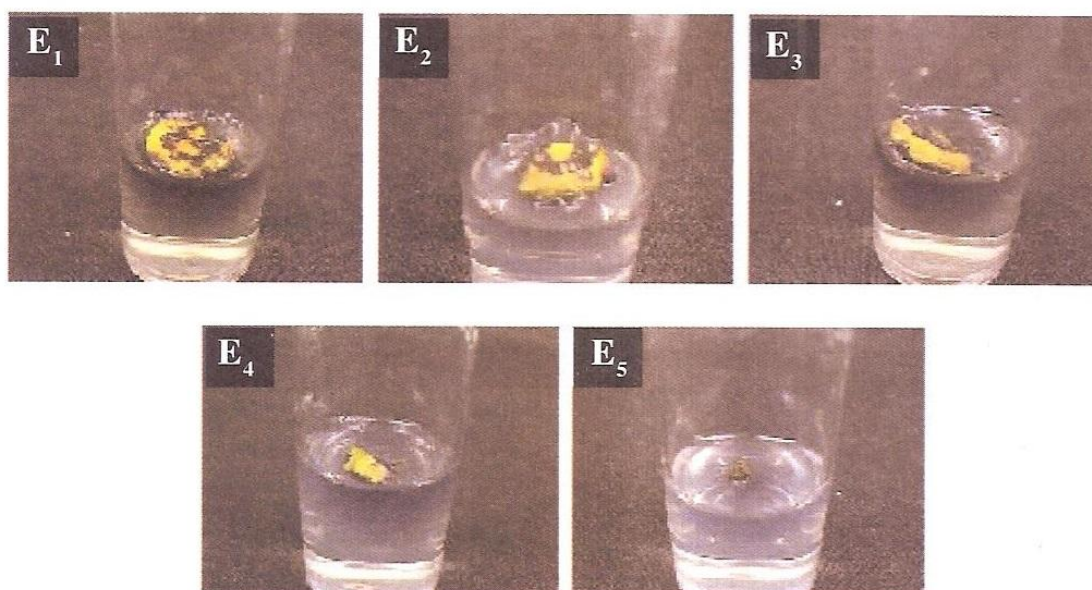


Figura 1 – Diferentes tipos de explantes de sementes maduras de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) utilizados (E_1 : sementes inteiras sem tegumento; E_2 : sementes inteiras sem tegumento com corte no lado oposto ao embrião; E_3 : sementes sem tegumento com 50% do endosperma e o embrião; E_4 : sementes sem tegumento com 25% do endosperma e o embrião e E_5 : embrião). FCAP, Belém (PA), 2000.

As avaliações foram feitas diariamente até o início da germinação, e após 60 dias de cultivo *in vitro*, sobre a percentagem de germinação a partir da emissão da radícula. Para análise da variância os dados foram transformados para arc sen. $\sqrt{\frac{x}{100} + 0,05}$

Experimento 2:

O experimento foi instalado sob um delineamento experimental inteiramente

casualizado, em esquema fatorial $2 \times 3 \times 4$ com quatro repetições (frasco), utilizando-se cinco sementes/frasco, totalizando 20 sementes/tratamento, com frutos de camu-camuzeiro em três estádios de maturação diferentes (verdes, semimaduros e maduros - Figura 2), quatro concentrações de ácido giberélico - AG_3 (0; 1; 2 e 4 mg.L^{-1}) e na ausência e presença de carvão ativado.



Figura 2 – Frutos de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh.) em diferentes estádios de maturação (A: frutos verdes; B: frutos semi-maduros e C: frutos maduros), utilizados no experimento de germinação *in vitro*. FCAP, Belém-PA, 2000.

Os frutos foram lavados, despulpados e feita a retirada do tegumento da semente em água corrente. Sob câmara de fluxo laminar, as sementes sem tegumento receberam o seguinte tratamento de assepsia antes da inoculação: imersão em uma solução de detergente líquido (1:3) por quinze minutos, seguida de três lavagens com água destilada autoclavada. Após as lavagens, as sementes foram imersas em uma solução de NaOCl a 2% por trinta minutos, e lavadas cinco vezes com água autoclavada, para retirar o excesso do produto.

Ainda sob câmara de fluxo laminar, as sementes foram excisadas no lado oposto ao embrião e inoculadas em frascos de vidro contendo 50mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 20g.L⁻¹ de sacarose, 2g.L⁻¹ de phytigel e os tratamentos de carvão ativado 3g.L⁻¹ e as quatro concentrações de AG₃, sendo o pH do meio ajustado para 5,8. Após a inoculação, os tubos foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25° ± 2°C, fotoperíodo de 16h/luz/dia.

As avaliações foram feitas diariamente até o início da germinação, e após 60 dias de cultivo *in vitro*, sobre a percentagem de germinação, a partir da emissão da radícula. Para a análise de variância os dados foram

transformados para $\text{arc sen } \sqrt{\frac{x}{100} + 0,05}$,

utilizando número de repetições diferentes, conforme Steel e Torrie (1960).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença estatística significativa ao nível de 1% de probabilidade entre os tipos de explantes de

sementes e entre os fatores (interação), para o primeiro experimento (Tabela 1). Os tipos de explantes: sementes inteiras sem tegumento (E₁), sementes inteiras sem tegumento com corte no lado oposto ao embrião (E₂) e sementes sem tegumento com 50% do endosperma e o embrião (E₃), não diferiram estatisticamente entre si e foram superiores aos demais tipos de explantes para percentagem de germinação (Tabela 2).

Souza et al. (1999), utilizando três tipos de explantes de semente de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), observaram que o melhor explante para produção *in vitro* de plântulas assépticas foi sementes com 25% do endosperma + embrião, o que não foi observado neste ensaio, onde este tipo de explante resultou em 4% de germinação (Tabela 2).

A aplicação de AG₃ não influenciou a germinação *in vitro* de sementes de camu-camuzeiro, o que não foi observado por Bevilaqua et al. (1998), que verificaram que o AG₃ afeta o metabolismo de sementes de cenoura, (*Daucus carota*) aumentando a percentagem de germinação e velocidade de emergência das plântulas *in vivo*.

A baixa percentagem média de germinação *in vitro* obtida neste experimento (Tabela 2), quando comparada às altas percentagens de germinação conseguidas em experimentos realizados sob condições naturais (RIVA RUÍZ, 1994; CARVALHO; NASCIMENTO; MÜLLER, 1998; KIKUCHI et al., 1998), demonstra que algum fator do meio de cultura (pH, sacarose, e outros) deve ter inibido a germinação das sementes de camu-camuzeiro.

Tabela 1 – Resultados da análise da variância para percentagem de germinação de sementes de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), dados transformados para arc sen, $\sqrt{\frac{x}{100} + 0,05}$ germinadas após 60 dias de cultivo *in vitro*. FCAP, Belém-PA, 2000.

Causas de variação	Gl	Quadrado médio
Tratamentos	24	0,0761ns
AG ₃ (A)	4	0,0146ns
Explante (E)	4	0,3173**
A x E	16	0,0312**
Resíduo	25	0,0105
CV (%)		23,0021
DMS		0,1348

ns: não-significativo

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo Teste F.

Tabela 2 – Valores médios para percentagem de germinação em diferentes tipos de explantes de sementes maduras de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), em relação a concentração de AG₃, após 60 dias de cultivo *in vitro* (dados não transformados). FCAP, Belém-PA, 2000.

Tipo de explante	Concentração de AG ₃ (mg.L ⁻¹)					Médias Tipos de explantes
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0	
E ₁	10 b	20a	20 b	40a	20a	22a
E ₂	50a	10a	50a	20ab	20a	30a
E ₃	20ab	30a	20 b	30ab	20a	24a
E ₄	0 b	0a	0 c	10ab	10a	4 b
E ₅	0 b	0a	0 c	0 b	0a	0 b
Médias de AG₃ (%)	16A	12A	18A	20A	14A	16

Nota: a) Médias para tipo de explante com a mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 1%.

b) Médias para concentrações de AG₃ com a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey.

A germinação *in vitro* teve início ao 13º dia de cultivo (Figura 3), o que está de acordo com Riva Ruíz (1994), que observou que a germinação *in vivo* de sementes de camu-camuzeiro tem início no 12º dia. Entretanto, ao 60º dia de cultivo *in vitro*, a porcentagem de germinação era baixa (16%) em relação ao número de explantes inoculados, que em comparação aos trabalhos de germinação *in vivo* de Carvalho, 1998; Kikuchi et al., 1998; Riva Ruíz, 1994, onde a porcentagem de germinação foi em torno de 90%, comprova a existência de algum fator limitante no meio utilizado que provocou a morte das sementes.

No segundo ensaio, verificou-se que houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as concentrações de AG_3 (Tabela 3), e que a concentração de $0,0mg.L^{-1}$ de AG_3 (testemunha), ou seja, ausência do regulador de crescimento, apresentou a maior porcentagem de germinação *in vitro*, diferindo estatisticamente das demais (Figura 4). Os resultados encontrados na literatura sobre o efeito do AG_3 na germinação são variáveis, pois, segundo Maestri e Vieira (1961), as giberelinas aceleram a germinação e emergência de sementes de várias espécies, mas sobre outras espécies não tem o mesmo efeito.

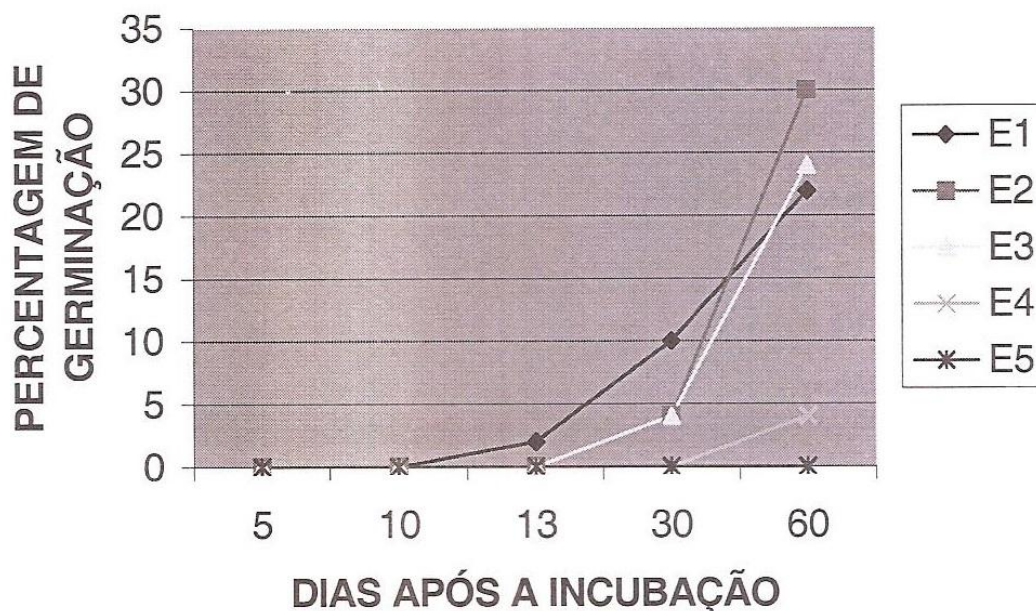


Figura 3 – Valores médios para porcentagem de germinação em diferentes tipos de explantes (E₁: sementes inteiras sem tegumento; E₂: sementes inteiras sem tegumento com corte no lado oposto ao embrião; E₃: sementes sem tegumento com 50% do endosperma e o embrião; E₄: sementes sem tegumento com 25% do endosperma e o embrião e E₅: embrião) de sementes maduras de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh.), por diferentes períodos de incubação *in vitro* (dados não-transformados). FCAP, Belém-PA, 2000.

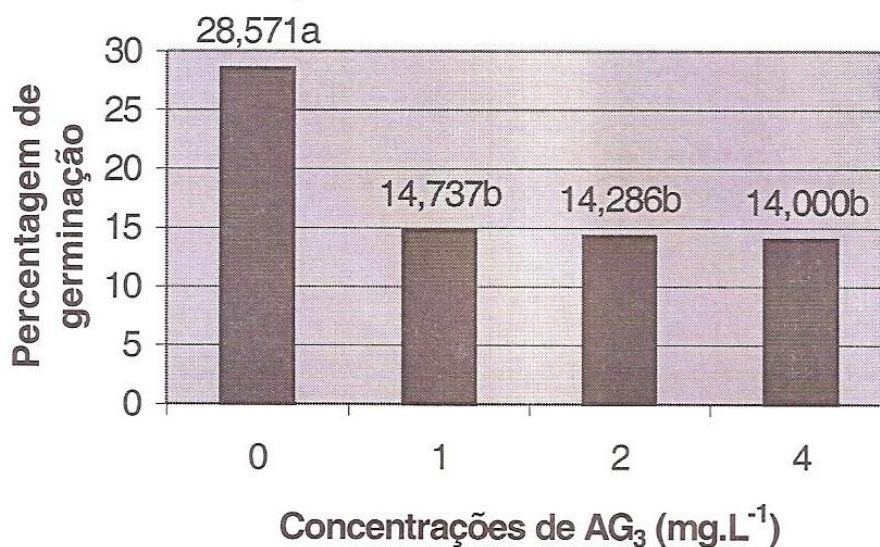
Tabela 3 – Resultados da análise de variância para percentagem de germinação de sementes excisadas de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), após 60 dias de cultivo *in vitro*, dados transformados para arc sen. FCAP, Belém-PA, 2001.

$$\sqrt{\frac{x}{100} + 0,05}$$

Causas de variação	Gl	Quadrado médio
Tratamentos	23	0,0435ns
Carvão (A)	1	0,0293ns
Estádio (B)	2	0,0178ns
AG ₃ (C)	3	0,1626*
AxB	2	0,0144ns
AxC	3	0,0164ns
BxC	6	0,0432ns
AxBxC	6	0,0116ns
Resíduo	57	0,0490
CV (%)	–	47,0333
DMS	–	3,7430

ns: não-significativo

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste F.



Médias seguidas da mesma letra para concentrações de AG₃ não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Figura 4 – Valores médios para percentagem de germinação de sementes excisadas de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh.) em relação à concentração de AG₃, após 60 dias de cultivo *in vitro* (dados não-transformados). FCAP, Belém-PA, 2001.

Houve uma tendência de redução na percentagem de germinação com o aumento das concentrações de AG_3 , indicando que o AG_3 teve um efeito inibidor na germinação de sementes de camu-camuzeiro. Este resultado corrobora com Maestri e Vieira (1961) que observaram que com o aumento da concentração de AG_3 ocorre uma diminuição na percentagem de germinação de sementes de café, (*Coffea arabica*), onde, provavelmente, o AG_3 causou toxidez às sementes, ocasionando a morte ou inibindo a germinação *in vivo*.

Resultado semelhante foi encontrado por Takaki, Dietrick e Furtado (1979), em que sementes tratadas com AG_3 tiveram uma redução na percentagem de germinação em decorrência do aumento da atividade de algumas enzimas (celulase e outras), que atuaram degradando material da parede celular. Enquanto que Carvalho et al. (1998) observaram que o AG_3 influenciou na emergência de folhas, mas diminuiu a emergência de raízes em embriões de café, à medida que à concentração de AG_3 aumentava. Os resultados observados confirmam os obtidos no Experimento 1, de que, para a germinação *in vitro* de sementes de camu-camuzeiro, não há necessidade de aplicação de AG_3 .

Como o estágio de maturação da semente e a aplicação de carvão ativado a $3g.L^{-1}$ não afetaram significativamente a germinação, além do AG_3 outros fatores do meio de cultura podem ter dificultado a germinação, como o pH e a sacarose. Gomes (1999) observou que a utilização de concentrações superiores a $15g.L^{-1}$ de sacarose reduziu a germinação de sementes de moreira (*Bagassa guianensis*), o que pode ter ocorrido neste trabalho, visto que

foi utilizada uma concentração de $20g.L^{-1}$ de sacarose. Segundo George (1996), esta inibição é decorrente da regulação osmótica do meio de cultura, visto que concentrações elevadas de sacarose retiram água do meio disponível para a embebição das sementes, impossibilitando a germinação.

As respostas obtidas para a germinação de camu-camuzeiro sob condições *in vitro* podem estar relacionadas aos diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos que estão envolvidos no processo. Segundo Mantell, Matthews e McKee (1994), células em fase inicial de desenvolvimento, como os tecidos embrionários estão num estado definido como indeterminado. Estas células são capazes de mudar para diferentes vias metabólicas de desenvolvimento, dependendo das condições a que são submetidas, como temperatura, meios nutritivos e reguladores de crescimento, pois elas podem exibir um alto grau de plasticidade em sua resposta a estímulos fisiológicos e ambientais. Além disso, vale ressaltar que o AG_3 é um regulador de crescimento termolábil, ou seja, que é degradado pelo calor durante o processo de autoclavagem (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Foi observado, também, em algumas sementes de camu-camuzeiro germinadas *in vitro*, o fenômeno de poliembrião (Figura 5), que, segundo Pasqual, Ribeiro e Ramos (1990), dificulta a identidade de embriões zigóticos e o melhoramento das espécies cítricas, mas este fato em sementes de camu-camuzeiro pode ser importante para a obtenção de um maior número de explantes, visto que a percentagem de germinação *in vitro* foi baixa.



Figura 5 – Fenômeno de poliembrião em sementes de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) germinadas *in vitro*. FCAP, Belém (PA), 2001.

4 CONCLUSÃO

A germinação *in vitro* de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh.) pode ser conseguida utilizando-se sementes inteiras sem tegumento, sementes inteiras sem tegumento com corte no lado oposto ao embrião e sementes sem tegumento com 50% do endosperma e o embrião que, apesar de baixa (16 e 17,9%), é possível e independente do estágio de maturação dos frutos, da presença de AG₃ e de carvão ativado no meio de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. B. P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.28, n.1, p.25-31, jan. 1993.

BEVILAQUA, G. A. P. et al. Efeito do tratamento de sementes de cenoura com reguladores de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.33, n.8, p.1271-1280, ago. 1998.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPB:CBAB, 1998. v.1, p.87-132.

CARVALHO, G. R. et al. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. acaiaí. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.33, n.6, p.847-851, jun. 1998.

CARVALHO, J. E. U. de; NASCIMENTO, W. M. O. do; MÜLLER, C. H. *Características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1998. 18p. (Boletim de Pesquisa, 203).

CLEMENT, C.; MÜLLER, C. H.; CHÁVEZ FLORES, W. B. Recursos genéticos de espécies frutíferas nativas da Amazônia Brasileira. *Acta Amazônica*, Manaus, v.2, n.4, p.677-695, 1982.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPB:CBAB, 1998. v.1, p.21-43.

- GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture*. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1574p.
- GOMES, G. A. C. Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*). 1999. 92p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- KIKUCHI, T. Y. P. et al. Velocidade e percentagem de germinação de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*) de diferentes populações. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP, 8., 1998, Belém. *Resumos...* Belém: FCAP:EMBRAPA, 1998. p.166.
- MAESTRI, M.; VIEIRA, C. Nota sobre a redução da percentagem de germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L. var. Bourbon), por efeito do ácido giberélico. *Revista Ceres*, Viçosa, v.11, p. 247-249, 1961.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. *Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas*. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344p.
- MOTA, M. G. da C.; SILVA, J. F. da; BASTOS, T. X. Levantamento da ocorrência de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) na Amazônia e coleta de germoplasma no Alto Solimões (Amazonas - Brasil). In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1997, Campinas. *Programa e resumos*. Campinas: IAC:Embrapa-CENARGEN, 1997. p. 69.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- NORTH, C. *Plant breeding and genetics in horticulture*. London: MacMillan, 1979. 149p.
- NUNES, H. da C. B.; MOTA, M. G. da C. Indução de calo em explante de pimenta-do-reino. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO MPEG, 1.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP, 3., 1993, Belém. *Resumos...* Belém: MPEG:FCAP, 1993. p.45.
- PAIVA, J. R. de; VALOIS, A. C. C. Espécies selvagens e sua utilização no melhoramento. In: NASS, L. et al. *Recursos genéticos e melhoramento de plantas*. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p.79-99.
- PASQUAL, M.; BARROS, I. de. Efeito de Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na proliferação e alongação de brotações micropropagadas em *Coffea arabica* L. "in vitro". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.26, n.2, p.201-204, fev. 1991.
- ; —————. Efeito do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (MART.) Coville). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.27, n.7, p.1017-1019, jul. 1992.
- ; PINTO, J. E. B. P. Cultura de embriões. *ABCTP Notícias*, n.9, p.2-12, 1988.
- ; RIBEIRO, V. G.; RAMOS J. D. Influência do GA₃ e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja 'natal'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.25, n.10, p.1477-1482, out. 1990.
- PINEDO, M. *Evaluación preliminar de la germinación de 28 frutales tropicales*. Lima: INIA, 1989. 39p. (Informe Técnico, 13).
- PINTO, J. E. B. P., et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v.29, n.6, p.867-873, jun. 1994.
- RIBEIRO, S. I et al. *Avaliação de acessos de camu-camuzeiro em terra firme*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 4p. (Comunicado Técnico, 17).
- RIVA RUIZ, R. *Cultivo del camu camu en Pucallpa*. Pucallpa: INIA, 1994. Não paginado
- SANTOS, M. R. A. dos. *Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em Smilax japecanga Grisebach*. 1998. 81p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

SILVA, J. F. da et al. *Caracterização e avaliação de germoplasma de camu-camuzeiro (Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh)*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1998. 4p. (Pesquisa em Andamento, 190).

SOUZA, K. S. da et al. Produção *in vitro* de plântulas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FCAP, 9.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 3., 1999, Belém. *Resumos...* Belém: FCAP:EMBRAPA, 1999. p.371-373.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. *Principles and procedures of statistics*. New York: McGraw-Hill, 1960. 481p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. 2 ed. Sunderland: Sinauer, 1998. 792p.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S. M. C.; FURTADO, J. S. Anatomical changes in the hard endosperm of gibberellic acid treated coffee seeds during germination. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.2, p.103-106, 1979.

VERÁSTEGUI PEÑA, M.; ESTRADA JIMÉNEZ, R.; ROCA, W. Embriogénesis somática en "camu-camu", *Myrciaria dubia* H.B.K. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. *Resumos...* Goiânia: REDBIO, 2001. p. 102.