



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA - MBT

UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS

SUELEN CRISTINA DE SOUSA LIMA

Propagação Vegetativa do *Protium* spp: *Protium heptaphyllum*, *Protium spruceanum* e *Protium guacayanum*

MANAUS
2012

SUELEN CRISTINA DE SOUSA LIMA

Propagação Vegetativa do *Protium* spp: *Protium heptaphyllum*, *Protium spruceanum* e *Protium guacayanum*

Dissertação apresentada à Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio
Co-orientadora: Dra. Regina Caetano Quisen

MANAUS
2012

DEDICATÓRIA

A Deus. Aos meus pais Silvia e Raiamar pelo exemplo de vida. Aos meus irmãos Ederson e Marcelo pela ternura. Para minha tia avó Alba Ribeiro pela transferência de conhecimentos adquiridos ao longo de sua vida. A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram e me inspiram a continuar este casamento com a ciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a concretização desta importante etapa em minha vida.

A toda minha família, por terem me apoiado e incentivado nesta jornada acadêmica.

Ao meu namorado Carlos Roberto da Silva, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão e companheirismo em todas as etapas deste trabalho.

A Universidade do Estado do Amazonas, mas precisamente à Escola Superior de Ciências da Saúde – ESA, por fornecer todo o suporte docente e administrativo para a minha formação.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Ocidental, pelo suporte institucional e disponibilidade da infraestrutura para a realização dos experimentos.

Ao CNPQ pela bolsa que viabilizou parte dos estudos.

Ao orientador Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio pela orientação e apoio.

A minha querida Co-orientadora Dra. Regina Caetano Quisen por todos os ensinamentos passados, pelos laços de amizade formado ao longo do trabalho, conselhos profissionais dados, atenção e confiança dedicados ao longo do trabalho.

Aos amigos de Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Marcelle Larissa, Marcelo Raizer e Tatiane Tavares pela troca de experiência e conhecimento, pelos momentos de descontração vividos nas longas horas de trabalho e pelo apoio dado nos momentos mais difíceis.

As amigas de longa data Ticiane Martins e Mellyna Amorin, Cinthya Queiroz, Perla Pimentel e Ydrielle Telles pelo apoio, carinho e torcida.

Ao casal de amigos Jheyne e Marcelo Roseo pelo incentivo, força e conselhos para não desistir nos momentos mais difíceis.

A mais nova amiga Pamela Harada pela grande ajuda nos momentos finais da escrita da dissertação.

A funcionária do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa, Rosimar Fernandes pela dedicação e disposição na transmissão do conhecimento.

A todos que contribuíram direta e indiretamente em minha jornada acadêmica.

Deixo aqui meu muito obrigado!

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade.”

Julio Verne

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: a) <i>Protium Heptaphyllum</i> na forma adulta; b) Folhas; c) e d) Sementes.....	4
Figura 2: a) <i>Protium spruceanum</i> na forma adulta; b)Folhas; c) Sementes ; d) Madeira.....	10

CAPÍTULOS

Figura 1: Porcentagem de contaminação e oxidação de explantes foliares de breu branco submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação: T1 - Cercobin® e Agrimicina® a 0,2%, T2 - PPM® a 2%, T3 - PPM® a 1%, T4 - PPM® modificado a 1%, T5 - PPM® modificado a 2% e T6 - Cercobin® e Agrimicina® a 5%. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	40
Figura 2: Porcentagem de sobrevivência e oxidação de explantes foliares de breu branco. T1: PPM® 2%, T2: PPM® modificado 1%, T3: PPM® modificado 2% e T4: Cercobin® e Agrimicina® 5%. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	42
Figura 3: Porcentagem de contaminação e oxidação de explantes foliares de breu branco: T1: controle, T2: PPM® modificado a 1%. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	43
Figura 4: Explantes foliares de Breu branco em meio de cultura acrescido de SNP e óleo de Alecrim pimenta: a) Tratamento controle b) Tratamento com SNP, c) Tratamento com 0,6 µL ⁻¹ óleo de alecrim pimenta e d) Tratamento com 0,6 µL ⁻¹ óleo de alecrim pimenta + SNP.....	46
Figura 5: Porcentagem de oxidação e contaminação de explantes foliares de <i>Protium spruceanum</i> (breu) submetidos a diferentes tratamentos para indução da calogênese. T1: 2,26 µM de 2,4-D; T2: 4,53 µM de 2,4-D; T3: 2,26 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP; T4: 4,53 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP; T5: 2,68 µM de ANA; T6: 5,37 µM de ANA; T7: 2,68 µM de ANA + 2,22 µM de BAP; T8: 5,37 µM de ANA + 2,22 µM de BAP. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	59
Figura 6: Porcentagem de oxidação e contaminação de epicótilo de <i>Protium spruceanum</i> (breu) submetidos a diferentes tratamentos: T1: 2,26 µM de 2,4-D; T2: 4,53 µM de 2,4-D; T3: 2,26 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP; T4: 4,53 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP; T5: 2,68 µM de ANA; T6: 5,37 µM de ANA; T7: 2,68 µM de ANA + 2,22 µM de BAP; T8: 5,37 µM de ANA + 2,22 µM de BAP. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	60
Figura 7: Porcentagem de calogênese em segmentos de epicótilo de <i>Protium spruceanum</i> (breu) T1: 2,26 µM de 2,4-D; T2: 4,53 µM de 2,4-D; T3: 2,26 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP; T4: 4,53 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP; T5: 2,68 µM de ANA; T6: 5,37 µM de ANA; T7: 2,68 µM de ANA + 2,22 µM de BAP; T8: 5,37 µM de ANA + 2,22 µM de BAP. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....	61
Figura 8: Formação de calos em epicótilo de breu. a) Calos formados no tratamento T1: 2,26 µM de 2,4-D (a: 0,7x); b) massa calosa gerada no T3: 2,26 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP (b: 0,7x); c) calos formados no T4 4,53 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP (Fotos com objetiva: 0,7x).....	62
Figura 3: Instalação do experimento de breu manga (<i>Protium guacayanum</i>) em casa de vegetação. a) Corte e preparo das estacas; b) Tratamento em solução de AIB; c) Distribuição das estacas nos substratos.	
Figura 9: a) Estacas de breu manga nos diferentes substratos; b) Aspecto das estacas enraizadas em substrato areia/vermiculita na ausência de AIB ; c) Aspectos das estacas enraizadas no substrato Vivatto® com 200 mg L ⁻¹ de AIB; d) Aspecto das estacas no substrato Bioplant®	72
Figura 10: a) Estacas de breu manga nos diferentes substratos; b) Aspecto das estacas enraizadas em substrato areia/vermiculita na ausência de AIB ; c) Aspectos das estacas enraizadas no substrato Vivatto® com 200 mg L ⁻¹ de AIB; d) Aspecto das estacas no substrato Bioplant®	76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Descrição botânica de três espécies de <i>Protium</i>	4
2.1.1 <i>Protium heptaphyllum</i> March – Breu Branco.....	4
2.1.2 <i>Protium spruceanum</i> Benth - Breu.....	9
2.1.3 <i>Protium guacayanum</i> Cuatrec	11
2.2 PRODUÇÃO DE MUDAS DE ESPÉCIES FLORESTAIS VIA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA.....	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 1	32
RESUMO	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 Testes de Assepsia com explantes foliares	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4. CONCLUSÃO	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPÍTULO 2	50
RESUMO	50
ABSTRACT	50
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Testes de assepsia de sementes de breu	54
2.2 Testes de indução a calogênese em segmentos de folhas	55
2.3 Testes de indução a calogênese em segmentos de epicótilo.....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 Testes de assepsia de sementes de breu	58
3.2 Testes de indução a calogênese em segmentos de folhas	58
3.3 Testes de indução a calogênese em segmento de epicótilo.....	60
4. CONCLUSÕES.....	63

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CAPÍTULO 3	68
RESUMO	68
ABSTRACT	69
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4. CONCLUSÕES.....	78
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

As florestas da região amazônica de terra-firme apresentam alta diversidade de espécies arbóreas (RANKIN-DE-MERONA et al., 1992; OLIVEIRA, 2000), sendo parte delas de grande valor comercial (CLAY et al., 1999). Há muito tempo a Amazônia vem despertando interesse tanto nacional como internacional e grande parte desse interesse se deve não apenas a sua extensão territorial mais sim ao crescente desflorestamento da região nos últimos anos (LAURANCE et al., 2001).

Uma forma de minimizar os impactos causados pelo desmatamento de forma predatória é a utilização de técnicas mais apuradas para a propagação das espécies amazônicas, já que a mesma ocorre de forma rústica sem qualquer sistematização. Com a crescente procura e valorização de matérias primas da região para a indústria de medicamentos, cosméticos e madeira, a obtenção da matéria prima ainda ocorre de forma predatória, causando grande prejuízo ao patrimônio genético por meio da intensa exploração das espécies mais valorizadas economicamente (CLEMENT e HIGUCHI, 2006). Esse uso indiscriminado e a intensa exploração ocasiona uma pressão nas populações naturais de diversas espécies florestais nativas, chegando mesmo em muitos casos a comprometer a existência de algumas delas, antes mesmo que se conheça características de cultivo, o que dificulta a elaboração de planos de conservação e manejo destas espécies.

Considerando essa premissa, o desenvolvimento de técnicas apropriadas para a produção de mudas das espécies nativas, representa um importante fator ecológico, social, econômico e silvicultural, especialmente para aquelas espécies que apresentam sazonalidade na produção sementes, baixa viabilidade germinativa e dormência de sementes.

A silvicultura é o processo de formação de uma floresta por meio de métodos naturais e artificiais, que compreende desde a seleção da árvore superior, multiplicação vegetativa, avaliação de árvores selecionadas, produção de mudas, estabelecimento e condução do plantio até a colheita florestal. Em termos gerais, as características da silvicultura clonal são justificadas por: uniformidade dos plantios, aproveitamento de combinações genéticas raras, maximização do ganho em produtividade silvicultural e de qualidade tecnológica da madeira em uma única geração de seleção, bem como a

possibilidade de contornar problemas de doenças e opções de técnicas de propagação vegetativa em desenvolvimento nas diversas áreas da ciência (XAVIER et al., 2009). Fachinello (2005) considera a propagação vegetativa como uma das alternativas para perpetuar o uso de espécies de forma controlada.

A propagação vegetativa foi definida como o processo pelo qual a muda é produzida a partir de métodos de enxertia, mergulhia, estaquia e propagação *in vitro* de células e tecidos somáticos. A escolha do método varia de acordo com o objetivo, a espécie envolvida, a época do ano, a habilidade do executor, o tipo e a quantidade de matéria disponível, assim como as condições ambientais, a disponibilidade de recursos físicos, financeiros e humanos como entre outros (WENDLING et al., 2002).

A propagação vegetativa vem sendo utilizada para multiplicação de espécies florestais de forma a uniformizar o plantio e manter as características genéticas de plantas superiores. Uma das espécies que vem se destacando ultimamente por apresentar um grande potencial econômico é o breu pertencente ao gênero *Protium* da família Buseraceae, caracterizado por exsudar resinas, que se encontram armazenados em ductos ou cavidades. Quase sempre têm traços de látex branco em seus ramos, como dispersos em formas de gotículas em talhos feitos na casca (SIANI et al., 2004).

A planta é utilizada pela população para os mais variados fins, sendo valorizada economicamente em alguns setores. É usado na calafetagem de embarcações (LE COINTE, 1939). A resina é bastante utilizada para a fabricação de cosméticos (BANDEIRA et al., 2003), de produtos de higiene (REVILLA, 2001). Suas folhas são aromáticas e quando queimadas exalam um cheiro muito característico sendo utilizado como incenso (LE COINTE, 1939). Segundo Bandeira et al.(2003), a resina é bastante utilizada pela população como repelente de insetos. De acordo com Revilla (2002a), na medicina a planta possui várias indicações terapêuticas populares: dor de cabeça, anti-diarréico, inflamações em geral, infecções dos olhos. Ainda não existem plantios com a espécie, a produção é totalmente extrativista (REVILLA, 2002a). Atualmente se comercializa o breu, a casca e folhas (REVILLA, 2002b).

Em razão da valorização destas espécies e a sua inclusão no setor produtivo de óleos essenciais e produtos derivados, torna-se fundamental a geração de informações relativas à sua silvicultura e crescimento, principalmente aquelas referentes às técnicas de produção de mudas de qualidade para o cultivo atendendo assim sua produção de maneira rápida, de forma econômica e sustentável.

Neste contexto, o presente estudo objetivou desenvolver tecnologias para propagação vegetativa do *Protium* sp, utilizando diferentes métodos de clonagem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descrição botânica de três espécies de *Protium*

2.1.1 *Protium heptaphyllum* March – Breu Branco

Descrição botânica

Árvore grande, com até 20 m de altura. Casca cinzenta, pouco espessa (CORRÊA, 1984). Folhas alternas imparipinadas (SILVA et al., 1977), 2-3 jugas ou raras vezes 4 jugas; folíolos oblongos, inteiros, glabros, de até 10 cm de comprimento e 5 cm de largura (CORRÊA, 1984); inflorescência axilar, glomerulada, bastante ramificada, com brácteas e bractéolas; estames exsertos, filetes de 1,5mm de comprimento com antera oblonga de 1,0 mm (LOUREIRO et al., 1977); flores verde-amareladas e pequenas; fruto drupa vermelha, ovóide, contendo polpa resinosa e amarela envolvendo uma semente, raras vezes mais, até quatro (CORRÊA, 1984).



Fonte: Lorenzi, 1992
Figura 1: a) *Protium Heptaphyllum* na forma adulta; b) Folhas; c) e d) Sementes.

Distribuição

De acordo com Daly (2012) ocorre nas regiões: Norte, nos estados de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas e Acre; Nordeste, no Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Alagoas e Sergipe; Centro-Oeste, no Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul; e Sudeste, em Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo.

Aspectos ecológicos

Ocorre em regiões de clima tropical úmido com precipitação entre 1800 a 3500 mm, temperatura de 17 a 30°C e umidade relativa entre 70 a 90%, em solos arenosos e arenoargilosos com abundante matéria orgânica (REVILLA, 2001). Susunaga (1996) menciona que ocorre em floresta de terra-firme espalhada ao longo de rios.

Estudo em uma reserva biológica, no Amazonas, o pico de floração ocorreu de agosto a outubro, o pico de frutos maduros de dezembro a março, e o pico de mudança foliar de abril a julho (ALENCAR, 1990). De acordo com Lorenzi (1992) a floração ocorre durante os meses de agosto e setembro e a maturação dos frutos entre novembro a dezembro.

A planta produz anualmente uma grande quantidade de sementes viáveis, amplamente disseminadas por pássaros de várias espécies, que aproveitam o arilo que envolve as sementes (GUARIM NETO, 1991). Tucanos pequenos (*Ramphastus* sp.) e araçaris (*Pteroglossus* sp.) da família Ramphastidae (MACEDO, 1977), são exemplos de dispersores.

O *Protium heptaphyllum* produz uma resina, cuja produção é estimulada pela larva de um inseto da família Curculionidae, que permanece na árvore até o estado adulto. A maior produção ocorre durante o período de chuvas (SUSUNAGA, 1996).

Cultivo e manejo

A propagação da espécie pode ser através de sementes (REVILLA, 2001), sendo que para obtenção destes propágulos, os frutos devem ser colhidos diretamente da árvore quando iniciarem a abertura espontânea (LORENZI, 2002). As sementes devem ser colocadas para germinar logo que colhidas, em canteiros ou diretamente em recipientes individuais contendo substrato organo-arenoso com irrigação diária. A emergência ocorre em 15-25 dias, com uma taxa de germinação geralmente baixa. O desenvolvimento das plantas no campo é moderado (LORENZI, 1992).

Coleta

A resina (breu) é coletada do tronco e do chão de maneira manual, durante o ano inteiro, mas principalmente no verão. São feitos pequenos cortes no tronco para provocar a produção do breu e acúmulo no tronco. Após a coleta deve ser colocado para secar à sombra e depois em sacos de fibra ou de juta (REVILLA, 2001).

Utilização

A árvore apresenta qualidade ornamental, sendo utilizada principalmente na fabricação de diversos produtos, onde a resina extraída apresenta alto valor para a medicina, além dos frutos serem apreciados como alimento por alguns índios da América Central e norte da América do Sul. A resina exsudada em grande quantidade por esta espécie tem cor branco-avermelhada (CORRÊA, 1984) sendo conhecida por almécega-do-brasil, goma-limão, devido ao seu aroma (SUSUNAGA, 1996) ou breu branco (BANDEIRA et al., 2002).

Calafetagem

Das incisões feitas à casca da árvore exsuda um líquido balsâmico, com cheiro de funcho, que ao secar, se coalha numa massa de consistência mole de um branco ligeiramente amarelo. É empregado na calafetagem de embarcações, misturando-se a calor do fogo, com azeite ou com sebo (LE COINTE, 1939).

Cosméticos

A resina é bastante utilizada para a fabricação de cosméticos (BANDEIRA et al., 2003), de produtos de higiene e de perfumaria (REVILLA, 2001).

Essência

As folhas desta espécie são fortemente aromáticas (SILVA et al., 1977), por isso são empregadas na fabricação de pó aromático e sachês (REVILLA, 2001). Em algumas cidades de sua região de ocorrência é comum o uso da resina em substituição ao incenso, em atos religiosos da igreja católica (LORENZI e MATOS, 2002).

Insetífugo

A resina é bastante utilizada pela população como repelente de insetos (BANDEIRA et al., 2003), tais como “carapanãs”, moscas e mosquitos (REVILLA, 2002a). O óleo essencial demonstrou ter efeito anti-alimentar para larvas de *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho do milho). O óleo extraído apresentou um bom índice de fagoinibição (80%) para as larvas (SILVA et al., 2002).

Medicinal

A planta possui várias indicações terapêuticas populares: dor de cabeça, enfermidades venéreas, esquistossomose, sonífera, antidiarréico, contra úlcera gangrenosa, inflamações em geral, enteralgia, afecções dos olhos, hérnia, cefaléia (REVILLA, 2002a).

A resina extraída do caule é empregada de muitas formas na farmácia (ARBELAEZ, 1975). É utilizada como anti-tumoral, cicatrizante, em feridas, fraturas (SUSUNAGA, 1996), para bronquite, tosse, coqueluche, inflamações, dor de cabeça, antisséptico local, como estimulante (MAIA et al., 2001) e para tratar doenças venéreas (REVILLA, 2002b). Os povos Kubeos, da Amazônia, utilizam a resina para desobstruir as vias respiratórias quando estão muito resfriados (SCHULTES & RAFFAUF, 1990). Estudos farmacológicos recentes com o óleo da resina comprovaram sua eficácia terapêutica, demonstrando atividades anti-inflamatória, anticonceptiva e antineoplásica (SIANI et al., 1999b; BANDEIRA et al., 2002).

Ao se comparar resultados de trabalhos recentes sobre analgesia, concluiu-se que a resina de *P. heptaphyllum* mostrou uma potente atividade analgésica (SUSUNAGA, 1996).

A casca é hemostática, cicatrizante, anti-inflamatória; útil no tratamento de úlceras gangrenosas (LORENZI e MATOS, 2002). Da casca do caule é preparado um xarope para o tratamento de tosses, bronquites e coqueluches (GUARIM NETO, 1987). A casca é usada em banhos para acalmar a dor de cabeça (CORREA e BERNAL, 1990).

As folhas são muito reputadas contra as úlceras gangrenosas e as inflamações em geral (CORRÊA, 1984); são também hemostáticas (LORENZI e MATOS, 2002), cicatrizantes (SUSUNAGA, 1996).

Outros

A espécie pode ser utilizada para o repovoamento vegetal em áreas degradadas, principalmente ao longo de rios e córregos (LORENZI, 1992). A resina é usada para defumação e iluminação de casas (SUSUNAGA, 1996), considerada de uso mágico para defumação quando está trovejando (AMOROZO & GÉLY, 1988). A resina é usada pelos índios Waiwai na iluminação de suas malocas (RIBEIRO, 1988).

Produção de óleo essencial e metabólitos secundários

A resina do *P. heptaphyllum* apresenta alto percentual de constituintes voláteis e um grande número de terpenóides existentes na sua composição (BANDEIRA et al., 2003). A resina de almécega possui um alto conteúdo de amirina (40,98%), sendo classificada como “elemi”. Quando seca possui alto rendimento de óleo essencial (2,5%), que tem como principais componentes os monoterpenos, α -terpinoleno (24,25%), limoneno (20,12%) e dilapiol (8,05%) (SUSUNAGA, 1996).

Os óleos essenciais presentes nas folhas, frutos e resina analisados por BANDEIRA et al. (2001) utilizando cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa revelou como principal componente identificado nas folhas os monoterpenos e sesquiterpenos, tais como mirceno (18,6%) e β -cariofileno (18,5%); nos óleos da resina, os componentes identificados foram monoterpenos como α -pireno (10,5%), limoneno (16,9%), α -felandreno (16,7%), e terpinoleno (28,5%); e o óleo do fruto, α -pireno (71,2%).

SIANI et al. (1999a) verificou que a composição dos óleos essenciais desta espécie de *Protium* varia de acordo com a idade, sendo a resina fresca rico em α -terpeno (18%), ρ -cymeno (36%), γ -terpeno (12%), e de uma resina mais antiga composta por ρ -cimeno (11%), terpinoleno ρ -cymeno-8-ol (11%), e dilapiol (16%).

As sementes contêm cerca de 40% de um óleo fluido e incolor (FERRÃO, 2001).

Informações adicionais

Em relação à madeira é branco-avermelhada, com cerne mais escuro, compacta, uniforme, ondeada e acetinada (CORRÊA, 1984). É moderadamente pesada (densidade 0,77 g/cm³), compacta, dura, revessa, porém dócil ao cepilho, bastante elástica, de

grande durabilidade quando em lugares secos. São consideradas próprias para a construção civil, obras internas, assoalhos, serviços de torno, carpintaria e marcenaria (LORENZI, 1992). A madeira é usada por índios para fabricar canoas (RIBEIRO, 1988).

Ainda não existem plantios com a espécie; a produção é totalmente extrativista (REVILLA, 2002a). Atualmente se comercializa o breu, a casca e folhas. O maior consumo é a varejo nos mercados locais e em menor escala no atacado para as empresas produtoras de repelentes e fitoterápicos (REVILLA, 2001).

2.1.2 *Protium spruceanum* Benth - Breu

Descrição botânica

Planta resinosa e aromática, de 8-14m de altura, dotada de copa arredondada densa. Tronco ereto e cilíndrico, com casca rugosa e fina, de 25-40 cm de diâmetro. Folhas compostas pinadas, alternas, com eixo comum de 10-20 cm de comprimento (LORENZI, 1998). Sementes pequenas, com coloração verde a verde escura, com uma mancha branca quando fresca, tornando-se verde claro e a mancha de cor creme quando seca. A germinação da semente é retardada pelo endocarpo duro, com poucas germinando a partir de três semanas e se estendendo por vários meses. (CORRÊA, 1926).

Distribuição

Ocorre nas seguintes regiões Norte (Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal) e Sudeste (São Paulo) (DALY, 1987).

Utilidade

A madeira é indicada para construção civil, como caibros, ripas, forros, marcos de portas e janelas para marcenaria leve. A árvore possui qualidades ornamentais que a recomendam para arborização paisagística, sendo também recomendada para a composição de reflorestamentos heterogêneos destinados à recuperação de vegetação de áreas ciliares degradadas (LORENZZI, 1998).

Na fitoterapia, a espécie é utilizada para tratar doenças de várias origens, mas suas propriedades terapêuticas ainda carecem de comprovação científica, apesar da sua larga utilização na medicina tradicional como anti-inflamatório, no tratamento das dores reumáticas e musculares, das infecções das vias respiratórias e picadas de insetos (FERRAZ e COSTA, 2004).

A resina do *P. spruceanum* é industrialmente utilizada para a fabricação de verniz, velas e repelentes de insetos. Seu óleo essencial é largamente empregado na indústria cosmética e de perfumes, na fabricação de sabonetes e aromatizantes de ambiente, seus produtos são comercializados em vários países (FERRAZ e COSTA, 2004).



Figura 2: a) *Protium spruceanum* na forma adulta; b) Folhas; c) Sementes ; d) Madeira.
Fonte: Lorenzi, 1998.

Cultivo e manejo

Segundo Lorenzi (1998), os frutos devem ser colhidos da árvore assim que se iniciarem a abertura e em seguida secos à sombra até a liberação das sementes. As sementes devem ser colocadas para germinação em canteiros semi-sombreados contendo substrato organo-argiloso.

2.1.3 *Protium guacayanum* Cuatrec

De acordo com Brands (1989), a taxonomia da espécie se classifica da seguinte maneira:

Reino: Plantae

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Sapindales

Família: Burseraceae

Gênero: *Protium*

Epíteto específico: *guacayanum* - Cuatrec.

Nome botânico: *Protium guacayanum* Cuatrec

Árvore de pequeno porte, possui fruto vermelho podendo a polpa da sementes ser comestível, sendo considerada uma planta aromática.

Segundo Daly (2012), a espécie é de origem nativa, tendo sua distribuição geográfica na região Norte (Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal) e Sudeste (São Paulo).

Esta é uma espécie rara na região amazônica, e são inexistentes estudos e citações mais detalhadas sobre os aspectos botânicos, ecológicos e de cultivo da mesma.

2.2 PRODUÇÃO DE MUDAS DE ESPÉCIES FLORESTAIS VIA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

Sementes de algumas espécies florestais apresentam atraso na germinação e desuniformidade de plântulas durante o processo de produção de mudas. Além de fatores da própria espécie, existem também fatores ambientais que dificultam a germinação de sementes, tais como luz, temperatura, umidade, água, nutrientes, fauna e a presença de microrganismo (FOWLER e BIANCHETTI, 2000). Aliada a estas questões, a procura por semente de espécies florestais acaba não sendo suficiente para atender a demanda, evidenciando assim a necessidade de se desenvolverem novos métodos para a propagação. Apesar da importância do gênero *protium* pouco se conhece sobre a produção de mudas e desenvolvimento de métodos para a propagação da espécie.

Segundo Fachinello et al. (2005) a propagação assexuada é largamente utilizada na produção de mudas. Isso se deve à necessidade de garantir a manutenção das características varietais, que determinam o valor agrônomo do material a ser propagado, no entanto, fatores ambientais, tipo de solo e ataque de enfermidades podem modificar a morfologia da planta, flores e frutos produzidos (HARTMANN et al., 2002).

A propagação vegetativa apresenta como principal vantagem a possibilidade de ganhos genéticos maiores do que na reprodução via semente (GRAÇA et al., 1990). Os plantios de mudas produzidas via propagação vegetativa apresentam grande uniformidade, quando as condições de solo e clima são semelhantes as da origem do material genético, possibilitando maiores produtividades e uniformidade de crescimento, além de uma série de características desejáveis, como resistência a pragas e doenças, melhor aproveitamento de recursos hídricos e nutricionais do solo (ELDRIGE et al., 1994). Segundo Yamazoe e Vilas Boas (2003), outra vantagem da propagação é a rapidez na produção de uma nova muda, reprodução com as mesmas características da planta-mãe, multiplicar indivíduos que não florescem por falta de adaptação, além de permitir multiplicar indivíduos estéreis.

A propagação vegetativa apresenta como desvantagem, plantas com menor longevidade, sistema radicular às vezes menos desenvolvido, originar plantas apresentando mutações de gemas, entretanto essas desvantagens não constituem obstáculos reais, pois a menor longevidade pode ser compensada pelo maior número de área, proporcionando maior volume de produção e produtividade (DIAS et al., 2005).

Segundo Kramer e Kozlowski (1972), o uso da propagação vegetativa, antes restrito a horticultura, jardinocultura e fruticultura, vem assumindo progressivamente um papel cada vez mais importante na silvicultura. Este interesse pela propagação vegetativa na área florestal está relacionado principalmente com a produção de árvores para plantações, de tipo e qualidade superiores.

De acordo com Ohba (1993) e Zsuffa et al. (1993), historicamente a silvicultura clonal foi estabelecida há muitos anos para a *Cryptomeria japonica* no Japão, sendo conhecida e aceita para as espécies *Populus* spp e *Salix* spp. nas zonas temperadas e várias outras espécies florestais em diferentes partes do mundo.

Nas regiões tropicais e subtropicais, o *Eucalyptus* constitui-se em um dos gêneros mais explorados na silvicultura clonal. Este interesse em inseri-lo na

silvicultura clonal advém dos interesses econômicos, do domínio da tecnologia para as mais diversas aplicações, do uso dos produtos advindos das árvores, da existência de grande variabilidade genética das populações para os mais variados propósitos comerciais além da facilidade de propagação vegetativa aliada as características de rápido crescimento (XAVIER, 2002). Outro exemplo de silvicultura clonal no Brasil é heveicultura, na qual a clonagem foi alternativa para contornar o problema de doenças, produtividade de látex e adaptação local (XAVIER et al., 2009).

O uso florestal da propagação vegetativa é vasto, desde a produção em massa de plantas melhoras ou de híbridos, até a obtenção de floração precoce de plantas destinadas à produção de sementes e frutos, entretanto oferece riscos como a redução da base genética e segregação genética em mudas provenientes de sementes de pomares instalados por estaquia de híbridos (BRUNE, 1982). Para as espécies florestais, a propagação vegetativa possibilita ganhos genéticos maiores do que a reprodução via sementes em menor período de tempo. Ao contrário de espécies agrícolas, as florestais apresentam geralmente uma prolongada fase juvenil antes de atingir o florescimento e a maturidade (GRAÇA e TAVARES, 2000).

Em qualquer processo de propagação vegetativa, o grupo de plantas-filhas fornecido é denominado clone (YAMAZOE e VILAS BOAS, 2003), sendo este um material geneticamente uniforme derivado de apenas um indivíduo e propagado exclusivamente por meios vegetativos (HARTMANN et al., 2002).

Dentre os inúmeros meios de propagação vegetativa, os que mais interessam a ciência florestal são: mergulhia, enxertia, estaquia e cultura de tecidos. Entretanto dentre os métodos de propagação vegetativa, a estaquia é ainda a técnica de maior viabilidade econômica para estabelecimentos de plantios clonais, permitindo a um menor custo à multiplicação de genótipos selecionados em curto período de tempo (PAIVA e GOMES, 2001).

Estaquia

O termo estaquia é usado para designar o processo de propagação no qual ocorre a indução do enraizamento adventício em segmentos destacados tanto da parte aérea quanto da parte subterrânea da planta-mãe. Em condições favoráveis dão origem a uma nova planta, e este segmento, a estaca, deve conter pelo menos uma gema vegetativa, capaz de originar uma nova planta, podendo haver estacas de ramos, raízes e folhas

(FACHINELLO et al., 1995). Quando retirada da parte aérea, ela pode ser herbácea ou lenhosa, ao passo que as estacas radiculares são lenhosas (PAIVA e GOMES, 2001).

O enraizamento de estacas depende de vários fatores destacando-se os ambientais: o estado fisiológico, a maturação, o tipo de propágulo, a sua origem na copa e a época de coleta (PAIVA e GOMES, 2001). Entretanto o sucesso depende de fatores internos como: condição fisiológica da planta mãe, idade da planta mãe, época do ano, tipo de estaca e externos; umidade, temperatura, luz e substrato (PAIVA e GOMES, 2001).

Outros fatores que podem influenciar a propagação por estaquia é a posição da estaca no ramo, o grau de lignificação, a quantidade de reservas, a diferenciação dos tecidos, além dos resultados poderem ser melhorados com um tratamento prévio das estacas com produtos químicos, como auxinas de enraizamento (HARTMANN et al., 2002).

A formação de raízes em estacas é um processo anatômico e fisiológico complexo, associado à desdiferenciação e ao redirecionamento do desenvolvimento de células vegetais totipotentes para a formação de meristemas, que darão origem a raízes adventícias (ALFENAS et al., 2004).

A formação de raízes adventícias deve-se a interação entre fatores existentes nos tecidos e a translocação de substâncias localizadas nas folhas e gemas. Entre esses fatores, os fitohormônios, como as auxinas, as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico são fundamentais. Porém, as auxinas apresentam o maior efeito na indução da formação de raízes (GASPAR e HOFFINGER, 1988).

Estímulo Hormonal

Vários compostos auxínicos sintetizados artificialmente tem sido utilizados para promover o enraizamento adventício, tais como: o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA), sendo o AIB é um dos mais empregados e mais eficiente (DUNN et al., 1996; DUTRA et al., 1998).

De acordo com Gaspar e Hoffinger (1988), a aplicação do AIB, aumenta à concentração endógena de auxina nos tecidos e a formação de raízes adventícias em estacas, e de acordo com Fachinello et al., (1995) o regulador tem por finalidade acelerar o enraizamento, aumentar o número de estacas enraizadas e uniformizar o enraizamento. Segundo Gaspar e Hoffinger (1998), existe uma correlação positiva entre

o nível de auxina endógena livre e a percentagem de enraizamento, e assim, quando o nível de auxina é elevado há maior possibilidade de aumentar o percentual de enraizamento.

O AIB pode ser utilizado na forma de pó, de solução diluída ou de solução concentrada. O método mais empregado na aplicação exógena do AIB é a forma de solução diluída, o que facilita a uniformidade na sua aplicação e diminui os riscos fitotóxicos, embora apresente a desvantagem de perder em pouco tempo a atividade (BASTOS, 2005). Na aplicação em pó apresenta vantagens por ser fácil de usar e de manter por um período maior o contato das estacas com o hormônio, porém pode ser difícil obter resultados mais uniformes, devido à quantidade variável de substâncias que se aderem às estacas, segundo Borges (1978) esse fator é determinado em parte pelo teor de umidade na base das estacas e pela textura de sua casca.

Às vezes, as misturas de substâncias estimuladoras de enraizamento, tal como partes iguais de AIA e ANA, que pode em algumas espécies, ser mais eficiente no enraizamento com maior porcentagem de estacas e mais raízes por estacas que quando se usam substâncias separadas (PAIVA e GOMES, 2001).

A eficiência do AIB no estímulo ao enraizamento é citada em algumas espécies lenhosas. Na estaquia de mirtilo (*Vaccinium myrtillum*), as melhores concentrações variam entre 200 e 400 mg.L⁻¹, aplicada na forma de pó (HOFFMANN et al., 1995). Com acerola (*Malpighia emarginata* D. C.), Alves et al. (1991) testaram diferentes concentrações de AIB (60, 120, 180 e 240 mg.L⁻¹), encontraram o melhor percentual de estacas enraizadas com 240 mg.L⁻¹ de AIB. Entretanto, Bezerra et al. (1991) verificaram que no enraizamento de estacas herbáceas de acerola em câmara de nebulização, o desenvolvimento das raízes não foi influenciado pela utilização de AIB.

Trabalhos realizados com estacas de quivi (MANFROI et al., 1997) observaram que o AIB não influencia na percentagem de enraizamento, porém pode ser indicado para melhorar o processo de obtenção de mudas desta espécie. Silva et al. (2008) verificaram que o uso do AIB para enraizamento de estacas de camu-camu foi mais eficaz na concentração de 400 e 500 mg L⁻¹.

Substrato

O substrato, no qual são colocadas as estacas, influi no sucesso do enraizamento, ele apresenta três funções: sustentar as estacas durante o período de enraizamento,

proporcionar umidade e permitir aeração em suas bases (HARTMANN e KESTER, 2002). Sua composição é de uma parte sólida formada por partículas minerais e orgânicas e poros ocupados por ar e água (MARTINS et al., 1998).

O desenvolvimento e a eficiência do sistema radicular são muito influenciados pela aeração do solo, que depende da quantidade e do tamanho das partículas que definem sua textura (STURION, 1981). Um substrato de boa qualidade deve ter baixa densidade, boa capacidade de absorção de água e nutrientes, boa aeração, drenagem e ser livre de agentes patógenos e qualquer tipo de corpos estranhos.

Há diferentes tipos de substratos que podem ser usados na forma isolada ou em mistura com os outros. Para se conhecer a melhor mistura para enraizamento é aconselhável experimentar as condições ambientais e a espécie a se trabalhar (PAIVA e GOMES, 2001). Dentre os substratos que podem ser utilizados na produção de mudas de espécies florestais, os mais comuns são: vermiculita, composto orgânico, moinha de carvão, terra de subsolo, serragem, casca de arroz carbonizada, terriço e diversas misturas destes constituintes (MARTINS et al., 1998).

O principal componente entre as misturas do substrato é a vermiculita, o qual, quimicamente, é um silicato hidratado de alumínio, magnésio e ferro (SILVA, 2006), podendo ser encontrado no mercado em diferentes tipos granulométricos (extrafina, fina, média e grossa). A inclusão da vermiculita expandida na composição dos substratos aumenta sua capacidade de retenção de água, pois esse mineral absorve até cinco vezes o seu volume em água. Além disso, contém também potássio e magnésio disponíveis e possui elevada capacidade de troca catiônica (FILGUEIRA, 2003).

Alguns substratos comercializados também podem ser utilizados na propagação via estaquia, tais como o Bioplant[®], que consiste na mistura de casca de pinus e fibra de coco que ajudam nos espaços de aeração, retenção de água, além de propiciar a troca catiônica, conseqüentemente possibilitando a planta maior desenvolvimento radicular (AGRILIFE, 2012). O Vivatto[®] por sua vez, utilizado na produção de mudas hortícolas é um produto formulado com casca de pinus bio-estabilizada, vermiculita, moinho de carvão vegetal, água e espuma fenólica estes promovem maior retenção de nutrientes o que minimiza a ocorrência de deficiências nutricionais das mudas. (TECHNES, 2012).

Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo apropriado, em ambiente asséptico (OTTONI, 1984). Baseia-se no fato, amplamente aceito, de que qualquer célula do organismo vegetal é totipotente, isto é, encerra em seu núcleo toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa, estando apta a dar origem, por si só, a uma nova planta, quando submetida a condições apropriadas (TEIXEIRA, 2001).

Como vantagens oferecidas pela cultura de tecidos na propagação vegetal citam-se: o pequeno número de explantes pode ser utilizado para regenerar milhares de plantas; produção de genótipos idênticos à planta matriz (clone); curto espaço de tempo requerido para a produção de grandes quantidades de mudas; necessidade de espaço físico mínimo em comparação aos métodos convencionais de propagação; e a propagação contínua, independente de fatores ambientais e inerentes às diferentes épocas do ano (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Dentre as principais técnicas de cultura de tecidos estão a cultura de plantas intactas (sementes e plântulas), cultura de embriões, cultura de órgãos: ápices, raízes, folhas e anteras, cultura de calos, cultura de suspensões celulares e cultura de protoplastos, com suas principais aplicações na propagação e no melhoramento genético de plantas. A propagação *in vitro* envolve a micropropagação (produção em escala) e a produção de plantas isentas de viroses, enquanto o melhoramento, engloba a preservação e intercâmbio de germoplasma, a hibridação, a variação somaclonal e a indução de mutações, a produção de metabólitos secundários, a transformação genética de plantas e a produção de sementes sintéticas (TORRES et al. 1998).

A cultura de tecidos vegetais é iniciada a partir de um explante que consiste em um segmento de tecido ou órgão vegetal, que pode ser um fragmento de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* (TORRES et al., 1998). Essa regeneração é fundamental na capacidade de a proliferação das células vegetais organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas (KERBAUY, 1997; MANTELL et al., 1994).

Os explantes são uma mistura de células em variados estados: fisiológicos, bioquímicos e de desenvolvimento. Com isso espera-se que a exposição desses explantes a um ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos

celulares, fazendo com que somente algumas células desse explante respondam às condições de cultura *in vitro*, levando à regeneração de um novo indivíduo (MANTELL et al., 1994). Essa habilidade que uma célula ou um grupo de células tem ao responder a um estímulo indutivo visando a um processo de desenvolvimento é denominada competência (TORRES et al., 2000).

Existem três fatores que afetam o cultivo *in vitro* da planta tais como: o genótipo qual a espécie, cultivar ou variedade que está sendo utilizada; a fonte de explante como folhas, raiz, caule, meristema; e a condição de cultura como meio de cultura, luz, temperatura e vasilhame. O sucesso da iniciação e da regeneração da cultura *in vitro* depende da decisão correta no estabelecimento de todos esses fatores (CALDAS et al., 1998).

Dentre as diversas técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática tem sido mais amplamente utilizada no melhoramento florestal e na propagação de espécies lenhosas (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Embriogênese somática e calogênese

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas, sob condições específicas de indução, geram células embriogênicas que através de uma série de modificações estruturais e bioquímicas, resultam na formação do embrião somático (TAUTORUS et al., 1991). Este processo morfogenético é ideal para investigar o processo de diferenciação em plantas, bem como a expressão dos mecanismos de totipotência da célula vegetal. A embriogênese somática, *in vitro* ou induzida, técnica utilizada neste estudo, onde células em diferentes estágios de diferenciação, embriões somáticos que se formam a partir de um tecido intermediário denominado calo podem ser induzidos, por estímulos ambientais ou químicos e, se reprogramadas, adquirem novas competências morfogenéticas (TORRES et al., 1998).

A calogênese, etapa fundamental para a expressão do modelo de embriogênese somática indireta, consiste em grupo ou massa de células com crescimento desordenado e em diferentes estádios de diferenciação que possuem centros ativos de divisão celular. Em condições adequadas, esses centros são induzidos e se capacitam para produção de órgãos; em alguns casos nos quais já são capazes, os centros são apenas estimulados. As células que são capazes de responder a determinados estímulos são denominadas competentes; nelas podem ocorrer a diferenciação celular e a formação de brotos ou

raízes (GEORGE, 1996). A competência é o primeiro passo para a diferenciação celular; o segundo é a indução da determinação em células competentes. As células são determinadas quando se submetem a um caminho particular de desenvolvimento geneticamente programado e continuam sem a influência de reguladores de crescimento.

Um dos fatores mais importantes para se obter a calogênese é a escolha do explante. A indução do calo pode ocorrer usando-se explantes de qualquer parte da planta, sob condições assépticas. Com o estímulo de substâncias endógenas de crescimento adicionadas ao meio, o metabolismo celular é modificado para um metabolismo ativo. O calo embriogênico apresenta a formação de pequenos embriões somáticos capazes de regenerarem plantas completas, com raiz e parte aérea, vista que os mesmos são bipolares (GEORGE, 1996).

Assepsia e estabelecimento *in vitro*

A fase de estabelecimento de explantes *in vitro* é sempre uma etapa complexa na cultura *in vitro* de plantas, em razão dos altos níveis de contaminação dos tecidos por fungos e bactérias, sejam endógenas ou superficiais, os quais são difíceis de ser eliminados. A desinfestação é uma etapa problemática, pois o desinfetante deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar o mesmo. Estes microrganismos competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio de cultura metabólitos tóxicos as plantas (MONTARROYOS, 2000). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo.

Medeiros (1999) em sua pesquisa com indução *in vitro* de respostas morfo genéticas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.) observou que mesmo as plantas submetidas ao rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de microrganismos, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo. Na maioria dos casos, a presença de fungos e bactérias ocorre poucos dias após a inoculação, sendo que em outros, a presença de bactérias e fungos nas plantas é detectada após algum tempo de cultivo, geralmente quando um grande número de plantas já está em produção. Além disso, por

serem de difícil visualização, são facilmente transmitidas de um material para outro durante a manipulação das culturas.

Adicionalmente ao etanol e o cloro, as substâncias mais amplamente utilizadas no processo de assepsia, segundo Grattapaglia e Machado (1998), a utilização de antibióticos e fungicidas é uma importante ferramenta para o controle de contaminações endógenas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1988). O Cercobin[®] trata-se de um fungicida sistêmico, empregado no controle de inúmeras doenças fúngicas em diversas culturas (AGROPROVET, 2012). A Agrimicina[®] é bactericida e fungicida de ação não sistêmica, sendo utilizado na pulverização tanto nas mudas nos viveiros como nas culturas do campo como informado pelo LABORATÓRIOS PFIZER LTDA vide bula.

O PPM[®] é um biocida de amplo espectro/ fungicida utilizado para cultura de tecidos vegetais. Ele mata as bactérias e células de fungos, impedindo a germinação de esporos e em concentrações mais elevadas pode eliminar os microrganismos de contaminação endógena (PLANT CELL TECHNOLOGY, 1998).

As plantas medicinais e aromáticas, com seus princípios ativos antimicrobianos, tornam-se promissoras no controle das doenças de plantas, com isso há um interesse pela utilização de óleos essenciais extraídos dos vegetais. Em alguns trabalhos tem-se estudado o efeito de extratos e óleos essenciais de plantas sobre fungos e bactérias fitopatogênicos, pois a sociedade juntamente com a comunidade científica têm buscado produtos alternativos de baixo custo e inócuos ao homem e ao ambiente (STADNIK e RIVERA, 2001). Segundo Stadnik e Talamini (2004) os produtos naturais de plantas podem representar três atividades principais: antimicrobiana, agindo direto sobre o patógeno, indutores de resistência, ativando os mecanismos de defesa da planta através de moléculas bioativas e também como bioestimulantes do crescimento da planta.

O alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), espécie de uso comprovado na medicina popular, principalmente como antisséptico e antimicrobiano (COSTA, 2002), foi citada em estudos de Matos (2004) como rico em flavonoides, quinonas, triterpenos, com óleo essencial de elevado valor comercial, tendo o timol e o carvacrol como constituintes principais, os quais apresentam propriedades antisséptica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória e larvicida.

Meio de cultura para o cultivo *in vitro*

A obtenção de bons resultados no processo de micropropagação dependem da otimização de várias variáveis, dentre elas a composição do meio de cultura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Neste sentido, uma grande variedade de meios de cultura tem sido testados, sendo o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) o mais universalmente utilizado e servindo como base para diversas formulações, especialmente para a morfogênese.

Diniz et al., (1999), acrescentam que a quantidade e o balanço de nutrientes proporcionados aos explantes são fatores determinantes para a sua utilização durante o cultivo *in vitro*. Os elementos essenciais são requeridos pelas plantas em quantidades variáveis conforme a espécie e o estágio de desenvolvimento. Os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) são elementos essenciais exigidos em maiores quantidades pelas plantas, envolvidos diretamente no metabolismo da planta, fazendo parte de um constituinte essencial (enzima) ou exigido para um passo metabólico específico (reação enzimática) (MALAVOLTA, 1980).

Os meios básicos podem sofrer modificações visando atender as necessidades nutricionais para cada fase da micropropagação. É frequente a utilização do mesmo meio básico para a fase de isolamento e multiplicação, constituído-se de macro e micronutrientes, vitaminas, inositol, fonte de açúcar e outros compostos. A variação mais frequente para a fase de multiplicação relaciona-se à composição dos macronutrientes. A fonte de nitrogênio e o balanço entre os íons nitrato e amônio tem feito jus à aplicação, com a diluição de 1/2, 1/3 e 1/4 da concentração salina do meio MS, por exemplo, bastante frequente na literatura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

São diversos os fatores influentes na morfogênese, dos quais os reguladores de crescimento são considerados de extrema importância (DEL PONTE, 1999). Os mesmos na concentração e combinação adequadas no meio de cultura são determinantes para o desenvolvimento vegetal. Os fitorreguladores suprem as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, os quais se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz. Citocininas e auxinas são os principais responsáveis pela indução e multiplicação de gemas na maioria das espécies de vegetais, com variações nas concentrações exógenas necessárias (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

As auxinas são sintetizadas, principalmente, em tecidos meristemáticos de órgãos aéreos dos vegetais e são responsáveis pela expansão celular, incorporação de materiais na parede celular e aumento da elasticidade (VIEIRA e MONTEIRO, 2002). Existem diversas auxinas conhecidas, apenas duas naturais, o ácido indolacético (AIA), bastante utilizado na cultura de tecidos, e o indolacetonitrilo, pouco utilizado. As sintéticas são mais comuns, dentre elas temos o ácido indolbutírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido nafataleno acético (ANA) que são os mais aplicados em cultivos *in vitro*. Contudo, as auxinas em solução aquosa apresentam severa degradação devido a uma série de agentes, como ácidos, radiações ultravioletas e ionizantes, e inclusive pela luz visível quando na presença de pigmentos sensíveis. O AIA tem a maior sensibilidade a degradação, dentre as auxinas conhecidas, a qual deve-se a ação do oxigênio e peróxido em presença de um redutor (VIEIRA e MONTEIRO, 2002).

Na fase de multiplicação a concentração da auxina normalmente é sempre menor do que a da citocinina, para não promover a formação de calo na base do explante. O ANA e AIB normalmente são utilizados em baixas concentrações como (2,68 μ M) e (2,46 μ M) o AIA, em virtude de sua baixa estabilidade, em concentrações maiores (DEL PONTE, 1999; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

As citocininas estão presentes em regiões meristemáticas e órgãos em crescimento como nas folhas jovens, sementes, frutos e principalmente no meristema apical da raiz, sítio de biossíntese desta substância. São essenciais para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas. São promotoras de crescimento e divisão celular, participando inclusive do alongamento e diferenciação celular (VIEIRA e MONTEIRO, 2002; HU e WANG, 1983). Há, contudo efeitos adversos das citocininas quando em quantidades elevadas, toxidez, estufamento exagerado, formação de roseta (falta de alongamento), má formação foliar e vitrificação dos explantes (DEL PONTE, 1999; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Os efeitos das citocininas nos vegetais são bastante variáveis, em virtude da sua grande quantidade de metabólicos presentes em diversos tipos de tecidos, variando inclusive entre as diferentes espécies da natureza (BRITO e CASTRO, 2002). A primeira citocinina isolada foi a cinetina (6-furfurilaminopurina), com grande capacidade promotora de divisão celular ou citocinese. A zeatina (6-(4-hidroxi-3-trans-metil-2-amino-butenil) purina) foi a primeira citocinina natural identificada presente em sementes verdes de milho. As citocininas

sintéticas são as mais conhecidas, como o BA (6-benzilamino purina), 2iP (6-dimetilamino purina) e PBA (6-(benzilamino)-9-(2-tetrahidronipiranyl)-9H-purina), todas elas ligadas a promoção do crescimento, divisão, alongamento e diferenciação celular (VIEIRA e MONTEIRO, 2002).

Além da definição da composição química para o controle da organogênese *in vitro*, um desafio encontrado nas técnicas de micropropagação está no controle da oxidação (PREECE e COMPTON, 1991).

As substâncias oxidantes mais comumente encontradas em algumas espécies lenhosas cultivadas *in vitro* são os fenóis, flavonóides e taninos (PAIVA e PAIVA, 2001), bastante representativos em tecidos de arbóreas tropicais (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A idade e a fase de desenvolvimento dos explantes são outros fatores associados à síntese dos compostos fenólicos. De modo geral, explantes mais jovens são menos propícios à oxidação (PAIVA e PAIVA, 2001). Andrade et al. (2000) verificou nas plantas lenhosas, o acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos.

Segundo Monaco et al. (1977), a oxidação fenólica pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, pois algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies. Algumas medidas foram recomendadas por Grattapaglia e Machado (1988) para evitar a oxidação dos explantes, como a imersão em soluções antioxidantes de ácido cítrico e, ou, ácido ascórbico antes da inoculação, adição de carvão ativado, ácido ascórbico e, ou, polivinilpirrolidone (PVP) ao meio de cultura.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J.C. Interpretação fenológica de espécies lenhosas de campina na reserva biológica de campina do INPA ao Norte de Manaus. **Acta amazônica**, v.20, p.145-183, 1990.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 2004. 442p.
- ALVES, R.E.; QUEIROZ, S.A.; SILVA, H.; MESSER, R.S. Contribuição ao estudo da cultura da acerola I: efeitos do IBA e da sacarose no enraizamento de estacas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.13, n.2, p.19-26, 1991.
- AMOROZO, M.C.M.; GÉLY, A. Uso de planas medicinais por caboclos do baixo Amazonas, Barcarena, PA, Brasil. **Boletim do museu paraense Emílio Goeldi**, Série botânica, v.4, n.1, p.47-131, 1988.
- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ARBELAEZ, E.P. **Plantas medicinales y venenosas de Colômbia**: estudo botânico, étnico, farmacêutico, veterinário y forense. Medellin: H. Salazar. 295p. 1975.
- BANDEIRA, P.N. **Contribuição ao estudo químico de plantas *Protium Heptaphyllum* March**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Ceará. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2003.
- BANDEIRA, P.N.; PESSOA, O.D.L.P.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L.G. **Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March**. **Química Nova**, v.25, n.6 B, 1078-1080, 2002.
- BANDEIRA, P.N.; MACHADO, M.I.L.; CAVALCANTI, F.S.; LEMOS, T.L.G. Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Journal of Essential Oil Research**, v.13, n.1, p.33-34, 2001.
- BASTOS, D.C.; PIO, R.; SCARPARE FILHO, R.J.A.; LIBARDI, M.N.; ALMEIDA, L.F.P.; ENTELMANN, F.A. Enraizamento de estacas lenhosas e herbáceas de cultivares de caquizeiro com diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, n.1, p.182-184. Jaboticabal, 2005.
- BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E.; ASCHOFF, M.N.A.; FERNANDES, J.M.D.; OLIVEIRA, E.N.M. Enraizamento de estacas herbáceas de acerola (*Malpighia glabra* L.) em câmara de nebulização. **Pesquisa Agropecuária de Pernambuco**, Recife, n.8, p.19-23. 1991.

BORGES, E.E.L. **Enraizamento de estacas de *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus grandis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 1978. 78p.

BRANDS, S.J. (comp.) 1989 present. The Taxonomicon. Universal Taxonomic Services, Zwaag, **The Netherlands**. Accessed January 15, 1989.

BRITO, G.J.M.; CASTRO, P.R.C. Biossíntese de citocininas, ácido abscísico e etileno. In: CAMARGO E CASTRO, P.R.; ALVES DE SENA, J.O.; KLUGE, R.A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**, Maringá: Ed.UEM, 2002. p.63-78.

BRUNE, A. Estratégia da multiplicação vegetativa no melhoramento florestal. **Revista Árvore**, v.6, n.2, p. 162-165, Viçosa, 1982.

CALDAS, L.S. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa- CNPH. v.1, p. 87-132, 1998.

CLAY, J.W.; SAMPAIO, P.T.B.; CLEMENT, C.R. **Biodiversidade Amazônica: Exemplos e Estratégias de Utilização**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e Serviço de Apoio às Micros e Pequenas Empresas do Amazonas (SEBRAE), Amazonas. 1999.

CLEMENT, C.R.; HIGUCHI, N. A floresta Amazônica e o futuro do Brasil. **Ciência e Cultura**, v.58, n.3, p.44-49, 2006.

CORREA, J.E.; BERNAL, H.Y. **Especies vegetales promisorias de los países Del Convenio Andrés Bello**. Colômbia: SECAB/Guadalupe, 485p. Tomo III, B-C. 1990.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. de A. **Dicionário das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-75. 6 v.

CORREIA, M. P.; **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, 1984, vol. 1, p. 89.

COSTA SMO, Lemos TLG; Pessoa ODL, Assunção JCC, Braz- Filho R 2002. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Ver. Bras. Farmacogn 12(Supl.):** 66-67.

DALY, D.C. 2012. **Burseraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB006593>).

DALY, D.C. 1987. **A Taxonomic Revision of *Protium burm.f.* (Burseraceae) in Eastern Amazonia and the Guianas**. Ph.D. dissertation, City University of New York.

DEL PONTE, E.M. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* Labill.** 1999. 47 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

DINIZ, A.J. **Desempenho de cultivares de milho (*Zea mays* L.) em áreas de plantio convencional e direto, sob diferentes densidades de semeadura.** Jaboticabal, 1999. 117p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

DIAS, J.M.M.; ALEXANDRE, R.S.; FELISMINO, D.C.; SIQUEIRA, D.L. Propagação da mangueira. **Manga – Produção Integrada, Industrialização e Comercialização.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p. 79-134. 2005.

DUNN, D.E.; COLE, J.C.; SMITH, M.W. Position of cut, bud retention and auxins influence rooting of *Pistacia Chinensis*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.67, n.1/2, p.105-110, nov, 1996.

DUTRA, L.F.; TONIETTO, A.; KERSTEN, E. Efeito da aplicação de etefon em amexeira (*Prunus salicina* Lindl) e do IBA no enraizamento de suas estacas. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v.55, n.2, p.296-304, maio/ago.1998.

ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding.** Oxford: Clarendon Press, 1994. p.228-246.

FACHINELLO, J.C. HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** Pelotas: UFPel, 1995. 179p.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A. Propagação vegetativa por enxertia. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. (Ed.) **Propagação de plantas frutíferas.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. p.111-139.

FERRAZ, I.D.K.; COSTA, M.M. Morphology and germination of breu-branco a dormant non-orthodox tree seed from the Amazon. International Seed Testing Association: 1, ISBN: Inglês, Meio digital. **Seed Symposium Abstracts**; p.22-32, 2004.

FERRÃO, J.E.M. **Fruticultura tropical: espécies com frutos comestíveis.** Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. v.3. 652p. il.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 412p.

FOWLER, J.A.P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais.** Colombo: EMBRAPA-Florestas, doc. 40, 2000.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings.** Portland: Dioscorides Press, 1988. p.61-69.

GASPAR, T.; HOFFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIES, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Discorides Press, v.2, p.117-131. 1988.

GEORGE, E.F., SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley, Exegetics, 1984. 709p.

GUARIM NETO, G. Plantas do Brasil – Angiospermas do Estado de Mato Grosso, Pantanal. **Acta Botânica Brasílica**, v.5, n.1, p.25-47, jul. 1991.

GUARIM NETO, G. **Plantas utilizadas na medicina popular do estado do Mato Grosso**. Brasília: CNPq, 1987. 58p.

GRACA, M.E.C.; TAVARES, F.R. Propagação vegetativa de espécies florestais. In: GALVÃO, A.P.M. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**. Brasília, DF: Embrapa, Cap. 9, 2000 p. 175 – 197.

GRAÇA, M.E.C.; TAVARES, F.R.; RODIGHERI, H.R.; COOPER, M.A. **Produção de mudas de erva-mate por estaquia**. Curitiba: Embrapa Florestas – EMATER, 1990. 20 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa - CNPH, 1998, 1, p. 183-260.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2th ed. England: Exegetics Limited, 1996. 2v

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7th. Ed. New Jersey: Prentice Hall, 880 p., 2002.

HOFFMANN, A.; FACHINELLO, J.C.; SANTOS, A.M. DOS. Propagação de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) através de estacas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, V.30, N.2, p. 231-236, fev. 1995.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan Publishing Co., 1983. p. 177-227.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, maio 1997.

KRAMER, P.J. e KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkin. 1972. 745p.

LAURANCE, W.F., M.A.; COCHRANE, S.; BERGEN, P. M.; FEARNSIDE, P.; DELAMÔNICA, C.; BARBER, S. D'ANGELO, FERNANDES, T. **The future of the Brazilian Amazon: development trends and deforestation.** Science, 291:438-439. 2001.

LE COINTE, P. **Apontamentos sobre as sementes oleaginosas, bálsamos, resinas, essências, borrachas, gutas e balatas da floresta amazônica.** 5.ed. Belém: Instituto Lauro Sodré, 1939. (Exposição Nacional de Pernambuco).

LOUREIRO, A.A.; SILVA, M.F. da; ALENCAR, J.C. **Essências madeireiras da Amazônia.** Manaus: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 1977. 265p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 2. 352 p. il. color.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992. 352p.

MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais.** Belém: MPEG, 2001. 173p.

MACEDO, M. Dispersão de plantas lenhosas de uma campina amazônica. **Acta Amazônica**, suplemento, v.7, n.1, p.1-69, 1977.

MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 1980. 251p.

MATOS, F. J. A.; SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**, 2ª ed., Edições UFC: Fortaleza, 2004.

MONTARROYOS. A.V.V. **Contaminação *in vitro*.** ABCTP. Notícias. Brasília. nº 36 e 37.P5-10, 2000.

MEDEIROS, C.P.C. de. **Indução *in vitro* de respostas morfogenéticas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.).** 1999. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MARTINS, R. de C. C.; JACINTO, J. M. de MARTINS, I. S. **Viveiros florestais, editora universidade de Brasilia (Coleção textos universitários)**, Brasília, 1998, 22p.

MANFROI, V. FRANCISCONI, A. H. D.; BARRADAS, C.I. N.; SEIBERT, E. 1997. Efeito do AIB sobre o enraizamento e desenvolvimento de estacas de quivi (*Actinidia deliciosa*). **Ciência Rural, Santa Maria**, 27(1): 43-46.

MANTELL, S.H. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 101-181, 1994.

MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A. *et al.* Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-126.

MURASHIGE T, SKOOG FA; A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol** 15: 473-479. 1962.

OHBA, K. 1993 Clonal forestry with sugi (*Crypro meria japonica*). In **Clonal Forestry. II. Conservation and Application**. M.R. Ahuja and W.J. Libby (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp.66 – 90.

OLIVEIRA, A.A. 2000. Inventários quantitativos de árvores em matas de terra-firme: histórico com enfoque na Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica** 30(4): 543-567.

OTTONI, N.C. **Aspectos gerais da cultura de tecidos**. Viçosa, MG: UFV, 1984. 22p

PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. **Cultura de tecidos – Textos acadêmicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação Vegetativa de Espécies Florestais**, (Série cadernos didáticos, 83) Editora UFV, Viçosa, MG, 2001, 46p.

PLANT CELL TECHNOLOGY, INC. 1998. **PPM: A powerful technology to prevent and eliminate microbial contamination in plant tissue culture** (<http://mktechnology.com/ppmweb2.htm#what>).

PREECE, F.E.; COMPTON, M.E.I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry: High-Tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.168-189.

RANKIN-DE-MERONA, J.M.; PRANCE, G.T.; HUTCHINGS, R.W.; SILVA, M.F.; RODRIGUES, W.A. & UEHLING, M.E. 1992. Preliminary results of a large-scale tree inventory of upland rain forest in the Central Amazon. **Acta Amazonica** 22(4): 493-534.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2001. 405p. il.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética amazônica**. Manaus: SEBRAEAM/INPA, 2002a. 532p.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2002b.v.2. p.661-662.

RIBEIRO, B.G. **Dicionário do artesanato indígena**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1988. 343p. (Coleção Reconquista do Brasil, 3. Série especial).

SCHULTES, R.E.; RAFFAUF, R.F. **The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia**. Portland: Dioscorides Press, 1990. 483p. (Historical, Ethno & Economic Botany Series. v.2).

SILVA, F.V.C.; CASTRO, A.M.; CHAGAS, E.A.; PESSONI, L.A. Propagação vegetativa de camu-camu por estaquia: efeito de fitorreguladores e substratos. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 3, n.2, p.92-98, 2008.

SILVA, A.P.P. da. **Desenvolvimento de mudas de maracujazeiro amarelo em tubetes**. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

SILVA, G.T.F.L.; BAPTISTA, A.P.; FAVERO, S. **Bioatividade de óleos essenciais de plantas aromáticas sobre a lagarta-do-cartucho-do-milho (Lepidoptera: Noctuidae)**. In: encontro internacional de integração técnico-científica para o desenvolvimento sustentável do cerrado e pantanal, 2., 2002, Corumbá.

SILVA, M.F.; LISBOA, P.L.B.; LISBOA, R.C.L. **Nomes vulgares de plantas amazônicas**. Manaus: CNPq/INPA, 1977. 109p.

SIANI, A.C.; GARRIDO, I.S.; MONTEIRO, S.S.; CARVALHO, E.S. RAMOS, M.F. *S. Protium* a source of volatile essences. **Biochemical systematics and ecology**, v. 32, p. 447-489, 2004.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.; MENEZES-DE-LIMA JR., O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.; HENRIQUES, M.G. Evaluation of antiinflammatory- related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.1, p.57-69, jul. 1999b.

STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. **Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas**. In: Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 45-62. 2004.

STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. **Ódios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 484p.2001.

STURION, J.A. **Métodos de produção e técnicas de manejo que influenciam o padrão de qualidade de mudas de essências florestais**. Curitiba: EMBRAPA - URPFCS, 1981b. 18p. (EMBRAPA - URPFCS. Documento 3).

SUSUNAGA, G.S. **Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae)**. 1v. 163f. Dissertação (Mestrado em química) - Universidade do Amazonas – Química de produtos naturais, Manaus, 1996.

TAUTORUS, T.E. FOWKE, L.C. DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Can. J Bot.** V.69, p1873-1899, 1991.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas.** Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, simpósios, 2001.

TORRES, A.C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

TORRES A.C, CALDAS L.S.; BUZZO J.A. (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** v.1. e 2. Brasília, Embrapa, 864p. 1998.

VIEIRA; E.L.; MONTEIRO; C.A. **Hormônios vegetais. In: Introdução à fisiologia vegetal.** Maringá, Eduem. p.79-104. (2002).

WENDLING, I.; GATTO, A.; PAIVA, H.N. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas.** Viçosa: Aprenda Fácil Editora. 166p. 2002.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa, MG: ed. UFV. 272 p. 2009.

XAVIER, A. Silvicultura clonal I – **Princípios e Técnicas de Propagação Vegetativa.** (Caderno Didático). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 60 p.

YAMAZOE, G.; VILAS BÔAS, O. **Manual de pequenos viveiros florestais, páginas e letras.** Editora e Gráfica, São Paulo, 2003, 120 p.

ZSUFFA, L., SENNERBY-FORSSE, L., WEISGERBER, H. AND HALL, R.B. 1993 Strategies for clonal forestry with poplars, aspens, and willows. In: **Clonal Forestry . II. Conservation and Application** . M.R. AHUJA AND W.J. LIBBY (eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 91 119.

Acessados na internet:

<http://www.agrilife.com.br/bioplant/a-bioplant>.

<http://www.technes.com.br/vivatto.html#01>.

<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/agrimicina>

http://agroprovet.com.br/index.php?page=shop.product_details&flypage=&product_id=174&category_id=&option=com_virtuemart&Itemid=71> acesso 25 maio 2012.

CAPÍTULO 1

DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DO BREU-BRANCO (*Protium Heptaphyllum*)

RESUMO

A produção de metabólitos secundários por meio da cultura de células e tecidos de plantas contribui para avanços em diversas áreas da fisiologia e bioquímica vegetal. Entretanto, um dos maiores entraves para a definição de protocolos de cultura de células *in vitro* de espécies produtoras de resinas oleosas, tal como o breu-branco (*Protium Heptaphyllum*), é a contaminação do meio nutritivo por microrganismos na fase de estabelecimento destas culturas *in vitro*. Este tipo de contaminação que se estabelece no meio e/ou material vegetal, pode ser prejudicial para a cultura *in vitro*, competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo desenvolvimento do explante, ocasionando, sua perda. Assim, visando contribuir para a superação destes problemas na cultura de tecidos vegetais, o presente trabalho teve como objetivo testar métodos de desinfestação visando o estabelecimento *in vitro* de explantes foliares do breu-branco. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas. Para a desinfestação superficial dos explantes foliares de *P. heptaphyllum* foram testados agentes potenciais no controle de microrganismos: Plant Preservative Mixture (PPM[®]), Cercobin[®] com Agrimicina[®] e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham). Observou-se que o PPM[®] a 1% e 2% foi mais eficiente no controle da contaminação. Para os ensaios com óleo essencial obteve-se o controle de contaminantes microbianos, porém a concentração utilizada demonstrou ser tóxica ao tecido. Em razão destes resultados, sugerem-se novos testes de assepsia com outros desinfestantes, antioxidantes para esta espécie.

Palavras-chave: cultura de tecidos de plantas, estabelecimento *in vitro*, espécie florestal tropical, micropropagação.

ABSTRACT

The production of secondary metabolites by plant cell culture contributed to the progress in various areas of plant physiology and biochemistry. However, a restricting factor for the definition of protocols to *in vitro* cell culture oil-producing species such as *Protium Heptaphyllum*, is contamination of the nutrient medium by microorganisms. This contamination is established in the media and/or in vegetable material, which can be toxic for culture by competing for nutrients, producing toxic substances and inhibiting development of the explant, causing its loss. Thus, , this study aimed to test methods of disinfection for establishment *in vitro* leaf explants of *P. heptaphyllum*. Assays were performed at the Laboratory of Tissue Culture Plants at Embrapa Western Amazon, Manaus, Amazonas. For surface disinfection, leaves of *P. heptaphyllum*, agents were tested in the control of microorganisms: Plant Preservative Mixture (PPM[®]), Cercobin[®] with Agrimicina[®] and essential oils. It was observed that the PPM[®] at 1% and 2% was more effective in controlling infection of leaf explants. For the assays with essential oils was obtained control of microbial contaminants, however the concentration used was toxic to the tissue. In view of these results, we suggest new tests with other disinfesting agents, antioxidants for this species.

Key words: plant cell culture, *in vitro* establishment, tropical forest species, micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Barbosa (2001), a conservação da biodiversidade existente na Amazônia deve ser feita sem medir esforços e de forma rápida. Isso se deve ao grande desenvolvimento regional em relação ao uso dos recursos genéticos que está em constante avanço, causando alterações significativas na biodiversidade, gerando perda da variabilidade genética e até mesmo ameaçando à extinção algumas espécies.

A atividade extrativista é difícil, altamente dispendiosa, de baixo aproveitamento, tornando-se muito agressiva ao meio ambiente, pelos inevitáveis danos provocados pelo abate extensivo de árvores, levando até mesmo muitas espécies a extinção (REYMÃO e GASPARETTO, 2002). Com isso, este tipo de exploração precisa ser realizado de forma a garantir que o conceito de sustentabilidade seja respeitado de modo que a ação presente não deva comprometer os recursos naturais e a qualidade de vida das gerações futuras (SIQUEIRA, 2001).

Um das espécies que vem apresentando potencial econômico e de interesse no mercado de óleos essenciais é o breu branco (*Protium Heptaphyllum*), utilizado na medicina tradicional (anti-inflamatório), no setor da indústria (fabricação de verniz, tintas, velas), e na indústria cosmética (perfumes, sabonetes e aromatizantes de ambiente). Pertence à família Burseraceae, onde alguns gêneros desta família são produtores de uma seiva oleosa rica em óleo essencial (CORREIA, 1984).

Os óleos essenciais são resultantes do metabolismo secundário das plantas, normalmente formados em células ou grupos de células especializadas, que em geral não estão envolvidas em funções vitais vegetais e tampouco fazem parte do metabolismo básico das plantas. São encontradas apenas em grupos restritos - famílias ou gêneros – de plantas, geralmente nos seus caules e folhas. Sua composição química varia significativamente com diversos fatores, desde o cultivo da planta até o método de extração (SIMÕES, 1999).

Atualmente, a indústria de cosméticos vem comercializando alguns produtos derivados da resina do breu branco, principalmente devido ao aroma produzido, o qual vem buscando valorizar as essências da biodiversidade brasileira para perfumes que são destinados tanto ao mercado nacional como internacional (SCARAZATTI, 2009).

De acordo com Bizzo (2009), existem inúmeros conglomerados internacionais que negociam óleos essenciais que são utilizados como matéria-prima para a produção de aromas e fragrâncias. Neste mercado, o Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia. São considerados os quatro principais produtores mundiais, contribuindo com 5% do total importado, principalmente óleo essencial de laranja, limão e outros cítricos.

Apesar da potencialidade e do interesse na utilização do breu-branco pela indústria farmacêutica e cosmética nos dias de hoje, e considerando que sua matéria-prima provém de extrativismo em populações naturais, existe uma carência de informações científicas e tecnológicas sobre esta cultura que tem dificultado sua utilização em larga escala, principalmente em assistir aos programas de reflorestamento.

Neste sentido, a geração de conhecimentos e de tecnologias sobre os diversos aspectos relacionados ao seu cultivo, que atendam às necessidades da cadeia produtiva de maneira mais rápida, econômica e sustentável, pode contribuir de forma significativa para a definição de um sistema de produção para esta espécie.

Dentre estes estudos, a biotecnologia, por meio da cultura de tecidos vegetais, pode ser considerada uma ferramenta de forte impacto frente aos ganhos em produtividade, principalmente quando integradas a programas de melhoramento genético ou à atividade silvícola.

Assim, em vista da escassez de estudos sobre a aplicação de técnicas biotecnológicas em espécies florestais de interesse econômico da região amazônica, este trabalho teve como objetivo testar métodos de desinfestação visando o estabelecimento *in vitro* de explantes foliares do breu-branco (*Protium Heptaphyllum*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios descritos abaixo foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pertencente à Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas.

2.1 Testes de Assepsia com explantes foliares

Ensaio I

Foram utilizados como explantes segmentos de folhas de *P. heptaphyllum*, obtidas de mudas de boa qualidade fitossanitária com aproximadamente um ano de idade mantidas em casa de vegetação.

As folhas foram retiradas e imediatamente acondicionadas em recipiente contendo água para evitar a desidratação dos tecidos e levadas para ambiente de laboratório. Em ambiente asséptico de fluxo laminar, as folhas foram reduzidas com corte na região da nervura central a aproximadamente 1 cm² e imersos em diferentes soluções descontaminantes, nas quais permaneceram em agitação a 100 rpm durante 24 horas, nos seguintes tratamentos:

- 1: Solução de Cercobin[®] com Agrimicina[®], ambas a 0,2%;
- 2: Solução de PPM[®] a 2%;
- 3: Solução de PPM[®] a 1%;
- 4: Solução de PPM[®] modificado a 1% - PPM[®] suplementado com benzoato de sódio (2,0g), sorbato de potássio (2,0g), cloreto de magnésio (2,3g) e nitrato de magnésio (2,3g);
- 5: Solução de PPM[®] modificado a 2%;
- 6: Solução de Cercobin[®] com Agrimicina[®], ambas a 5%.

Após estes tratamentos, foi realizada a assepsia com a imersão dos explantes em álcool a 70% por 60 segundos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio comercial (2,0 e 2,5% de cloro ativo) a 50% por 15 minutos, e por fim, lavagem tríplice em água estéril para eliminação de resíduos das soluções.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura com sais e vitaminas de MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), suplementado com carvão ativo (0,2%), sacarose (3%), ágar (0,7%) e 0,2% de Cercobin[®] com Agrimicina[®], sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 121°C por 15 minutos a 1,3 atm de pressão.

As culturas foram mantidas em ambiente escuro em sala de crescimento a uma temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo avaliada ao final de 15 dias de inoculação a contaminação, determinada por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante. A oxidação foi avaliada a partir da visualização de tecidos oxidados. A sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes sadios.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e 20 repetições (tubos) por tratamento. Com o auxílio do programa ASSISTAT, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Ensaio II

Após coleta e em ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar, os explantes foliares foram reduzidos a 1 cm^2 imersos por 10 minutos nos seguintes agentes desinfestantes (tratamentos):

- 1: Solução de PPM[®] a 2%;
- 2: Solução de PPM[®] modificado a 1%;
- 3: Solução de PPM[®] modificado a 2%;
- 4: Solução de Cercobin[®] com Agrimicina[®], ambas a 5%;

Foram imersos no álcool 70% por 60 segundos, hipoclorito de sódio comercial (2,0 e 2,5% de cloro ativo) a 50% por 15 minutos, seguidas de lavagem tríplice em água estéril. Os explantes foliares foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS, com metade da concentração original dos sais (MS/2) suplementado com carvão ativo (0,2%), sacarose (3%), ágar (0,7%) e 0,1% de Cercobin[®] e Agrimicina[®], sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 121°C por 15 minutos a 1,3 atm de pressão. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em ambiente escuro de sala de crescimento a uma temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 15 dias foi avaliada a contaminação, determinada por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante. A oxidação foi avaliada a partir da visualização dos tecidos oxidados. A sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes sadios.

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 20 repetições (tubos) por tratamento. Os dados

foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, com auxílio do programa ASSISTAT.

Ensaio III

Após a coleta as folhas foram submetidas aos seguintes tratamentos de desinfestação:

- 1: Tratamento controle (imersão em água);
- 2: Imersão em PPM[®] modificado a 1% por 10 minutos.

A seguir os explantes foram imersos em álcool a 70% por 60 segundos, hipoclorito de sódio comercial (2,0 e 2,5% de cloro ativo) a 50% por 15 minutos, seguidas de lavagem tríplice em água estéril. Os explantes foliares foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS/2, suplementado com carvão ativo (0,2%), sacarose (3%), ágar (0,7%) e 0,1% de Cercobin[®] e Agrimicina[®], sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 121°C por 15 minutos a 1,3 atm de pressão. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em ambiente escuro de sala de crescimento a uma temperatura de 26±2°C. Após 15 dias foi avaliada a contaminação, determinada por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante. A oxidação foi avaliada partir da visualização de tecidos oxidados. A sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes sadios.

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi inteiramente casualizado com dois tratamentos com 55 repetições (tubos) por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, análises realizadas pelo programa ASSISTAT.

Ensaio IV

Explantes foliares retirados de mudas mantidas em casa de vegetação foram primeiramente lavadas em água corrente e sabão neutro, e em ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar foram reduzidos a segmentos de aproximadamente 1 cm², sendo em seguida imersos em álcool 70% por 60 segundos e em hipoclorito de sódio comercial (2,0 a 2,5% de cloro ativo) a 50% por 10 minutos e com lavagem tríplice em água estéril.

Antes de serem inoculados, metade da quantidade total de explantes foliares foi mantida em solução com SNP (nitroprussiato de sódio) e o restante em água estéril. A

utilização do SNP foi feita com o intuito de inibir a oxidação do explante.

Os explantes foram inoculados em placas de petri contendo 30 mL de meio de cultura MS/2 suplementado com sacarose (3%), ágar (0,6%), ácido ascórbico (200 mg.L^{-1}) e ácido cítrico (50 mg.L^{-1}), além do SNP e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), de acordo com os tratamentos:

- 1: Controle;
- 2: SNP ($20 \text{ } \mu\text{M}$);
- 3: Óleo de alecrim pimenta $0,6 \text{ } \mu\text{l.mL}^{-1}$;
- 4: Óleo de alecrim pimenta $0,6 \text{ } \mu\text{l.mL}^{-1}$ + SNP ($20 \text{ } \mu\text{M}$);

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 121°C por 15 minutos a 1,3 atm de pressão.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4x2 (quatro tratamentos meio de cultura e dois banhos dos explantes antes da inoculação), com seis repetições cada, sendo a unidade experimental composta por uma placa contendo quatro explantes.

As culturas foram mantidas em ambiente escuro de sala de crescimento a uma temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 dias, sendo ao final deste período avaliada a contaminação, determinada por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante. A oxidação foi avaliada partir da visualização de tecidos oxidados, sendo considerada parcial somente as bordas do explante, e a total, em toda a extensão do segmento. A sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes sadios. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Turkey a 5% de probabilidade. O programa utilizado foi o ASSISTAT.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio I

O sucesso da assepsia depende da idade e do tipo de explante, da concentração da solução esterilizante e do tempo de exposição do explante à solução (DONINI et al., 2005). E ainda, as concentrações das soluções esterilizantes podem variar em função da sensibilidade do tecido a ser desinfestado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Conforme apresentado na Figura 1, em nenhum dos tratamentos testados foi possível obter explantes estabelecidos assépticos e íntegros, como consequência da contaminação por fungos e bactérias e/ou oxidação fenólica dos tecidos.

Em razão da perda total de explantes no tratamento 1, sugere-se que a atividade metabólica do Cercobin[®] e Agrimicina[®] na concentração de 0,2% tenha ineficaz no controle dos microrganismos contaminantes. Os tratamentos 2 e 3 tampouco foram eficientes atingindo valores próximos a 85% de contaminação. Nestes ambos tratamento utilizaram o PPM[®] dentro das faixas recomendadas pelo fabricante do produto. Em baixas concentrações, Tripepi e George (2001) testaram a desinfestação de *Chrysanthemum* utilizando PPM[®] a 0,01%, entretanto concluíram não ser suficiente para o controle microbiano *in vitro*, e indicando a faixa entre 0,01 e 0,05%.

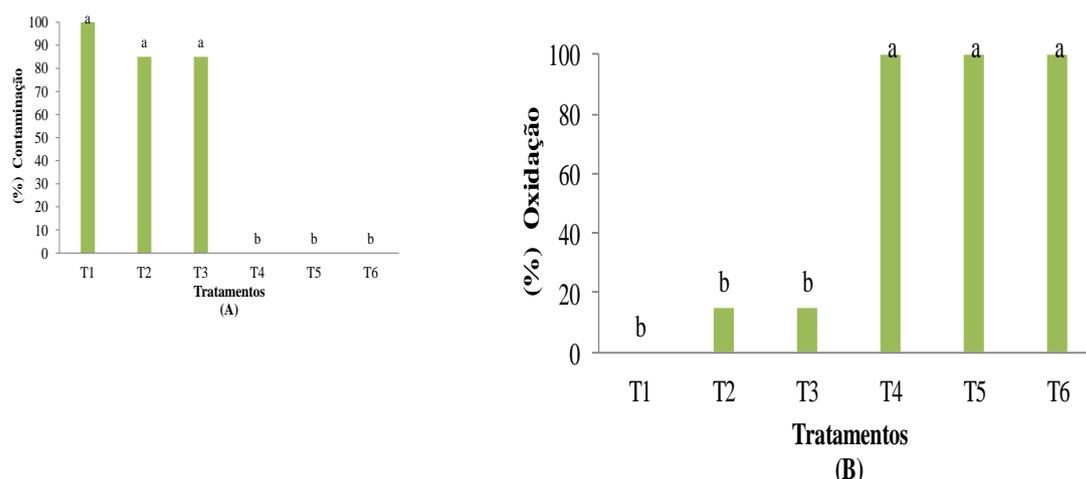


Figura 1: Porcentagem de contaminação e oxidação de explantes foliares de breu branco submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação: T1 - Cercobin[®] e Agrimicina[®] a 0,2%, T2 - PPM[®] a 2%, T3 - PPM[®] a 1%, T4 - PPM[®] modificado a 1%, T5 - PPM[®] modificado a 2% e T6 - Cercobin[®] e Agrimicina[®] a 5%. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

O PPM[®] é um biocida que controla a atividade microbiana, impedindo a germinação de esporos, penetrando na parede da célula e inibindo a atividade das enzimas dentro do metabolismo central, tal como o ciclo do ácido cítrico e cadeia de elétrons (PLANT CELL TECHNOLOGY, 1998).

Para tabaco, as doses crescentes do biocida (0; 0,1; 0,2 e 0,5%) não obtiveram efeito na descontaminação, demonstrando que seu efeito varia de espécie para espécie, já em sementes de melão foi eficiente a 0,5% (COMPTON e KOCH, 2001).

O PPM[®] modificado utilizado nos tratamentos 4 e 5 apresentou maior eficiência da desinfestação dos explantes, porém a toxidez deste produto resultou no escurecimento dos tecidos, mesmo comportamento observado no tratamentos 6, onde foi utilizado Cercobin[®] e Agrimicina[®].

O carvão ativado suplementado a 0,2% no meio de cultura com o objetivo de evitar possíveis oxidações dos explantes, não foi suficiente para o controle de oxidação. O carvão ativado possui a função de neutralizar o efeito de substâncias tóxicas e de compostos fenólicos produzidos pelo explante e liberado ao meio de cultura, além de escurecer o meio impedido a incidência de luz na base do explante, contribuindo assim para a redução da oxidação (FRIDBORG et al.,1978).

Ensaio II

A Figura 2 apresenta os resultados obtidos na assepsia de explantes foliares de breu branco submetido aos tratamentos com PPM[®] a 2%, PPM[®] modificado a 1 e 2%, Cercobin[®] e Agrimicina[®] a 5%. O biocida PPM[®] a 1% e PPM[®] modificado a 1% foram mais efetivos no controle da contaminação resultando em 90% e 95%, de explantes viáveis respectivamente.

A perda de explantes devido à oxidação foi baixa nos tratamentos 1 e 2 (10 e 5% respectivamente) sendo descrito como um dos melhores resultados obtidos, uma vez que os explantes desta espécie mostraram-se bastante sensíveis aos agentes desinfestantes e com dificuldades para seu estabelecimento *in vitro*.

As soluções utilizadas nos tratamentos 3 e 4 (PPM[®] modificado a 1% e, Cercobin[®] e Agrimicina[®] 5%) causaram toxidez aos tecidos 55% e 25% de perda por oxidação.

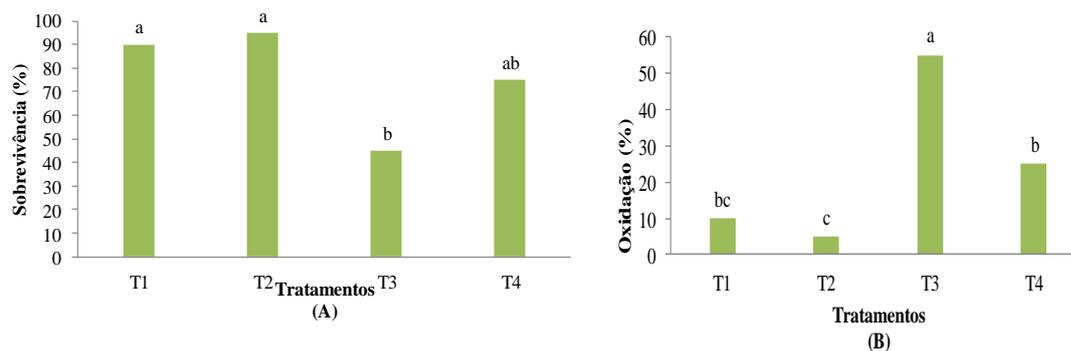


Figura 2: Porcentagem de sobrevivência e oxidação de explantes foliares de breu branco. T1: PPM[®] 2%, T2: PPM[®] modificado 1%, T3: PPM[®] modificado 2% e T4: Cercobin[®] e Agrimicina[®] 5%. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As injúrias causadas aos tecidos podem ter reflexos na oxidação fenólica, possivelmente como resposta celular ao estresse causado, já que ferimentos podem estimular a atividade da fenilalanina amonialiase, a qual está relacionada à formação de compostos fenólicos (TAIZ e ZEIGER, 2009). Segundo Teixeira (2008) a oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa, do tipo quinonas, que se liga a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula.

O reagente utilizado para evitar a oxidação dos explantes foliares foi o carvão ativado, este evita o acúmulo de inibidores fenólicos (PASCAL, 2001). O carvão ativado normalmente é adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,2 a 3% (BEYL, 2000). Porém sua presença pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tecido utilizados (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Neste experimento a concentração do carvão ativado utilizada não resultou em resultados satisfatórios nos tratamentos 3 e 4, fato este que pode também está relacionado ao uso do PPM[®] modificado 2% e Cercobin[®] e Agrimicina[®] 5%, as concentrações foram mais altas que nos outros tratamentos, causando necrose nos explantes.

Ensaio III

Neste ensaio foi observado se o biocida PPM[®] causou toxidez aos tecidos, devido à observação realizada nos ensaios I e II onde ocorreu a oxidação dos explantes foliares.

Neste experimento houve uma baixa ocorrência de contaminantes nos tratamentos 1 e 2, com 25 e 4% respectivamente, que demonstra a eficiência do PPM[®] na descontaminação dos explantes de breu-branco. A perda de tecidos ocorreu devido à oxidação sendo de 75% no tratamento controle e de 96% no tratamento com o biocida. podendo assim sugerir que o uso do PPM[®] neste experimento na assepsia possui um caráter fitotóxico nos explantes foliares.

Este biocida tem sido utilizado em diversas culturas no cultivo *in vitro* e tem se mostrado eficiente. De acordo com Preece e Compton (1991), a concentração de um determinado agente pode promover um maior estabelecimento dos explantes por meio da redução da contaminação. Pode também promover a oxidação de compostos presentes nos tecidos, inviabilizando a continuidade dos trabalhos.

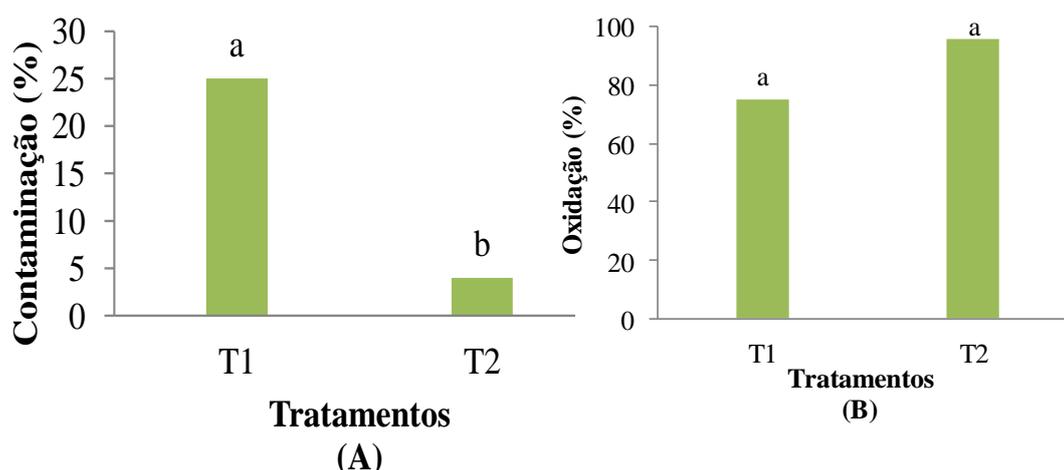


Figura 3: Porcentagem de contaminação e oxidação de explantes foliares de breu branco: T1: controle, T2: PPM[®] modificado a 1%. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ensaio IV

De acordo com os resultados da desinfestação de explantes foliares de breu branco apresentados na Tabela 1, verificou-se diferença estatística significativa entre os fatores estudados e da interação entre estes. A média da porcentagem de explantes sadios nos tratamentos controle e com SNP (T1 e T2) foi superior àqueles com a presença de óleo e SNP (T3 e T4). Essa diferença também foi observada em relação ao banho aplicado aos explantes com o sem SNP. Nos tratamentos 3 e 4, com óleo essencial a $0,6 \mu\text{L.mL}^{-1}$ com e sem SNP, a perda dos explantes foi de 100% devida à oxidação destes tecidos. Os tratamentos 1 e 2 por sua vez, apresentaram 58,3% e 70,8%

de segmentos foliares viáveis respectivamente, descontaminados e aptos para serem utilizados nas fases seguintes de cultivo *in vitro*, conforme observado na figura 4 .

Tabela 1 - Sobrevivência de explantes foliares de breu branco inoculados em meio de cultura com agentes de controle de crescimento microbiano: óleo essencial de alecrim pimenta e nitroprussiato de sódio (SNP).

Tratamentos	Sadios %		
	SNP	Água	Média
1 - controle	41,7 aB	66,7 aA	54,0 a
2 - SNP	50,0 aB	91,7 aA	70,8 a
3 - 0,6 µL -1 óleo	0 bA	0 bA	0 b
4 - 0,6 µL -1 óleo+SNP	0 bA	0 bA	0 b
Média	22,9 b	39,5 a	

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade.

Para a variável contaminação, não houve diferença significativa entre as médias, como mostra na tabela 2. A porcentagem média de contaminação dos explantes foliares nos tratamentos 1 e 2, sendo realizado o enxágue com água, pode ser considerado baixa (8,3%). Já com o enxágue realizado com SNP, a porcentagem aumenta para 25% no tratamento 1 e 20,8% no tratamento 2.

No tratamento 3 observou-se que o óleo essencial de alecrim pimenta apresenta potencial no controle de contaminantes, sendo que quando associado ao SNP (Tratamento 4), tem sua funcionalidade neste controle reduzida. De acordo com Oliveira et al. (2008), a inibição é devida aos teores elevados de timol e carvacrol nos óleos essenciais do gênero *Lippia*, que são responsáveis pela atividade antimicrobiana, agindo na redução da germinação conidial, causando a morte subsequente do fungo.

Tabela 2 - Contaminação de explantes foliares de breu branco inoculados em meio de cultura com agentes de controle de crescimento microbiano: óleo essencial de alecrim pimenta e nitroprussiato de sódio (SNP).

Tratamentos	Contaminação %		
	SNP	Água	Média
1 - controle	25 aA	8,3 aA	16,5 a
2 - SNP	20,8 aA	8,3 aA	14,5 a
3 - 0,6 µL -1 oléo	0 aA	0 aA	0,0 a
4 - 0,6 µL -1 oléo+SNP	8,3 aA	16,7 aA	12,0 a
Média	13,5 a	8,0 a	

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade.

No caso da variável oxidação houve interação significativa entre os fatores testados (Tabela 3). A oxidação parcial ou total foi menor nos explantes quando submetidos ao enxágue com água daqueles banhados em SNP antes da inoculação. Neste sentido, a eficiência destes tratamentos no controle microbiano deve levar em consideração além da toxidez do agente nos explantes, também a eficiência de combate aos microrganismos responsáveis pela contaminação do meio de cultivo.

Estes resultados diferem de Xu et al. (2009), que descreveram o nitroprussiato de sódio (SNP) como um suplemento do meio de cultura que diminuiu significativamente o estresse oxidativo *in vitro* de explantes de *Discorea opposita* em uma concentração de 40 μM , enquanto que a 150 μM agravou a oxidação. Os mesmos autores comentam que este processo está intimamente relacionado com a superprodução de H_2O_2 em tecidos de plantas, que podem servir como um sinal de alarme que conduz à modificação do metabolismo e expressão do gene. No entanto, o excesso de H_2O_2 resulta em morte celular e inibe o crescimento da planta.

Tabela 3 - Porcentagem de perdas por oxidação de explantes foliares de breu branco inoculados em meio de cultura com agentes de controle de crescimento microbiano: óleo essencial de alecrim pimenta e nitroprussiato de sódio (SNP).

Tratamentos	Oxidação Parcial %			Oxidação Total %		
	SNP	Água	Média	SNP	Água	Média
1 - controle	20,8 aA	25,0 aA	23,0 a	12,5	0	6,0 b
2 - SNP	29,2 aA	0,0 bB	14,5 a	0	0	0 b
3 - 0,6 μL^{-1} óleo	0,0 bA	0,0 bA	0,0 b	100	100	100,0 a
4 - 0,6 μL^{-1} óleo+SNP	0,0 bA	0,0 bA	0,0 b	91,7	83,3	87,5 a
Média	12,5 a	6,25 b		50,7 a	45,7 a	

Médias seguidas de mesma letra, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade.

No tratamento 3 apesar de inibir o crescimento de contaminantes *in vitro*, o óleo essencial na dosagem de 0,6 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi tóxico aos tecidos (Figura 4), ocasionando a oxidação completa dos explantes. Oliveira et al. (2008) ao avaliarem o óleo de *L. sidoides* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas, concluíram que este óleo na concentração de 0,3 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi eficiente na inibição do crescimento micelial dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* e *Fusarium oxysporum*.

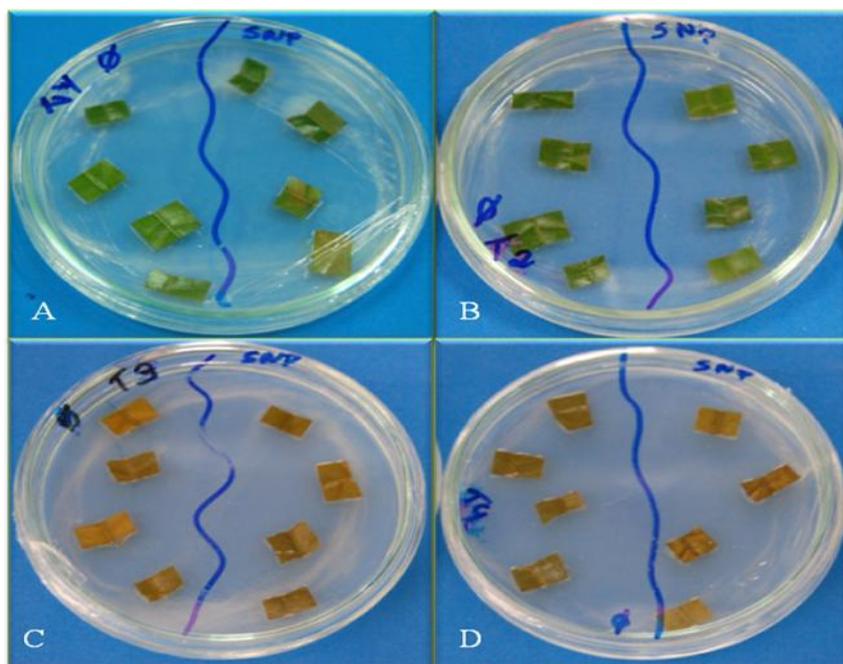


Figura 4: Explantes foliares de Breu branco em meio de cultura acrescido de SNP e óleo de Alecrim pimenta: a) Tratamento controle b) Tratamento com SNP, c) Tratamento com $0,6 \mu\text{L}^{-1}$ óleo de alecrim pimenta e d) Tratamento com $0,6 \mu\text{L}^{-1}$ óleo de alecrim pimenta + SNP.

Considerando-se que a análise fitoquímica de folhas de *L. sidoides* registra até 4% de óleo essencial, que contém mais de 60% de timol ou uma mistura de timol e carvacrol, dois terpenos fenólicos dotados de fortíssima atividade antimicrobiana (CHAVES et al., 2008), levanta-se a hipótese que estas moléculas nos tecidos foliares possam controlar a presença de microrganismos endofíticos e desta maneira a manifestação dos mesmos após inoculação *in vitro* de segmentos foliares. Neste caso, a desinfecção superficial que antecedeu a inoculação do explantes, pode ter sido responsável por parte do sucesso da assepsia alcançada nos tratamentos 1 e 2, visto que a presença de microrganismos que colonizam os tecidos foliares de breu branco sejam bastante reduzidos em função da sua composição fitoquímica.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nos ensaios realizados em explantes foliares de *Protium Heptaphyllum* pode-se concluir que no:

Ensaio I - Os reagentes Cercobin[®] e Agrimicina[®] a 0,2%, PPM[®] 1% e 2%, não foram eficientes no controle da contaminação *in vitro*, e o PPM[®] modificado a 1% e 2% causou fitotoxicidade aos explantes foliares de *Protium Heptaphyllum*.

Ensaio II - A redução do tempo de exposição dos explantes nos reagentes PPM[®] 2%, PPM[®] modificado a 1% elevou-se a taxa de sobrevivência dos explantes foliares acima de 50%.

Ensaio III - A imersão em PPM[®] modificado a 1% reduziu a taxa de contaminação, mantendo a fitotoxidez nos explantes.

Ensaio IV - O uso de nitroprussiato de sódio (SNP) no banho dos explantes foi tóxico na concentração utilizada (20 μM).

- A concentração utilizada 0,6 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ de óleo de alecrim pimenta em explantes foliares de breu branco no meio de cultura controlou o aparecimento de contaminantes microbianos na cultura *in vitro*.

- No tratamento com SNP acrescido ao meio de cultura com o banho somente com água nos explantes foliares foi o que apresentou mais explantes viáveis.

- No tratamento que foi acrescido 0,6 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ de óleo de alecrim pimenta foi fitotóxico aos tecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, F. B. C. A; Moderna biotecnologia e o desenvolvimento da Amazônia. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 43- 79, maio/ago. 2001.
- BEYL CA; **Getting started with tissue culture – media preparation, sterile technique, and laboratory equipament**. In: Trigiano RN, Gray DJ (Ed.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. London: CRC Press, 21-38.2000.
- BIZZO, H. R. HOVELL, A. M. C. REZENDE, C. M. **Química Nova**, Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas No. 00, 1-7, Volume 32. Rio de Janeiro – RJ. 2009.
- CHAVES, F.C.M.; MATTANA, R.S.; GONÇALVES, M.A.; MATOS, F.J.A.; FREIRE, A.M.R.; BIZZO, H.R.; ANGELO, P.C.S.; MING, L.C.; BOTELHO, J.B.L.R; Teor de óleo essencial e seus constituintes em alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) de três regiões geográficas distintas. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. S1462-S1465z, 2008.
- CORREIA, M. P.; **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, vol. 1, p. 89. 1984.
- COMPTON, M. E.; KOCH, J. M. **Influence of plant preservative mixture (PPM®) on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco**. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Wallingford, v. 37, n. 2, p. 259-261, 2001.
- DONINI, L. P. et al. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.
- FRIDBORG, G.; PEDERSÉN, M.; LANDSTRÖM, L. AND ERIKSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiol. Plant.**, 43, 104-106. 1978.
- GEORGE E. F, SHERRINGTON P.D.; **Plant propagation by tissue culture**. Eversley; Exegetics, 709p. (1984)
- GEORGE, M.W. AND TRIPEPI, R.R. Plant Preservative Mixture™ can affect shoot regeneration from leaf explants of *chrysanthemum*, European birch and rhododendron. **Hortscience** 36: 768-769. 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CBAB. v.1. p.183-260. 1998
- MURASHIGE T, SKOOG FA. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol** 15: 473-479. 1962.

OLIVEIRA, T. C. de. **Caracterização e comportamento de acessos de alecrimpimenta (*Lippia sidoides* Cham.) mantidos em Banco Ativo de Germoplasma em São Cristóvão – Se.** Dissertação - Mestrado em Agroecossistemas, Universidade Federal de Sergipe. 86p. 2008.

PASCAL, M. **Introdução: Fundamentos básicos.** Lavra: UFLA/FAEPE, , Cap.5, p.37-45. 2001.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: 17-high-tech and micropropagation I.** Berlin: Springer Verlag,. p. 168-189. 1991.

PLANT CELL TECHNOLOGY, INC. **PPM: A powerful technology to prevent and eliminate microbial contamination in plant tissue culture** (<http://mktechnology.com/ppmweb2.htm#what>). 1998.

REYMÃO, A. E. N., GASPARETO, O. **Recursos Madeireiros e desenvolvimento sustentável na Amazônia.** UNICAMP. Campinas 2002.

SCARAZATTI, C. O. **Produção de Resina de Breu (Burseraceae) no assentamento rural Cristo Rei Uatumã – Amazonas.** Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 72 pp. 2009.

SIMÕES, CM. & Spitzer, V. Óleos essenciais. In: Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento.** Porto Alegre/ Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, p. 387-415. 1999.

SIQUEIRA, T. V. Desenvolvimento sustentável: Antecedentes históricos e propostas para a Agenda 21. **Revista do BNDES, Rio de Janeiro**, v. 8, n.15,p. 247-288, jun. 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 819p. 2009.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações do processo *in vitro* de espécies lenhosas.** Disponível em: <<http://www.redbio.org/portal>>. Acesso em: 15 nov. 2008.

XU, J. ;YIN, H.; WANG, W.; MI, Q.; LIU, X. Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea opposita*. **Plant Growth Regulators**, v.59, p.279–285, 2009.

CAPÍTULO 2

ESTRATÉGIAS DE CULTURA DE TECIDOS DO BREU (*Protium spruceanum*)

RESUMO

A demanda por produtos de origem florestal tem se intensificado nas últimas décadas, implicando na produção de mudas de espécies florestais de qualidade, assim como no desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa para espécies de interesse econômico, como a cultura de tecidos. Neste sentido, em razão da escassez de informações sobre a cultura *in vitro* de breu (*Protium spruceanum*), este trabalho teve como objetivo induzir a formação de calos a partir de explantes foliares e epicótilos desta espécie. Explantes estabelecidos *in vitro* foram inoculados em meio MS/2 suplementado com combinações do regulador 2,4-D (ácido 2,4-diclofenoxiacético), BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e 50 mg L⁻¹ de ácido cítrico. Observou-se que para indução à calogênese em explantes foliares em todos os tratamentos ocorreu a oxidação dos explantes, enquanto que nos segmentos de epicótilo no tratamento 3 com 2,26 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP, ocorreu a formação de calos nas extremidades em 40% dos explantes. Estes resultados foram os primeiros a explorarem a capacidade morfogenética do *P. spruceanum* indicando novos rumos para os estudos de propagação *in vitro* da espécie.

Palavras-chave: Breu, calogênese, epicótilo, espécie florestal tropical.

ABSTRACT

The demand for forest products has intensified in recent decades, resulting in the production of seedlings of forest quality, as well as the development of vegetative propagation techniques, such as tissue culture. Because of this situation and lack of information on the *in vitro* culture of, *Protium spruceanum*, this study aimed to induce callus formation from leaf and epicotyls explants. This explants were inoculated on MS/2 medium supplemented with combinations of the plant growth regulators (2,4-D, BAP and NAA), supplemented with sucrose (30 g L⁻¹), agar (6 g L⁻¹), ascorbic acid (200 mg L⁻¹) and citric acid (50 mg L⁻¹). It was observed that for inducing callus formation from leaf explants in all treatments oxidation of the explants, while the epicotyl treatment 3, 2.26 µM of 2,4 -D + 2.22 µM BAP callus formation occurred at the ends of epicotyl segments in 40% of explants. These results were the first to exploit the capacity morphogenetic *P. spruceanum* indicating new directions for studies of *in vitro* propagation.

Key words: Pitch, callus formation, epicotyl, tropical forest species.

1. INTRODUÇÃO

O *Protium spruceanum* pertence à família Burseraceae que compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies tropicais e subtropicais. O gênero *Protium* é produtor de uma seiva oleosa e aromática rica em óleo essencial e triterpenos das séries oleano, ursano e eufano. Esta resina é amplamente difundida como a de todos do gênero, principalmente usada na medicina popular, como analgésico, cicatrizante e expectorante, na indústria de verniz, na calafetagem de embarcações e como perfume (BANDEIRA et al., 2002).

O *P. spruceanum* é uma planta resinosa e aromática medindo entre 8-14m de altura com copa arredondada e densa (LORENZI, 1998), com sementes de endocarpo duro de germinação lenta e demorada, com poucas sementes germinadas em semanas, podendo se estender por vários meses (CORREA, 1926).

Segundo Daly (1987) sua distribuição ocorre seguintes regiões Norte (Pará, Amazonas, Acre), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso), Sudeste (São Paulo) e Distrito Federal.

As exportações brasileiras de óleos essenciais e produtos derivados estão cada vez mais aquecidas, com diversas instituições, indústrias e pesquisadores trabalhando em parceria em busca de novos óleos a partir da biodiversidade, sendo as atenções voltadas para a riqueza de espécies florestais amazônicas produtoras de óleos essenciais, tais como as espécies do gênero *Protium*. Ao contrário do que se esperaria para o uso sustentável destas espécies, existe a escassez de informações desde as mais básicas, como aspectos botânicos e ecológicos, até aquelas relacionadas ao sistema de manejo e conservação de populações naturais e para o estabelecimento de plantios produtivos. Neste último caso, é importante o conhecimento de técnicas de propagação, nutrição, tratos culturais e ciclo de rotação econômica para assim obter plantas de interesse comercial para serem aplicadas num projeto de reflorestamento.

Dentro deste contexto, como uma alternativa à multiplicação utiliza-se a cultura de tecidos de plantas que tem sido considerada uma técnica biotecnológica de grande crescimento nos últimos anos, com aplicações comprovadas em diversas espécies de plantas (XAVIER, 2009).

A cultura de tecidos consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou culturas vegetais em meio nutritivo apropriado em ambiente asséptico (OTTONI, 1984), e possibilita a

obtenção de um grande número de plantas a partir de poucas matrizes em curto espaço de tempo em uma reduzida área de laboratório (PAIVA et al., 2001).

O objetivo principal da cultura de tecidos é obter nova planta idêntica à original, ou seja, realizar clonagem vegetal definida como propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novo indivíduo mantendo-se o genótipo idêntico ao ancestral comum (TORRES et al., 2000). Segundo Xavier (2009), este processo de regeneração é possível dada a totipotencialidade das células vegetais em manifestar em momentos diferentes e sob estímulos apropriados a capacidade de gerar um novo indivíduo multicelular.

Uma das principais características da cultura de tecidos é o controle, quase absoluto, das respostas morfogênicas que os explantes venham a apresentar. Segundo Guerra (1999), a possibilidade de manipulação da morfogênese relaciona-se com a exata compreensão dos fatores que influenciam nestas respostas quando várias correlações existentes em uma planta intacta são rompidas. Guerra (1999) comenta ainda que tecidos, órgãos ou células com intensidades variadas de determinação podem adquirir novas competências através da ação de determinados sinais químicos (reguladores de crescimento) que ativam seletivamente determinados genes (epigênese). A resposta final é a expressão morfogenética em dois níveis básicos: organogênese e embriogênese somática.

Entretanto as espécies lenhosas apresentam dificuldade para o estabelecimento *in vitro*, devido apresentar microrganismos endofíticos e polifenóis, estes fatores causam a inibição do crescimento do material vegetal ocasionando a morte. Contudo em algumas espécies esses obstáculos são superados e protocolos de indução a calogênese são estabelecidos como podemos citar em estudos realizados com Mogno (*Swietenia macrophylla* King) onde Couto et al. (2006) obteve calos em segmentos de epicótilo em meio contendo a combinação de dois reguladores, 2,22 μM de BAP e 2,68 μM de ANA, 4,44 μM de BAP e 1,34 μM de ANA ou 4,44 μM de BAP e 2,68 μM de ANA, foi observado diferenças de intensidade, textura e coloração em função do tipo e concentração dos reguladores vegetais utilizados. Em experimentos realizados com *Paulownia elongata* indicam que é possível obter bons resultados na formação de calos a partir de segmentos foliares e internodais com uso de 0,44M de CIN e 17,5 μM de TDZ (IPEKCI E GOZUKIRMIRZI, 2004).

Neste sentido, visando contribuir com informações sobre a capacidade morfogênética *in vitro* de espécies florestais de interesse econômico com exploração sustentável na região amazônica, o presente trabalho teve como objetivo induzir a formação de calos em segmentos de folhas e de epicótilo de breu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pertencente à Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas.

As sementes de breu (*Protium spruceanum*) foram coletadas em árvores matrizes localizadas na Reserva Adolfo Ducke, pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizado no município de Manaus, Estado do Amazonas.

2.1 Testes de assepsia de sementes de breu

Inicialmente, sementes de breu foram imersas por 24 horas em soluções de agentes desinfestantes nos seguintes tratamentos:

- 1: Agrimicina[®] e Cercobin[®] 0,1%,
- 2: Agrimicina[®] e Cercobin[®] 0,2%,
- 3: PPM[®] 2%,
- 4: Agrimicina[®] e Cercobin[®] 0,1% sendo acrescentado 150 mg L⁻¹,
- 5: Imersão em Agrimicina[®] e Cercobin[®] 0,1% suplementado com 300 mg L⁻¹,

Após o tratamento de imersão, as sementes foram lavadas em água estéril e em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da concentração original dos sais (MS/2), vitaminas de MS, suplementado com carvão ativado (0,2%), sacarose (3%) e ágar (0,7%). A esta formulação adicionaram-se as mesmas concentrações dos componentes das soluções dos banhos de imersão aplicados inicialmente às sementes, sendo que aos tratamentos 4 e 5 acrescentou-se a estreptomicina a 150 mg L⁻¹ e 300 mg L⁻¹ respectivamente.

O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 121°C por 15 minutos a 1,3 atm de pressão, e o antibiótico foi esterilizado por filtro com membrana de porosidade 0,22µm e acrescentado ao meio após autoclavagem dentro da câmara de fluxo laminar transversal.

Após a inoculação, as culturas foram mantidas em ambiente escuro de sala de crescimento a uma temperatura de 26±2°C. Ao final de 15 dias de inoculação foram avaliados as variáveis contaminação, determinada por avaliação visual da presença de

fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante, e a oxidação, a partir da visualização de tecidos oxidados.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos com 20 repetições cada, sendo a unidade experimental representada por um tubo de ensaio com uma semente. Com o auxílio do programa ASSISTAT, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

2.2 Testes de indução a calogênese em segmentos de folhas

Sementes de breu foram semeadas em caixas plásticas contendo areia esterilizada e mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas claro/8 horas escuro e temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após 60 dias, as plântulas foram retiradas e levadas para câmara de fluxo laminar, das quais foram retiradas as folhas que foram submetidas à assepsia com álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo) a 50% por 10 minutos e lavagem tríplice em água estéril. Em seguida segmentos foliares (1 cm^2) foram inoculados em placas de petri contendo 25 mL de meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração original dos sais (MS/2) suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de ágar, 200 mg L^{-1} de ácido ascórbico e 50 mg L^{-1} de ácido cítrico, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 121°C por 15 minutos a 1,3 atm de pressão. Nos tratamentos os reguladores de crescimento 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) foram testados nas seguintes concentrações:

- 1: $2,26\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D;
- 2: $4,53\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D;
- 3: $2,26\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D + $2,22\text{ }\mu\text{M}$ de BAP;
- 4: $4,53\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D + $2,22\text{ }\mu\text{M}$ de BAP;
- 5: $2,68\text{ }\mu\text{M}$ de ANA;
- 6: $5,37\text{ }\mu\text{M}$ de ANA;
- 7: $2,68\text{ }\mu\text{M}$ de ANA + $2,22\text{ }\mu\text{M}$ de BAP;
- 8: $5,37\text{ }\mu\text{M}$ de ANA + $2,22\text{ }\mu\text{M}$ de BAP;

Após a inoculação, as culturas foram mantidas em ambiente escuro de sala de crescimento a uma temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. As variáveis analisadas foram porcentagem

de perda de explantes devida à contaminação ou oxidação, e a porcentagem de calos formados.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com oito tratamentos com cinco repetições cada, sendo a unidade experimental representada pela placa de petri contendo 5 segmentos de folhas. Com o auxílio do programa ASSISTAT, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

2.3 Testes de indução a calogênese em segmentos de epicótilo

Explantes obtidos de plântulas germinadas em caixa com areia autoclavada e mantidas em sala de crescimento, foram levadas para ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar, segmentos de epicótilo, com aproximadamente 1 cm², foram imersos em álcool 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio (2,0 a 2,5% de cloro ativo) a 50% por 10 minutos, seguidos de tríplice lavagem em água estéril.

Os explantes foram inoculados em placas de petri contendo 25 mL de meio de cultura MS/2 suplementado com suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e 50 mg L⁻¹ de ácido cítrico, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 121°C por 15 minutos a 1,3 atm de pressão. Nos tratamentos os reguladores de crescimento 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) foram testados nas seguintes concentrações:

- 1: 2,26 µM de 2,4-D
- 2: 4,53 µM de 2,4-D
- 3: 2,26 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP
- 4: 4,53 µM de 2,4-D + 2,22 µM de BAP
- 5: 2,68 µM de ANA
- 6: 5,37 µM de ANA
- 7: 2,68 µM de ANA + 2,22 µM de BAP
- 8: 5,37 µM de ANA + 2,22 µM de BAP

Após a inoculação, as culturas foram mantidas em ambiente escuro de sala de crescimento a uma temperatura de 26±2°C. Após 15 dias foi avaliada a porcentagem de perda de explantes devida a contaminação ou oxidação e ao final de 30 dias avaliou-se a porcentagem de calos formados.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com oito tratamentos com cinco repetições cada, sendo a unidade experimental representada pela placa de petri contendo 5 segmentos de epicótilos. Com o auxílio do programa ASSISTAT, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes de assepsia de sementes de breu

Com exceção do tratamento 3, onde obteve-se 30% de sementes descontaminadas, os demais tratamentos, todos contendo Agrimicina[®] e Cercobin[®] em diferentes concentrações, resultaram em 100% de explantes contaminados, indicando que o uso combinado dos produtos desinfestantes tanto na assepsia quanto componente do meio não foi eficiente para a assepsia das sementes de breu.

Esta baixa eficiência é bastante comum no estabelecimento *in vitro* de explantes de espécies tropicais, devido à presença de microrganismos ser favorecida pela temperatura e umidade elevadas características de regiões tropicais. Lopes e colaboradores (2001) ao testar Agrimicina[®] em estudos de assepsia com ápices e segmentos nodais de mogno (*Swietenia macrophylla*) observaram também altas taxas de contaminação por microrganismos (87%), enquanto Handa et al. (2005) ao testar a desinfestação de gemas apicais de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), obtiveram 66% de explantes viáveis após a imersão por 60 minutos em solução contendo Agrimicina[®] a 30%.

No presente estudo, a combinação de fungicidas e antibióticos surtiu pouco efeito sobre o controle de fungos e bactérias *in vitro*, com exceção do tratamento com PPM[®], que possibilitou, ainda que em pequeno número, explantes limpos. Entretanto, ao final de 60 dias não foi observada a germinação destas sementes, possivelmente este agente pode ter causado toxicidade às sementes, ou estas terem perdido sua viabilidade, por se tratar de uma semente recalcitrante.

3.2 Testes de indução a calogênese em segmentos de folhas

Nos tratamentos realizados para indução à calogênese em explantes foliares de breu não ocorreu à formação de calos. Conforme demonstrado na Figura 1, a oxidação ocorreu em 100% dos explantes foliares nos tratamentos 1, 2, 5 e 8, indicando que presença do ácido ascórbico e do ácido cítrico não influenciou no controle do processo de estresse oxidativo nestes tecidos. Considerado bastante comum em espécies lenhosas devido à liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em respostas aos ferimentos. Ferreira (2003), comprovou que o ácido ascórbico a 100 mg L⁻¹ foi eficiente no controle da oxidação em explantes de crisântemo (*Dedranthema grandiflorum*), assim como

Melo e colaboradores (2001) ao isolarem eficientemente explantes de guarirobeira (*Syagrus oleraceae*) com mesmo antioxidante. Siqueira e Inoue (1991) conseguiram isolar folhas de coco, com a utilização de ácido cítrico resultando em 53% de explantes saudios e o com ácido ascórbico em 46%.

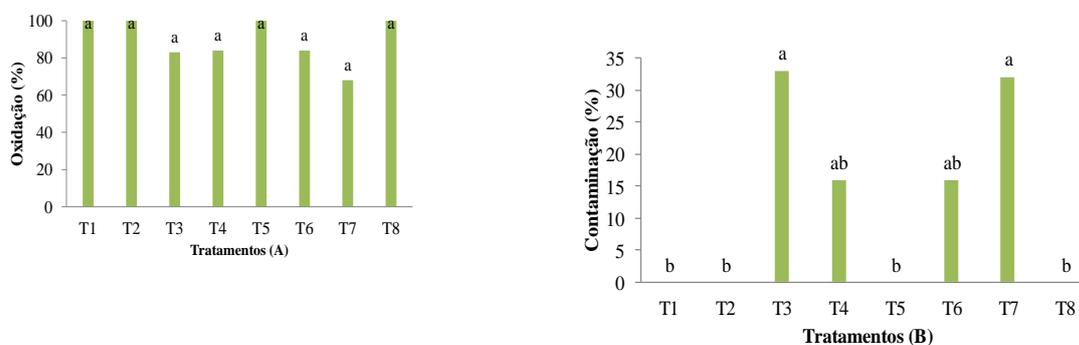


Figura 5: Porcentagem de oxidação e contaminação de explantes foliares de *Protium spruceanum* (breu) submetidos a diferentes tratamentos para indução da calogênese. T1: 2,26 μ M de 2,4-D; T2: 4,53 μ M de 2,4-D; T3: 2,26 μ M de 2,4-D + 2,22 μ M de BAP; T4: 4,53 μ M de 2,4-D + 2,22 μ M de BAP; T5: 2,68 μ M de ANA; T6: 5,37 μ M de ANA; T7: 2,68 μ M de ANA + 2,22 μ M de BAP; T8: 5,37 μ M de ANA + 2,22 μ M de BAP. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Estes ácidos têm sido utilizados para tentar retardar a oxidação dos tecidos (MURASHIGE, 1974; EL-HENNAWY e WALLY, 1980), e de acordo com George (1996) e Melo et al. (2001), a eficiência se deve à reação com os metais pesados do meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para oxidação, removendo o oxigênio de outras moléculas e também atuando por mecanismos alternativos.

Apesar dos explantes ao final do processo de assepsia com álcool e hipoclorito de sódio não apresentarem sinais de danos causados por estas substâncias desinfestantes, este processo pode também haver contribuído para oxidação. Em estudos realizados por Cordeiro (2006), explantes foliares de mangueira (*Mangifera indica*) tratadas com hipoclorito de sódio, apresentou 72% de perdas pela oxidação destes explantes. Resultados obtidos por Ferreira (2009) indicaram que a utilização da menor concentração de hipoclorito de sódio (0,25%) por 20 minutos de imersão dos explantes, auxiliou na redução da oxidação dos tecidos, e foi eficiente na assepsia de explantes florais de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*).

Outro fator que pode causar a oxidação é a presença de reguladores de crescimento, que neste ensaio não induziram a formação de calos nos explantes foliares.

De acordo com George (1996), a produção de polifenóis é influenciada por reguladores do crescimento adicionados ao meio de cultura. No entanto, este autor ressalta que o seu efeito e a relação com o escurecimento dos explantes não é consistente, uma vez que o mesmo regulador que induz escurecimento de uma espécie, em outra não tem o mesmo efeito, devido às diferenças genéticas entre as espécies. Van Staden et al. (2006) acrescenta que um desequilíbrio hormonal devido ao tipo de combinação e concentração de reguladores de crescimento adicionado ao meio de cultura, pode gerar este estresse oxidativo.

Considerando que o meio de cultura possa levar ao escurecimento e morte de explantes, no presente ensaio foi proposto uma redução de sais do meio de cultura original, visto que de acordo com Pasqual et al. (1997), a oxidação é menos severa em meio diluído do que em um outro com alta concentração de sais, como o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

3.3 Testes de indução a calogênese em segmento de epicótilo

Observou-se que 30 dias após a inoculação foi possível observar a formação de calos nas extremidades dos segmentos de epicótilo em diferentes tratamentos, como também a oxidação e contaminação dos tecidos.

Os calos formados apresentaram estruturas globulares do tipo semcompacto de coloração creme (Figura 4). Pode-se observar que a fase de indução de calos foi atingida, porém não ocorreu a rediferenciação destes, por seguinte não resultando em embriogênese ou organogênese (Figura 3).

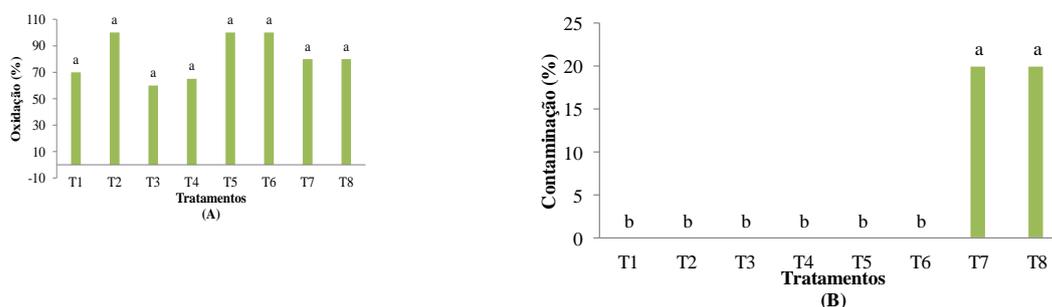


Figura 6: Porcentagem de oxidação e contaminação de epicótilo de *Protium spruceanum* (breu) submetidos a diferentes tratamentos: T1: 2,26 μ M de 2,4-D; T2: 4,53 μ M de 2,4-D; T3: 2,26 μ M de 2,4-D + 2,22 μ M de BAP; T4: 4,53 μ M de 2,4-D + 2,22 μ M de BAP; T5: 2,68 μ M de ANA; T6: 5,37 μ M de ANA; T7: 2,68 μ M de ANA + 2,22 μ M de BAP; T8: 5,37 μ M de ANA + 2,22 μ M de BAP. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No tratamento 3, com a menor concentração de 2,4-D (2,26 μM) associado com o BAP (2,22 μM), obteve-se a formação de calos em 40% de explantes (Figura 3).

Esta mesma auxina quando em concentração mais elevada no tratamento 4 (4,53 μM) induziu à formação de calos em 35% dos segmentos de epicótilos, e 30% quando isolada no tratamento 1. Os tratamentos com o ANA associados ou não com BAP não induziram a calogênese. Estes resultados não são compatíveis com os descritos com por Machado et al. (2010), onde estudando explantes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) obteve resultados satisfatório na indução de calos nas concentrações de 2,22 μM de BAP com 2,68 μM de ANA. Já Brunetta et al. (2006), obteve a formação de 100% de calos nas extremidades dos segmentos de epicótilo nas mesmas concentrações e combinações utilizadas no tratamento 7 deste trabalho.

Estudos de Gamborg (1982), Jain (1995) e George (1996) afirmam que é possível o estabelecimento de uma cultura de calo de praticamente qualquer parte da planta, empregando um meio nutritivo simples, acrescido de auxinas e citocininas. Santos et al. (2005) ao estudar a calogênese em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana*), observaram o efeito positivo da combinação de ANA com BAP na formação de calos friáveis em concentrações bem mais elevadas como 32,22 μM e 8,88 μM , respectivamente. A formação de calos também observada por Landa et al. (2000), foi obtida em maiores concentrações de BAP (10,74 μM) e ANA (4,44 μM).

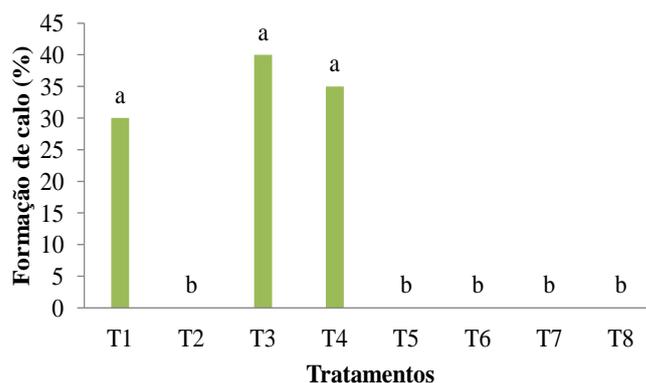


Figura 7: Porcentagem de calogênese em segmentos de epicótilo de *Protium spruceanum* (breu) T1: 2,26 μM de 2,4-D; T2: 4,53 μM de 2,4-D; T3: 2,26 μM de 2,4-D + 2,22 μM de BAP; T4: 4,53 μM de 2,4-D + 2,22 μM de BAP; T5: 2,68 μM de ANA; T6: 5,37 μM de ANA; T7: 2,68 μM de ANA + 2,22 μM de BAP; T8: 5,37 μM de ANA + 2,22 μM de BAP. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O balanço entre auxinas e citocininas desempenha um papel fundamental na resposta *in vitro* dos explantes, assim é possível que concentrações mais elevadas de 2,4-D ou BAP ou até a utilização de outras auxinas e citocininas proporcionem o estímulo necessário para obtenção de uma maior calogênese. Segundo Santos (1998), as concentrações de citocininas parecem interagir com a quantidade de auxina endógena do explante o que leva a formação de calos. Segundo Yeoman (1970), relata que o crescimento do calo pode ser de quatro formas: Independente de auxinas e citocininas, dependentes de auxinas, dependentes de citocininas ou dependente de ambas.

O efeito da auxina 2,4-D na calogênese é bastante discutido em pesquisas com espécies florestais, confirmando a eficiência deste regulador. As auxinas são reguladores vegetais muito requisitados para a indução de calos a partir de explantes, pois possuem a capacidade de alterarem a fisiologia geneticamente programada de tecidos vegetais já diferenciados; células que respondem às auxinas são revertidas para o estado desdiferenciado e começam a se dividir (George, 1996). A mais utilizada para iniciar uma cultura de calos é o 2,4-D, embora alguns pesquisadores utilizem o AIA (ácido indolacético) e ANA para evitar variações genéticas e outros efeitos.

A textura e cor dos calos formados podem ser considerados organogênicos segundo Ipekci e Gozukirmizi (2005) e Arunyanart e Chaitrayagun (2005), onde relatam que as porções translúcido-brancas ou amareladas dos calos são consideradas friáveis e com potencial para se converterem em órgãos ou embriões. Pinto (2012), relata que formação de calos compactos com estruturas globulares em Mogno (*Swietenia macrophylla*) utilizando citocinina (BAP) na concentração de 1,0 μM .

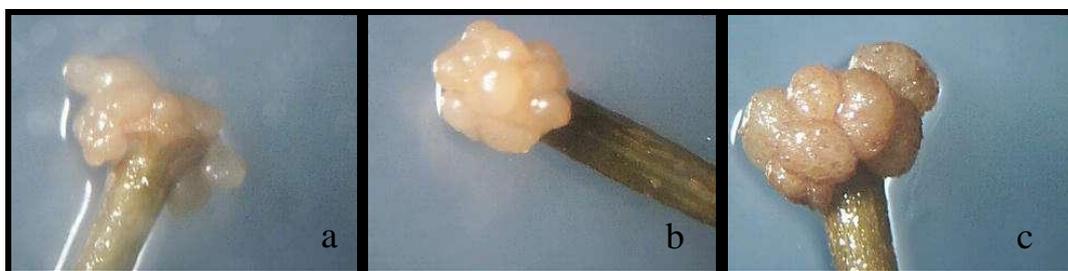


Figura 8: Formação de calos em epicótilo de breu. a) Calos formados no tratamento T1: 2,26 μM de 2,4-D (a: 0,7x); b) massa calosa gerada no T3: 2,26 μM de 2,4-D + 2,22 μM de BAP (b: 0,7x); c) calos formados no T4 4,53 μM de 2,4-D + 2,22 μM de BAP (Fotos com objetiva: 0,7x).

4. CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi conduzido, conclui-se que:

- A assepsia de sementes de breu com PPM[®] foi de baixa eficiência;
- O uso de Agrimicina[®] e Cercobin[®], combinados ou não com estreptomicina não controlaram a contaminação de sementes *in vitro* de breu;
- Explantes foliares de breu foram sensíveis ao processo oxidativo;
- O regulador de crescimento 2,4-D isolado ou combinado com BAP foi capaz de induzir a calogênese de segmentos de epicótilo de breu.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUNYANART, S.; CHAITRAYAGUN, M. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). **Scientia Horticulturae**, v.105, p.411-420, 2005.
- BANDEIRA, P. N. PESSOA, O. D. L. P.TREVISAN, M. T. S. LEMOS T. L. G. **Química. Nova. Metabólitos secundários de *Protium Heptaphyllum* March** Vol. 25, No. 6 B, 1078-1080, 2002.
- BRUNETTA, J. M.F. C., OTONI, W. C., PINHEIRO, A. L., FONSECA, E. P., Calogênese in vitro em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftatalenoacético. **Scientia forestalis**. n.71, p.19-24, agosto 2006.
- CORRÊA, M. P.; PENNA, L. de A. **Diccionario das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.6, 1926
- CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, A. C. de Q.; RAMOS, V. H. V.; FALEIRO, F. G.; FRAGA, L. M. S. RAPD markers utilization and other parameters in the determination of mango hybrids genitors. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.164-167, 2006.
- COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E. de P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilos de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6- benzilaminopurina e acido α -naftalenoacetico. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 19-24, 2006.
- DALY, D.C. **A Taxonomic Revision of *Protium burm.f.* (Burseraceae) in Eastern Amazonia and the Guianas**. Ph.D. dissertation, City University of New York. 1987.
- EL-HENNAWY, H. M.; WALLY, A. Vegetative propagation of date palm *Phoenix dactylifera* L. by explant culture *in vitro*. **Egyptian Journal of Horticulture**, Cairo, v. 7, p.211-220,1980.
- FERREIRA, R.G.M.; SANTOS, A.R.M.; BRAGADO, R.C.A. **Propagação *in vitro* de Cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes**. Saber Científico, Porto Velho, v. 2 p.37-44. 2009.
- FERRREIRA, I.T. **Propagação *in vitro* de crisântemo ‘Funny Pynk’**. Pelotas, RS. 40 f. Dissertação de mestrado FAEM, Universidade Federal de Pelotas. 2003.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. **Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas**. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568. 1999.

GAMBORG, O. L. Callus and cell culture. In: WETTER, L. R. E CONSTABEL, F. **Culture methods**. Ottawa, Saskatoon, p. 1-9. 1982.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: In practice**. Parte 2. Exegetics Limited, Reino Unido, 1361pp. 1996.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**: part. 1 – The Technology. 2nd ed. Edington: Exegetics, 574p. 1996.

HANDA, L.; SAMPAIO, P.; QUISEN, R. Cultura *in vitro* de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaodora* Ducke). **Acta amazônica**. v.35, p. 29-33, 2005.

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 79: 341-345. 2004.

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.79, p.341-345, 2005.

JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWMAN, R. J. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. v. 2. **Kluwer Academic Publishers**, The Netherlands. 1995.

LANDA, F.S.L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.56-63, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, v. 2. 352 p. il. color. 1998.

LOPES, S. da C.; LAMEIRA, O. A.; FONTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v. 7, n.1, p. 124-128, 2001.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da Guabirobeira (*Syagrus oleraceae*) **Ciência e Agrotecnologia**. V.25, n.06, p.1301-1306, 2001.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE T, SKOOG FA. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol** 15: 473-479. 1962.

MACHADO, W.; CARNEIRO, A. A.; COELHO, T. C. P.; **Influência de BAP e ANA na formação de calos de *Jatropha curcas* L.** IV Congresso Brasileiro de Mamona. João Pessoa. P.270-275, 2010.

OTTONI, N.C. **Aspectos gerais da cultura de tecidos**. Viçosa, MG: UFV, p.22, 1984.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação Vegetativa de Espécies Florestais**, (Série cadernos didáticos, 83) Editora UFV, Viçosa, MG, p.46, 2001.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 1997. 159p.

SANTOS, M. R. A. dos. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach**. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 1998.

PINTO, F. **Calogênese e indução de gemas axilares em mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SANTOS, B; PAIVA, R; MARTINOTTO, C; CRAVO N, RAÍRYS; D.O. P.; Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, vol. 35, núm. 3, pp. 510-514. 2005.

TORRES, A.C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 128p. 2000.

VAN STADEN, J; FENNELL, C; TAYLOR, N. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. **Acta Horticulturae**: 725: 55-62. 2006.

YEOMAN, M. N. Early development in callus culture. **International Review of Cytology**, 29: 389-409. 1970.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: ed. UFV. 272 p. 2009.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO E SUBSTRATOS NA PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR ESTAQUIA DE BREU MANGA (*Protium guacayanum*)

RESUMO

O breu manga (*Protium guacayanum*) é uma espécie amazônica caracterizada pela presença de resina oleosa rica em óleos essenciais e triterpenos encontrados em diferentes partes da planta. Estudos farmacológicos realizados com os óleos essenciais extraídos de várias espécies do gênero comprovam a eficiência da atividade anti-inflamatória e terapêutica, possibilitando assim aplicações do óleo essencial na indústria de cosméticos ou na medicina popular. O trabalho teve como objetivo avaliar a influência do ácido indolbutírico (AIB) e diferentes substratos no enraizamento de estacas caulinares de breu manga (*P. guacayanum*). As estacas caulinares foram tratadas em solução hidroalcoólica 50% nas concentrações 0, 100, 200 e 400 mg L⁻¹ de AIB e plantadas em caixas plásticas contendo os substratos Bioplant[®], Vivatto[®] e areia com vermiculita. Após 120 dias em casa-de-vegetação com nebulização intermitente avaliou-se a porcentagem de sobrevivência, enraizamento e formação de calos. Os dados foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial (4x3), sendo quatro concentrações de AIB e três substratos, com 4 repetições de 6 estacas por unidade experimental. Os resultados indicam que a emissão de raízes das estacas de breu manga depende do uso do AIB. As melhores concentrações de AIB foram de 200 e 400 mg L⁻¹, as quais estimularam 29 e 16% de enraizamento respectivamente, sendo o Vivatto[®] o melhor substrato. No entanto a porcentagem de sucesso ainda é baixa, sugerindo a utilização de concentrações mais elevadas de AIB e outras auxinas.

Palavras-chave: Espécie florestal tropical, silvicultura clonal, estaca caulinar, auxina.

ABSTRACT

The breu manga (*Protium guacayanum*) is an tropical species characterized by essential oils, resin and triterpenoids found in different parts of the plant.. Pharmacological studies made with essential oils extracted from various species of the genus demonstrated the efficacy of anti-inflammatory activity and therapy, as well possible applications of the essential oil in the cosmetic industry or in folk medicine. The study aimed to evaluate the influence of indolbutyric acid (IBA) and different substrates on the rooting stem cuttings of breu manga (*P.guacayanum*). The cuttings were treated in 50% water-alcohol solution at concentrations of 0, 100, 200 and 400 mg L⁻¹ IBA and planted in plastic boxes containing the substrates Bioplant®, Vivatto® with vermiculite and sand. After 120 days at greenhouse with intermitted mist, were evaluated the percentage of survival, rooting and callus formation. The data were analyzed according to completely randomized design in factorial arrangement (4x3), four concentrations of IBA and three substrates, four replicates of six cuttings per experimental unit. The results indicate that the emission of root cuttings breu manga depends on the use of IBA. The best concentrations of IBA were 200 and 400 mg.L⁻¹ stimulates 29 and 16% of rooting, respectively. The best substrate was the Vivatto®. However, the success rate is still low, suggesting the use of higher concentrations of IBA and other auxins.

Key words: Tropical forest species, clonal forestry, stem cuttings, auxin.

1. INTRODUÇÃO

Amplamente encontrado nas florestas de terra-firme amazônica, as espécies do gênero *Protium* são popularmente conhecidos como ‘breus’ (BANDEIRA, 2002), sendo considerados na medicina popular como um importante agente terapêutico com ação anti-inflamatória, analgésica, expectorante e cicatrizante (MAIA et al., 2000). Caracterizados pela presença de óleos essenciais e resina, os breus também são utilizados na indústria de verniz e calafetagem de embarcações e outros objetos de madeira, sendo também popularmente queimada pela sua ação repelente de insetos (BANDEIRA, 2002). Estes óleos e resinas se encontram armazenados em diferentes partes da planta, em ductos ou cavidades, quase sempre com traços de látex branco resinoso em seus ramos ou disperso em formas de gotículas em talhos feitos na casca (SIANI et al., 2004).

O *Protium guacayanum* é uma espécie de ampla distribuição, ocorrendo nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país (DALY, 2012). Apesar de ser considerada uma planta aromática potencial, ainda é bastante incipiente em conhecimentos quantitativos da composição, estrutura, dinâmica, distribuição e relações ambientais na comunidade vegetal.

Atualmente as indústrias do mercado de óleos essenciais que se encontram na linha de frente da inovação tecnológica, tem voltado suas atenções para algumas espécies florestais amazônicas de usos múltiplos e produtoras de princípios ativos de interesse, dentre elas espécies do gênero *Protium*. Entretanto, a valorização destas espécies e a sua inclusão neste setor produtivo tem deparado com a escassez de informações relativas à sua silvicultura e crescimento, principalmente aquelas referentes às técnicas de produção de mudas, visto que a qualidade da muda utilizada nos plantios influencia o sucesso de qualquer programa de desenvolvimento florestal.

Neste contexto é que a utilização da técnica de propagação vegetativa pode ser considerada como alternativa à multiplicação, bem como uma ferramenta de clonagem que visa maximização da qualidade e uniformidade da muda e, sobretudo, para viabilizar a sua aplicabilidade em plantios em escala comercial.

Uma das técnicas que vem sendo utilizada para a multiplicação de genótipos que alia produtividade e qualidade é a estaquia, que é um método de propagação onde segmentos são destacados de uma planta, sob condições adequadas, emitem raízes e originam uma nova planta, com características idênticas àquelas que lhe deu origem

(PASQUAL et al., 2001). Considerada a técnica de maior viabilidade econômica por ser um processo rápido e de baixo custo, requer um espaço relativamente pequeno, que permite obter um número elevado de mudas a partir de poucas plantas-matrizes (HARTMAN et al., 2002).

Segundo Janick (1966), a capacidade de um caule emitir raízes adventícias é uma característica que depende da planta e do tratamento subsequente, bem como sua interação de fatores que se encontram presentes em células da estaca, como as substâncias transportáveis produzidas nas suas folhas e gemas.

Dentre os reguladores de crescimento, substâncias orgânicas sintéticas que modificam ou controlam um ou mais processos fisiológicos específicos na plantas, as auxinas são os reguladores com maior efetividade na promoção de raízes, sendo a concentração necessária variável para cada espécie. O tipo de fitorregulador tem respostas diferentes devido à sensibilidade das raízes a essas substâncias dependendo da concentração utilizada, podendo até inibir a formação de raízes adventícias (ALVARENGA e CARVALHO, 1983). Dentre as auxinas mais utilizadas no enraizamento de estacas, têm-se o ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e o diclofenoxiacético (2,4-D) (PAIVA e GOMES, 2005). O AIB tem sido utilizado em estudo com eucaliptos para desenvolvimento de raízes adventícias nas estacas (PAIVA e GOMES, 2005).

O substrato desempenha importante função no processo da estaquia, pois dele depende basicamente a sustentação das estacas, mantendo na sua base um ambiente úmido, escuro e suficientemente aerado (FACHINELLO et al., 1995), a porcentagem de estacas enraizadas e a qualidade do sistema radicular formado (HARTMANN et al., 2002).

Dentro deste contexto, visando contribuir com subsídios para as soluções de entraves tecnológicos no segmento de produção vegetal, e com foco na geração de alternativas de propagação vegetativa de espécies florestais de grande valor ecológico e interesse econômico, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do ácido indolbutírico (AIB) e diferentes substratos no enraizamento de estacas do breu manga (*Protium guacayanum*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação climatizada com nebulização intermitente com temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 90% de umidade relativa, localizada na Embrapa Amazônia Ocidental, no município de Manaus, Estado do Amazonas.

Foram utilizadas mudas saudáveis de breu manga mantidas em viveiro telado com aproximadamente um ano de idade, das quais foram confeccionadas, da parte mediana do ramo, estacas com 10-12 cm de comprimento, com corte em bisel na base e reto no ápice, além da manutenção de duas folhas com sua área reduzida à metade na porção apical da estaca. Durante o preparo das estacas, estas foram dispostas em recipientes com água para evitar a desidratação.

A porção basal das estacas foram imersas durante 10 segundos em solução hidroalcoólica 50% de AIB nas concentrações 100, 200 e 400 mg L^{-1} como pode ser visto na figura 1-b, além do controle (ausência tratamento com AIB). Estas soluções foram preparadas previamente à coleta das estacas, dissolvendo-se o ácido em álcool etílico (P.A.), sendo o volume completado até a obtenção da concentração final desejada na proporção 1:1 (água: álcool). Em seguida, as estacas foram colocadas em caixas plásticas contendo os seguintes substratos: areia e vermiculita (1:3), Bioplant[®] e Vivatto[®]; estaqueadas na profundidade de 2/3 do seu comprimento, como demonstrado na figura 1-c.



Figura 9: Instalação do experimento de breu manga (*Protium guacayanum*) em casa de vegetação. a) Corte e preparo das estacas; b) Tratamento em solução de AIB; c) Distribuição das estacas nos substratos.

O ensaio foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4x3 (quatro concentrações de AIB e três tipos de substratos), com quatro repetições e 6 estacas por unidade experimental.

Aos 120 dias, avaliou-se o número de estacas com formação de raízes adventícias e/ou calos, estacas que não apresentavam indução radicial nem formação de calos, e estacas que se encontravam com tecidos necrosados. Os resultados obtidos em porcentagem foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância e as variáveis que apresentaram diferença estatística significativa pelo teste de F tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis estudadas foram porcentagem de enraizamento, formação de calos e sobrevivência de estacas de breu manga são apresentadas na Tabela 1.

A porcentagem de enraizamento obtido em todos os tratamentos foi considerada baixa, variando entre 0 a 29,2% (Figura 2-c), sendo observada diferença estatística significativa nesta variável somente entre os substratos testados. No substrato Vivatto[®], a média de estacas enraizadas foi de 14,6%, sendo esta superior aos demais substratos areia/vermiculita (7,3%) e Bioplant[®] (4,2%).

As maiores porcentagens de enraizamento foram observadas nas concentrações de 200 e 400 mg L⁻¹ de AIB com o substrato Vivatto[®]. Almeida (2010) também encontrou resultados satisfatórios em estudos de enraizamento em estacas de camu-camu (*Myrciaria dúbia*), sendo este substrato responsável pelas maiores médias das variáveis estudadas.

O substrato comercial Vivatto[®], composto por casca de pinus, bio-estabilizada, vermiculita, moinho de carvão vegetal, água e espuma fenólica, possui disponibilidade de nutrientes que podem contribuir para uma melhor produção de biomassa (TECHNES, 2012). Hartman et al. (2002) inferiram que a maior disponibilidade de nutrientes nos substratos contribui para uma melhor produção de raiz.

Por outro lado, a baixa porcentagem de enraizamento obtida nos tratamentos com 100 mg L⁻¹ de AIB e controle, 8,3% e 4,2%, respectivamente, indicam que a formação de raízes adventícias de breu manga é dependente da aplicação de AIB.

No substrato composto por areia/vermiculita, a maior porcentagem de estacas enraizadas foi de 16,67% no tratamento controle (Figura 2-b). Dutra e Kersten (1996) concluíram que a boa capacidade de drenagem e maior espaço poroso proporcionado pela areia e o equilíbrio entre os teores de água e ar, bem como a adequada densidade proporcionada pela vermiculita, propiciaram o enraizamento de estacas de ameixeira (*Prunus salicina*). Fachinello e colaboradores (1995) afirmam que por suas características físico-químicas diferenciadas, um substrato pode afetar a formação de mudas clonadas a partir de estacas, com vantagens ou desvantagens, em função da espécie em que se está trabalhando, tornando necessário definir para cada espécie o melhor substrato, ou combinação a ser utilizada.

O Bioplant[®] por sua vez, apresentou o pior desempenho no enraizamento das estacas do breu manga, com média dos tratamentos de 4,2%. Neste caso, ao final do

ensaio observou-se que nas caixas plásticas (Figura 2-d) com este substrato ocorreu a maior retenção de água, levando à podridão e morte das estacas associada à umidade e temperaturas altas, presentes na casa de vegetação, condições ideais para o desenvolvimento de fungos, demonstrando a intolerância do breu branco a substratos encharcados, com a podridão.

De acordo com Hartmann et al. (2002) um substrato adequado para o enraizamento deve ser suficientemente poroso, a fim de permitir trocas gasosas eficientes, visto que a maior disponibilidade de oxigênio na base das estacas favorece a atividade celular durante o processo de formação de calos e da emissão de raízes. Segundo Lemaire (1995), o espaço poroso total é definido como o volume do substrato não ocupado por minerais ou partículas orgânicas, correspondendo aos poros maiores que proporcionam aeração para as raízes. Por isso, Hartmann et al. (2002) reforçam que, como geralmente estacas necessitam de alta umidade foliar permanente, o uso de um substrato de fácil drenagem poderia atenuar esse problema.

A formação de calos foi influenciada pelos substratos, mas não pelos tratamentos com AIB, sendo que a composição vermiculita/areia apresentou maior formação de calos (7,3%) diferindo estatisticamente dos demais. Não houve a formação de calos no substrato Bioplant[®], assim como nas estacas tratadas com AIB a 400 mg.L⁻¹ mantidas no Vivatto[®]. Sampaio (1987) destaca ainda que a rapidez na formação de calos muitas vezes determina o êxito do plantio de estacas em algumas espécies florestais, porém nem sempre também está relacionado com a formação de raízes, já que são processos fisiológicos independentes. Apesar de Hartmann et al. (2002) afirmarem que frequentemente, as raízes aparecem após à calogênese, por meio da diferenciação das células parenquimatosas formadas nessa massa celular, aparentemente, no presente trabalho a formação dos calos e raízes foram processos totalmente independentes.

Com relação à sobrevivência, interações estatísticas significativas foram verificadas, sendo a morte das estacas antecedida pelo amarelecimento das folhas e, em alguns casos, abscisão foliar. No substrato composto por areia/vermiculita a sobrevivência foi de 64,6%, enquanto no Vivatto[®] e Bioplant[®] foram de 54,2% e 36,5%, respectivamente. Marques (2007) também obteve baixos índices de sobrevivência, inferiores a 10%, com o uso de Bioplant[®] em estaquia de faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus*). Segundo Dutra et al. (2012) a redução da aeração devido à

sua elevada capacidade de retenção de água neste substrato é em média, 30% superior aos demais substratos.

Os tratamentos com AIB não diferiram estatisticamente entre si, com porcentagens variando 40,3 a 58,4%. Com o uso do substrato Vivatto[®] foi observado porcentagem de 58,3% de sobrevivência sem o uso do regulador de crescimento, enquanto que ocorreram taxas de sobrevivência inferiores de 30% nos tratamentos com AIB nas concentrações de 0 e 200 mg.L⁻¹, no substrato Bioplant[®].

Observou-se que apenas estacas que mantiveram suas folhas durante todo o período do experimento, formaram calo e/ou enraizaram. De acordo com Lima et al. (2007), que obteve elevados índices de mortalidade com estacas apicais de jambolão (*Syzygium cumini*), estacas apicais que apresentam tecidos tenros, são mais propensas a perda, enquanto com estacas mais lignificadas, a alta mortalidade pode estar relacionada à abscisão das folhas, pois estas são essenciais para a síntese de hormônios e nutrientes.

A deficiência nutricional constatada pela análise visual das folhas também demonstrou que as estacas possuem um limitado suprimento de nutrientes orgânicos e inorgânicos, como reserva em seus tecidos. Segundo Nicoloso et al. (1999), a quantidade de reserva de nutrientes orgânicos e inorgânicos nos tecidos de uma estaca são uma das causas de baixos índices de sobrevivência.



Figura 10: a) Estacas de breu manga nos diferentes substratos; b) Aspecto das estacas enraizadas em substrato areia/vermiculita na ausência de AIB ; c) Aspectos das estacas enraizadas no substrato Vivatto[®] com 200 mg L⁻¹ de AIB; d) Aspecto das estacas no substrato Bioplant[®].

Tabela 3.1: Valores médios de porcentagem de sobrevivência, desenvolvimento de calos e raízes em estacas de *Protium guacayanum* em função da concentração do AIB e diferentes tipos de substratos. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2012.

AIB (em mg.L ⁻¹)	Estacas enraizadas (em %)				Formação de calo (em %)				Sobrevivência (em %)			
	Vivatto [®]	Bioplant [®]	A+V	Média	Vivatto [®]	Bioplant [®]	A+V	Média	Vivatto [®]	Bioplant [®]	A+V	Média
0	4,2	0,0	16,7	6,9 a	4,2	0,0	8,3	4,1a	58,3	33,3	79,2	56,9a
100	8,3	4,2	8,3	6,9 a	0,0	0,0	8,3	2,8a	54,2	41,7	79,2	58,4a
200	29,2	0,0	0,0	9,7 a	4,2	0,0	4,2	2,8a	54,2	25,0	41,7	40,3a
400	16,7	12,5	4,2	11,1 a	0,0	0,0	8,3	2,8a	50,0	45,8	58,3	51,4a
media I	14,6 a	4,2 b	7,3 ab		2,1 ab	0,0 b	7,3a		54,2 ab	36,5b	64,6a	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Sigla: (A+V) - areia + vermiculita (1:3), Média I – média de substratos e Média II – médias de concentrações de AIB.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados e nas condições em que o presente trabalho foi realizado, conclui-se que:

- O uso de AIB estimula a formação de raízes adventícias em estacas de breu manga;
- O substrato composto por areia e vermiculita proporcionou maior taxa de sobrevivência de estacas;
- A manutenção de folhas nas estacas é essencial para a formação calo e/ou raízes adventícias;
- Estacas de breu manga não suportam substratos com elevada capacidade de retenção de água.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nos ensaios realizados com explantes de breu branco (*Protium Heptaphyllum*) com diferentes agentes desinfestantes, sugere-se novos ensaios testando tempo de imersão, combinações ou até mesmo testes com outros reagentes;
- No ensaio realizados com óleo essencial em breu branco (*Protium Heptaphyllum*), recomenda-se testar o óleo de *Lippia sidoides* na assepsia de explantes em concentração inferior a $0,6\mu\text{L mL}^{-1}$, combinados ou não com o SNP em diferentes concentrações;
- Recomenda-se a realização de ensaios com o óleo essencial do próprio breu branco (*Protium Heptaphyllum*) neste processo de desinfestação;
- Em relação ao surgimento dos calos em breu (*Protium spruceanum*) pode ser realizado novos testes com diferentes reguladores de crescimento, testando combinações de auxinas e citocininas como também diferentes concentrações;
- Para aumentar o percentual de estacas enraizadas em breu manga (*Protium guacayanum*) é necessário realizar novos testes com reguladores de crescimento: concentrações mais elevadas de AIB, assim como outras auxinas e cofatores;
- Realizar testes com diferentes substratos: puros ou misturas, que além de servir como suporte para a estaca, ajudem na regulação da disponibilidade de água e nutrientes, mantendo na sua base um ambiente úmido, escuro e suficientemente aerado, mas também com suficiente porosidade para permitir uma boa drenagem;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. A. M. **Influência de diferentes substratos em plantas de Camu-Camu [*Myrciaria dubia* (Humb., Bonpl. & Kunth) Mc Va-ugh] submetidas à propagação vegetativa**. 2010. Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Ji-Paraná. Roraima, 2010.
- ALVARENGA, L. R.; CARVALHO, V. D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas de frutíferas. **Informe Agropecuário**, v.9, n.101, p.47-55, 1983.
- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L. P.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS T. L. G. **Química. Nova. Metabólitos secundários de *Protium Heptaphyllum* March** Vol. 25, No. 6 B, 1078-1080, 2002.
- DALY, D.C. **Burseraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB006593>). 2012.
- DUTRA, T. R.; GRAZZIOTTI, P. H.; SANTANA, R. C.; MASSAD, M. D. Desenvolvimento inicial de mudas de copaíba sob diferentes níveis de sombreamento e substratos. **Revista Ciência e Agrônômica**, v.43, n.2, p.321-329, abr-jun, 2012.
- DUTRA, L., KERSTEN, E. Efeito do substrato e da época de coleta dos ramos no enraizamento de estacas de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl). **Ciência Rural**, v. 26, n. 3, p. 361-366, 1996.
- FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 179.p, 1995.
- JANICK, J. **A ciência da horticultura**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, p. 224-329. 1966.
- HARTMAN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T. D.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. Prentice- Hall/Englewood Cliffs, New Jersey. 7th ed. Upper saddle River: Prentice Hall. 2002.
- LEMAIRE, F. Physical, chemical and biological properties of growing medium. **Acta Horticulturae**, n.396, p.273-284, 1995.
- LIMA, Y.O.U. et al. **Tipos de estacas e substratos no enraizamento de jambolão**. Scientia Agraria, v.8, n.4, p.449- 53, 2007.
- MARQUES, F. J.: **Propagação sexuada e assexuada da faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus* (Müll. Arg.) Pax & L. Hoffm.): subsídios para o seu cultivo como lavoura xerófila**.89f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, 2007.

MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium Heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em misturas binárias. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 623-626, 2000.

NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; FOGAÇA, M.A.F. Influência da posição da estaca no ramo e do substrato no enraizamento de estacas de *Pfaffia glomerata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.277-283, 1999.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. (Série cadernos didáticos, 83), Editora UFV Viçosa, MG, 46 p. 2005.

PASQUAL, M.: **Fruticultura Comercial: Propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 137 p. 2001.

SAMPAIO, P.T.B. **Propagação vegetativa do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) pelo método de estaquia**. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. p. 36-37. 1987.

SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; MONTEIRO, S. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 477-489, 2004.

Acessado na internet:

<http://www.technes.com.br/vivatto.html>