



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

MARIA ISABEL GARCIA RIBEIRO

**REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE
CAÇARI(*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh)**

**BOA VISTA
RORAIMA – BRASIL
2016**

MARIA ISABEL GARCIA RIBEIRO

**REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CAÇARI
(*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Roraima em parceria com a Embrapa Roraima.

Orientador: Dr. Edvan Alves Chagas
Coorientadora: Dra. Pollyana Cardoso Chagas

Boa Vista, RR
2016

**Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Roraima**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

--

MARIA ISABEL GARCIA RIBEIRO

**REGENERAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CAÇARI
(*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Produção Vegetal.

Aprovada: dia 26 de fevereiro de 2016

Pesq.Dr. Edvan Alves Chagas
Orientador – Embrapa Roraima

Prof^a. Dr^a. Pollyana Cardoso Chagas
Coorientadora/UFRR

Pesq. Dr. Raphael Henrique da Silva Siqueira
Pós-Doc. CAPES/PNPD

Pesq. Dr. Daniel Schurtz
Embrapa Roraima

Prof. Dr. Ozimar de Lima Coutinho
UFRR

Boa Vista, RR
2016

Dedico este trabalho aos meus pais
José Francisco Ribeiro e Maria do
Socorro Garcia Ribeiro.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, o autor da minha vida e fiel companheiro.

Aos meus queridos pais, por me instruir nesta vida, dando-me educação, palavras de conforto, segurança e me envolvendo na sua grande fé. Não há palavras para explicar o quanto sou grata e feliz por ter os melhores pais.

Minhas queridas irmãs e irmãos que sempre me abraçaram com seu amor e estenderam suas mãos para me acolher.

Agradeço a minha querida sobrinha e afilhada Miriam Ribeiro por seu carinho, sua amizade e o respeito prestado a mim.

Agradeço ao meu fiel companheiro de vida Ronald Franco Rivas pelos momentos inesquecíveis junto a mim, por ter acreditado no meu potencial e almejado todas as minhas conquistas. Eu te amo ontem, hoje e eternamente!

Agradeço ao meu querido orientador Dr. Edvan Alves Chagas, que desde a minha caminhada da graduação até o momento atual me acompanhou, me ensinou com muita dedicação. Para mim ele é o espelho de determinação e sucesso profissional, obrigada pela paciência!

A minha querida coorientadora Dr^a Pollyana Cardoso Chagas pelo o apoio, confiança e a credibilidade. Vai ser sempre um prazer fazer parte da sua equipe de pesquisa.

As minhas queridas amigas Nilma e Jaqueline pelo o apoio e ajuda em todos os momentos.

Aos meus amáveis amigos Lucas e Sara por estarem presentes nos momentos que mais precisei e pela confiança, respeito e carinho que recebi de ambos.

Aos meus amigos Olisson, Marcos, Railin e Ricardo Bardales por imensa dedicação, ajuda e palavras afetivas.

A equipe da Embrapa Roraima pelo o carinho, atenção e a harmonia de trabalharmos juntos.

Aos professores do curso pela atenção, ensinamentos e, sobretudo pela amizade.

Aos amigos da turma de Mestrado 2014.1 pelo companheirismo ao longo do curso.

Aos demais servidores atuantes no Centro de Ciências Agrárias pela ajuda direta e indireta, os quais contribuíram para que meu objetivo final fosse alcançado.

A todos vocês, meu muito obrigado.

RIBEIRO, M. I. G. **Regeneração e multiplicação *in vitro* de caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh)**. Boa Vista – RR. Universidade Federal de Roraima, 2016. 79 p. (Dissertação de Mestrado – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal).

RESUMO

O caçari é uma frutífera nativa da Amazônia que possui grande potencial devido as elevadas concentrações de ácido ascórbico que podem atingir 8.000 mg/ 100 g de polpa, atualmente sendo considerada a fruta mais rica em vitamina C. Porém, por ser uma frutífera nativa, pouco se conhece sobre as características de propagação vegetativa em escala comercial. Dentre as técnicas de propagação vegetativa, a micropropagação se destaca como uma das técnicas mais promissoras para propagação comercial em larga escala e curto espaço de tempo. Neste sentido objetivou-se com o presente trabalho avaliar a influência da consistência do meio de cultura, concentrações de fertilizante comercial, Fe e citocinina na regeneração e multiplicação *in vitro* caçari. Para tal, foram instalados dois experimentos: 1) Regeneração *in vitro* de caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) em meio de cultura contendo diferentes concentrações de fertilizante comercial e ferro; 2) Multiplicação *in vitro* de caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) sob diferentes concentrações de citocininas. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima e foram utilizados como explantes segmentos caulinares de caçari provenientes de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação. Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 125 mm e 30 ml de meio de cultura WPM. Após a inoculação, os explantes permaneceram por 15 dias no escuro e, posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade de $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após 90 dias, foram avaliadas as variáveis número de brotos, comprimento dos brotos e porcentagem oxidação. Para ambos os experimentos, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes. No primeiro experimento, verificou-se que a adição do fertilizante Maxsol[®], na dose de $0,75 \text{ g.L}^{-1}$, no meio de cultura promove melhor regeneração de brotos de caçari. O meio de cultura sem adição de ferro, proporciona melhor desempenho para o estabelecimento dos explantes de caçari. O ferro na fase de regeneração dos explantes de caçari não se mostra imprescindível e sua presença não contribui para a diminuição do processo de oxidação. Já no segundo, verificou-se que maior proliferação de brotos de caçari é obtida com BAP na concentração de $4,9 \text{ mg.L}^{-1}$. A adição de citocinina no meio de cultura não foi benéfica para o comprimento de brotos. As concentrações de citocininas testadas causaram efeito oxidativo elevado, indicando a necessidade de testar concentrações mais baixas.

Palavras-chaves: Frutífera Nativa. Camu camu. Myrtaceae. Micropropagação. Citocinina.

RIBEIRO, M. I. G. **Regeneration and *in vitro* multiplication of caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh).** 2016. 79p. Master's Degree Dissertation in Agronomy – Federal University of Roraima, Boa Vista, 2016.

ABSTRACT

The caçari is a native fruit from Amazonian, has great potential due to the high ascorbic acid concentrations up to 8,000 mg / 100 g pulp, currently being considered the richest fruit in vitamin C. However, being a native fruit, little is known about the vegetative propagation characteristics on a commercial scale. Among the vegetative propagation techniques, micropropagation stands out as one of the most promising techniques for commercial spread on a large scale and short time. In this sense, the purpose of this study was to evaluate the influence of the consistency of the medium, commercial fertilizer concentrations, Fe and cytokinin in the regeneration and proliferation *in vitro* of caçari. For this, two experiments were installed: 1) *In vitro* regeneration of caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) in culture medium containing different concentrations of commercial fertilizer and iron; 2) *In vitro* multiplication of caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) with different concentrations of cytokinins. The experiments were conducted at the Embrapa Roraima Tissue Culture Laboratory and were used as explants shoot segments of caçari from mother plants grown in a greenhouse. After sterilization, explants were inoculated into 125 mm test tubes and 30 ml of WPM media. After inoculation, the explants remained for 15 days in the dark and then were transferred to a growth room with 16 hours of photoperiod, temperature 25 ± 2 °C and light $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. After 90 days, the variable number of shoots, length of shoots and oxidation percentage were evaluated. For both experiments, the experimental design was completely randomized in a factorial with five replications, each replication consisted of five explants. In the first experiment, it was found that the addition of Maxsol® fertilizer at a dose of 0.75 g.L^{-1} in the culture medium promotes better healing of caçari shoots. The medium without addition of iron culture, provides better performance for the establishment of explants caçari. The iron in the regeneration phase of the explants caçari shown not essential and their presence does not contribute to the reduction of the oxidation process. In the second, it was found that most caçari proliferation of shoots is obtained with BAP at concentration of 4.9 mg.L^{-1} . The addition of cytokinin in the culture medium was not beneficial to the length of sprouts. Tested cytokinins concentrations caused high oxidative effect, indicating the need to test lower concentrations.

Keywords: Native Fruit. Camu camu. Myrtaceae. Micropropagation. Cytokinin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Caçari	12
3.2 Importância econômica	12
4. Formas de propagação da espécie	14
4.1 Propagação sexuada	14
4.2 Propagação assexuada	14
4.2.1 Micropropagação	16
4.2.2 Estágios de desenvolvimento da micropropagação	17
4.2.3 Desinfestação do material	18
4.2.4 Tipos de explantes	19
4.2.5 Meio de cultura	19
4.2.6 Consistência do meio de cultura	21
4.2.7 Elementos minerais no meio de cultura	22
4.2.8 Ferro e suas características	24
4.3 Fertilizante comercial Maxsol [®] MX-21	25
4.4 Reguladores de crescimento	25
5. Trabalhos realizados com o caçari no cultivo <i>in vitro</i>	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
6. CAPÍTULO I: EFEITO DO FERTILIZANTE COMERCIAL MAXSOL [®] E DAS CONCENTRAÇÕES DE FERRO NA REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CAÇARI	37
RESUMO	37
ABSTRACT	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

7. CAPÍTULO 2: EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CITOCININAS NA PROLIFERAÇÃO DE BROTOS DE CAÇARI	56
RESUMO.....	56
ABSTRACT	56
INTRODUÇÃO	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

O caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) é uma das fruteiras tipicamente amazônicas, que cresce na margem dos rios e lagos de toda a bacia Amazônica (YUYAMA, 2011, Chagas et al., 2015), de arbusto lenhoso pertencente à família Myrtaceae (VIÉGAS et al., 2004).

A propagação dessa espécie geralmente é feita por sementes. Porém, a propagação sexuada traz consigo problemas de variabilidade genética que, embora seja importante em programas de melhoramento, não é apropriada para a multiplicação de clones selecionados. Por isso, para a produção visando fins comerciais e em maior escala, é necessário aproveitar certas características úteis como o alto rendimento, os elevados níveis de ácido ascórbico e o maior tamanho do fruto, dentre outras características (OLIVA et al., 2005). Dessa forma, a propagação vegetativa torna-se imprescindível.

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos que possui diversas importâncias quanto a manipulação e propagação de plantas de forma contínua, independentemente da época do ano, de forma mais rápida que os métodos convencionais de propagação vegetativa e, ainda, inclui a possibilidade de obtenção e manutenção de estoques de plantas livres de doenças e o intercâmbio de germoplasma (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990; THORPE; HARRY; KUMAR, 1991). Por estas razões, a micropropagação tem sido uma ferramenta útil para a obtenção de mudas mais uniformes em larga escala, em tempo e espaço físico reduzido (RIBAS et al., 2005).

Um dos grandes obstáculos da micropropagação é o ajuste de um protocolo com um meio de cultivo que supra as necessidades da planta tornando-a propícia à multiplicação em larga escala. Cada espécie de planta requer um meio de cultura específico para ter um desenvolvimento considerado normal, por isso, torna-se fundamental o estudo da composição mineral do meio de cultivo.

Outro fator considerado importante é a concentração de alguns micronutrientes de forma inadequada no meio de cultura. Esse fato pode contribuir para o aumento do nível de oxidação e aumentar o índice de perdas na fase de regeneração. Um dos micronutrientes que mais contribui para esse processo é o ferro. O excesso de Fe^{2+} livre nos sistemas vegetais acelera a

oxidação, mediada pelo O_2 e H_2O_2 , de importantes metabólitos como ascorbato, glutationa e nucleotídeos (BACANA et al., 1998; KAMPFENKEL et al., 1995). Também estimula a produção de etileno (PENG; YAMAUCH, 1993) e inibe a atividade de H^+ -ATPase da membrana plasmática (SANTOS et al., 2001).

Outro fator importante para a multiplicação *in vitro*, são as citocininas. Elas estimulam a produção de maior números e comprimentos dos brotos até determinada concentração, a partir da qual, ocorre diminuição da altura em virtude de possível efeito fitotóxico da citocinina (REIS et al., 2008). Por isso, o balanço desse hormônio deve ser determinado para cada espécie.

A consistência do meio de cultura é outro fator que deve ser determinado para obter maior número possível de brotos. O uso de meio de cultura com consistência sólida é o mais utilizado no cultivo *in vitro*. Contudo, para algumas espécies, o uso de meio líquido é essencial. Uma das vantagens do meio de cultivo sólido é servir como suporte para o explante, diferente do líquido que é necessário providenciar suporte. Por outro lado, o meio sólido pode interferir no processo de absorção e translocação de íons, diferente do líquido, que possibilita maior difusão de nutrientes e, geralmente, maior regeneração de brotos.

Para o caçari, os trabalhos mais recentes envolvendo a micropropagação da espécie mostram resultados promissores quanto a regeneração *in vitro*. Assim, apesar de ser uma espécie que ainda se encontra em processo de domesticação, apresenta característica lenhosa e elevada oxidação, os estudos indicam bom desenvolvimento no ambiente *in vitro*. Contudo, para se obter um protocolo viável para a regeneração e multiplicação do caçari, ainda são necessários a realização de diversos estudos visando conhecer o meio e sua consistência mais adequada, concentração de macro e micronutrientes e reguladores de crescimento para que se obtenha elevadas taxas de brotações, indução de desenvolvimento e/ou de alongamento das brotações e a indução de enraizamento *in vitro* das brotações.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da consistência do meio de cultura, concentrações de fertilizante comercial, Fe e citocinina na regeneração e multiplicação *in vitro* caçari.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da consistência do meio de cultura e diferentes concentrações de fertilizante comercial e Fe na regeneração *in vitro* de caçari.
- Avaliar o efeito das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina e thidiazuron (TDZ) na multiplicação de segmentos caulinares de caçari.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Caçari

A Floresta Amazônia devido a sua grande biodiversidade é conhecida mundialmente (YUYAMA; AGUIAR; YUYAMA, 2002). Aliada a isso, está a grande variedade de espécies frutíferas nativas como o açaí do Pará e açaí do Amazonas, pupunheira, caçari, araçá-boi, abiu, cupuaçu e outras. São espécies que possuem um alto potencial agrônômico e econômico, devido principalmente ao alto teor nutritivo e funcionalidade de seus frutos. Dentre essas as diversas frutíferas, o fruto que está conquistando o mercado internacional como do Japão e o Estados Unidos é o caçari (YUYAMA; AGUIAR; YUYAMA, 2002).

O caçari ou caçari planta tipicamente amazônica, pertencente à família Myrtaceae de arbusto lenhoso, encontrado espontaneamente às margens dos rios e dos lagos, às vezes quando na estação chuvosa, encontra-se parcial ou totalmente submerso (VIÉGAS et al., 2004).

3.2 Importância econômica

O potencial econômico do caçari está no seu fruto, pois é a maior fonte natural de vitamina C (ANDRADE et al., 1995; YUYAMA, 2002). Sendo assim, apresenta potencial extraordinário para indústria de alimentos utilizados no preparo de sucos, picolé, bolos, sorvete e na indústria farmacológica utilizado em cosméticos e pastilhas de vitamina C (YUYAMA; VALENTE, 2011).

O fruto de caçari por possuir concentrações variadas e significativas de nutrientes, como minerais, vitaminas e compostos bioativos, tem grande potencial para indústria de alimentos, cosméticos e fármacos. Possui elevadas concentrações vitamina C, que varia de 845 a 6.100 mg em 100 g de polpa integral (YUYAMA 2002, ESASHIKA; OLIVEIRA; MOREIRA, 2011, YUYAMA et al. 2011), expressivos teores de carotenoides (Luteína e β caroteno) (AZEVEDO; RODRIGUEZ, 2004), alguns minerais como potássio, cálcio, magnésio e sódio (JUSTI et al., 2000) e compostos fenólicos como o ácido elágico e as antocianinas e flavonoides não antociônicos, quercetina e rutina (ZANATTA et al., 2005). Portanto o fruto serve como matéria prima para uma gama de variedades de produtos desde bebidas a creme facial e está conquistado o mercado nacional (YUYAMA; VALENTE, 2011).

A produção de caçari está concentrada na Amazônia peruana, sendo o Peru o maior exportador, responsável por exportar 72 % da fruta em 2011 segundo OTCA (Organização do Tratado de cooperação Amazônica, 2011). Os produtos importados a farinha ou pó de caçari (76%) o extrato (13,4 %) o caçari desnaturado (6,2 %) e os países de destino os Estados Unidos com (56%), Canadá (19%), Reino Unido (5,3%), Japão (4,4%) e França (2,9%) (OTCA, 2011).

No Brasil, na região Amazônica, segundo Yuyama e Valente (2011), já existe a tecnologia de produção e para o processamento da fruta, onde os materiais melhorados com alto teor de ácido ascórbico a produtividade podem chegar a 10 e 23 kg de fruto/planta/safra, e por meio de técnicas de clonagem podem multiplicar-se vegetativamente. No interior de São Paulo, alguns produtores, já iniciaram a produção de camu- camu, principalmente na região do Vale do Ribeira, com o intuito de substituir lavouras de banana que não suportam a inundação (YUYAMA; VALENTE, 2011).

A comercialização do camu- camu é feita na maior parte em forma de polpa congelada, em pequena escala e em feiras das regiões produtoras. O fruto é pouco conhecido dentro país, mas é muito procurado pelos japoneses, americanos e europeus, para onde se exporta a polpa em contêineres refrigerados dentro de tambores de 200 litros (YUYAMA, 2011a).

Existem poucas referências sobre exportações brasileiras de camu-camu, pois é um mercado incipiente, embora crescente. Em 2006 o Governo do Estado do Amazonas negociou por meio da Agência de Agronegócios do Amazonas, a exportação para o mercado japonês de 8,5 toneladas de polpa de camu- camu, processadas pela empresa Cupuama da Amazônia (SEPROR, 2006). Segundo Pinedo (2007), se houvesse incentivo à produção de camu-camu por parte das autoridades, as exportações seriam alavancadas e o Brasil poderia ser principal exportador do fruto no mundo. Para Yuyama (2011b), no Brasil falta ainda aos produtores de camu-camu o reconhecimento de que este fruto é um produto exportável para produzi-lo em larga escala e de forma organizada, e para que isso ocorra é necessário o incentivo financeiro e orientação aos pequenos produtores.

4. FORMAS DE PROPAGAÇÃO DA ESPÉCIE

4.1 Propagação sexuada

O caçarizeiro pode ser propagado de duas maneiras: sexuadamente (propagação seminífera) e assexuadamente (propagação vegetativa) através da enxertia. O método sexuada é comumente mais utilizado para propagação do caçari que se dá por meio de plantas provenientes de matrizes sadias, vigorosas e que apresentam precocidade e alta produção.

A propagação seminífera constitui-se no processo natural de disseminação e perpetuação da maioria das espécies, sendo de grande importância para as plantas nativas ainda pouco exploradas. Suguino, Araújo, Simão (2001); reforçam tal constatação quando cita que o caçari é comumente propagado por sementes. Trabalhos mais antigos afirmavam a dificuldade da germinação ser um processo lento e haver necessidade da eliminação da mucilagem que envolve as sementes para facilitar a germinação (SUGUINO; ARAÚJO; SIMÃO, 2001). Portanto, pesquisas recentes substituem essas informações, mostrando que a porcentagem de germinação de caçari já alcançou 97,6% em menor tempo (19,25 dias), e maior índice de velocidade de germinação durante o período de 6 meses de armazenagem em água (YUYAMA et al., 2011).

4.2 Propagação assexuada

A propagação assexuada é o método que se baseia no uso de estruturas vegetativas da planta para gerar um novo indivíduo geneticamente idêntico. Apesar do caçari possuir sementes viáveis, a falta de uniformidade gerada pela reprodução sexuada não é desejada no estabelecimento de plantios comerciais. Assim, a propagação vegetativa torna-se a técnica mais viável para o processo de formação de mudas da espécie (CHAGAS et al., 2012). Dentre as vantagens da propagação vegetativa, listam-se a manutenção das características genéticas das plantas matrizes, uniformidade, porte reduzido e precocidade de produção (HARTMANN et al., 2002). Por outro lado, possui as desvantagens de transmissão de doenças bacterianas, viróticas e vasculares entre o material vegetal utilizado, além de limitações pela falta de genótipos superiores com características agrônomicas e econômicas desejáveis.

Segundo Fachinello; Hoffmann; Nachtigal (2005), a estaquia é o processo de propagação vegetativa no qual ocorre a indução ao enraizamento adventício em segmentos destacados da parte aérea ou radicial da planta matriz, que, submetidos a condições favoráveis, originam uma nova planta. Tem-se visto através de pesquisas que o uso de fitorreguladores, em especial, as auxinas, garante aumentar a porcentagem de estacas enraizadas, acelerar a iniciação radicular, aumentar o número e a qualidade das raízes formadas, uniformizar o enraizamento, além de estimular a síntese de etileno (HARTMANN et al., 2002) e de favorecer o balanço hormonal (FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005).

Na cultura de caçari, a propagação vegetativa por estaquia pode ser considerada como de difícil enraizamento, mesmo quando se utilizam indutores desse processo (PICÓN; DELGADO; PADILHA, 1987). Silva et al., (2009) trabalhando com o uso de fitorreguladores, verificaram que a sua utilização aumentou a porcentagem de estacas lenhosas enraizadas, sendo o maior percentual (16%) obtido com 3.000 mg L⁻¹ de ANA. Percebe-se que mesmo havendo o enraizamento das estacas de caçari, ainda assim o percentual obtido (16%) é considerado baixo, para afirmar que esta técnica vegetativa é viável para o camu-camu.

Para favorecer e aumentar o enraizamento de estacas são necessárias técnicas como aplicação de reguladores vegetais e nebulização as estacas de caules semi lenhosos e herbáceos. Estas estacas devem ser provenientes de ramos terminais de maturação recente, de plantas saudáveis e vigorosas, sendo o vigor e a sanidade especialmente importantes como fatores condicionantes da facilidade para o enraizamento das espécies (LORENTE, 1999). Trabalhos recentes, obtiveram até 100% de enraizamento utilizando a técnica de nebulização em estacas herbáceas (ANDRADE, 2014).

A enxertia tem sido outro estudo para a viabilidade de propagação precoce para o camu-camu. Segundo Suguino et al., (2001), os métodos de enxertia mais utilizados em caçari são garfagem de topo com fenda cheia, garfagem no colo, garfagem com fenda lateral e garfagem em inglês simples, devendo os garfos conter cerca de três gemas. Os autores ainda citam que a enxertia deve ser feita quando o cavalo atingir entre 6 a 9 mm de diâmetro, tendo as plantas cerca de 0,70 a 1,00 m de altura e realizada a 30 cm do solo

(SUGUINO et al., 2001). Experimentos utilizando caçari em porta- enxertos da família Myrtaceae (caçari, pitangueira e goiabeira) demonstraram que existe incompatibilidade entre a enxertia com pitangueira e goiabeira, sendo essa incompatibilidade evidenciada por lâminas histológicas. O melhor resultado para propagação vegetativa nas condições testadas foi a garfagem em fenda lateral (SUGUINO et al., 2003).

4.2.1 Micropropagação

A micropropagação compreende várias técnicas que utilizam o cultivo asséptico de partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, foto-período e temperatura como forma de propagação vegetativa (OLIVEIRA et al., 2007). O cultivo *in vitro* tem como base o fenômeno da totipotência das células, ou seja, cada célula possui a capacidade de gerar uma nova planta idêntica a planta- mãe, de modo uniforme, rápido crescimento e matéria prima homogênea, uma vez que é possível obter várias cópias geneticamente idênticas de um mesmo indivíduo, livre de contaminações (GAMBORG; SHYLUCK, 1981; CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Este cultivo *in vitro* é um método viável para propagação de diversas espécies frutíferas, podendo ser utilizado também com as espécies nativas proporcionando a formação de pomares com populações de plantas homogêneas além de acelerar os métodos de propagação convencional (SOUSA et al., 2007).

Dentre essas diversas frutíferas, tem observado que espécies lenhosas ou várias Myrtaceas como o camu-camu tem respondido muito bem à cultura de tecidos, o que leva ao entendimento que é viável o estabelecimento do camu-camu *in vitro*. Entretanto espécies lenhosas como a família das myrtaceas e espécies florestais sofrem limitações na microrpropagação, devido a oxidação ser maximizada pela liberação de compostos fenólicos (SOUZA et al., 2008; BASSAN et al., 2006).

Diante das características tão vantajosas pode considerar que a micropropagação pode ser estudada mais profundamente e alavancar uma técnica viável para a espécie nativa caçari, já que proporciona a multiplicação

rápida em período de tempo e espaço físico reduzido para muitas espécies estudadas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

4.2.2 Estágios de desenvolvimento da micropropagação

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a micropropagação compreende vários estágios: O estágio zero (0) envolve a seleção de plantas matrizes sadias, desenvolvidas em casa de vegetação. A adequação do padrão da planta- mãe vai influenciar diretamente no estabelecimento da cultura *in vitro*, por isso o estágio acaba sendo um dos fatores determinantes na micropropagação. O estágio I refere-se ao estabelecimento da cultura, ou seja, como primeiros passos é feita a seleção dos explantes, desinfestação dos mesmos e cultivo em meio de cultura sob condições assépticas. O estágio II compreende o processo de multiplicação das brotações, cada explante com brotação estabelecida será repicado (excisado do explante matriz) e transferido (subcultivado) para outro meio de cultura. O estágio III busca-se o alongamento, a indução e iniciação radicular e a preparação para a aclimatização, o objetivo deste estágio é a preparação para a conversão das condições heterotróficas para autotróficas. O estágio IV compreende a aclimatização: ocorre a transição da condição heterotrófica para autotrófica. O principal objetivo neste estágio é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da microplanta. O emprego de estufas, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerado para cada situação, tendo em vista que as plantas neste estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e suas folhas tem reduzida capacidade de formação cutículas cerosas protetoras (DEBERGH, 1991).

O sucesso da micropropagação pode ser influenciado por diversos fatores. O genótipo, o tipo e o tamanho do explante, o meio de cultura e as doses de fitorreguladores são os principais controladores da morfogênese *in vitro* (MOREIRA et al., 2001). Outro fator a ser considerado é a adequação gradual das características físicas e fisiológicas das plantas micropropagadas às condições *ex vitro*, pois o ambiente encontrado *in vitro* é consideravelmente diferente das condições presentes em casa de vegetação e no campo, o que promove um alto grau de estresse e pode resultar na morte das plantas durante a aclimatização (HORBACH, et al., 2011).

A aclimatização é limitante para a maior parte das espécies micropropagadas, devido à alta taxa de mortalidade. O sucesso da aclimatização depende, em grande parte, da habilidade da planta de passar da condição heterotrófica para a autotrófica, dos fatores abióticos (umidade relativa, temperatura, luminosidade, substratos, entre outros), dos fatores bióticos (pragas e doenças), e da presença ou capacidade das plantas de produzir novas raízes (PAIVA; OLIVEIRA, 2006).

4.2.3 Desinfestação do material vegetal

Para que os estágios de desenvolvimento atendam ao sucesso, a micropropagação vai depender de inúmeras variáveis, que vão desde a assepsia do material coletado do campo até a aclimatização do material produzido *in vitro*, passando pelos reguladores de crescimento e tipos de explantes utilizados. Para isso, devem ser testadas diversas variáveis, a fim de se encontrar um protocolo com eficiência, praticidade e custos compatíveis (MOURA; MENEZES; LEMOS, 2008). A assepsia do material é uma etapa problemática, pois o desinfetante deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar o mesmo.

Dentre os agentes usados para a desinfestação dos explantes inclui-se o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônico, o peróxido de hidrogênio e, os mais comumente utilizados, o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio, e para aumentar o contato da solução e a ação do hipoclorito com o material vegetal é adicionado a um surfactante como Tween[®], ou um detergente neutro. Geralmente, no início da desinfestação, é utilizado etanol a 70% durante alguns segundos, para eliminar bolhas de ar e parte dos lipídeos, aumentando assim o contato do desinfetante com o explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Trabalho realizado recentemente por Araújo (2012) foi verificado o processo de desinfestação para o caçarizeiro *in vitro*, via segmentos caulinares, o autor verificou a eficiência de utilizar hipoclorito de sódio a 1,5 % por 12 minutos, com adição no meio de cultura de 100 mg.L⁻¹ de antibiótico ampicilina. Desta forma foram obtidos 98% de desinfestação. Já outros agentes utilizados para desinfestação, não mostraram resultados tão satisfatórios, a exemplo o cloreto de mercúrio nas concentrações utilizadas mostrou-se tóxicos

aos explantes. A utilização do dióxido de cloro na concentração de 50% por 30 minutos resultou em 60% de desinfestação dos segmentos caulinares de caçarizeiro.

4.2.4 Tipos de explantes

Na micropropagação são utilizados vários tipos de explantes, a exemplo na literatura pode ser encontrado material vegetal cultivado *in vitro* como segmentos foliares (CERQUEIRA, et al., 2002) e caulinares que carregam gemas simples ou múltiplas (ERIG; SCHUCH, 2005). Também o cultivo de embriões imaturos (PASQUAL, et al., 2002) e embriões zigóticos, assim como o cultivo de raízes isoladas (FREIRE, et al., 2011).

Cada propágulo acima, conhecido como explante é considerado uma forma viável de produzir novas plantas. Estas novas microplantas oriundas do desenvolvimento *in vitro* vão se tornar plantas adultas com características agronomicamente desejáveis, iguais à planta matriz.

4.2.5 Meio de cultura

Um dos fatores importantes para o sucesso do sistema de micropropagação é a conjugação de fatores nutritivos, ambientais e endógenos. No caso específico dos fatores nutritivos, procura-se estudar os componentes do meio de cultura, o qual deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao seu crescimento e desenvolvimento.

Os macronutrientes são fornecidos ao meio de cultura na forma de sais. Cálcio, magnésio e potássio são absorvidos pelas células vegetais como cátions (Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^{+}); nitrogênio na forma de amônio (NH_4^{+}) ou nitrato (NO_3^{-}); fósforo como íons fosfato (HPO_4) e ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$). Os sais usados para fornecer macronutrientes também podem fornecer íons dos elementos sódio (Na^{+}) e cloro (Cl^{-}), sendo que as células vegetais toleram bem altas concentrações dos mesmos (PASQUAL, 2001). Também deve ser adicionado ao meio de cultura reguladores de crescimento, assim como sacarose, e compostos orgânicos, com a presença ou ausência de agente geleificante e carvão ativado.

O carvão ativado tem um grande desempenho no desenvolvimento vegetativo, esse componente tem sido frequentemente adicionado aos meios

de cultura de tecidos vegetais com sucesso (WINKLE; JOHNSON; PULLMAN, 2003), mas de cujos efeitos ainda não se possuem bom entendimento. Espécies lenhosas são beneficiadas com o uso de carvão ativado quando enraizadas *in vitro*, o mesmo tem uma alta capacidade de adsorção elementos tóxicos liberados no meio como fenóis e/ou quinonas produzidas durante a autoclavagem ou liberadas de explantes, cujos tecidos sofreram injúrias. Em desvantagem o carvão ativado também tem a habilidade de adsorção de substâncias promotoras do enraizamento (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2009).

O grande obstáculo da micropropagação é o ajuste de um protocolo com um meio de cultivo que supra as necessidades da planta tornando-a propícia à multiplicação em larga escala. Cada espécie de planta requer um meio de cultura específico para ter um desenvolvimento considerado normal, por isso, torna-se fundamental o estudo da composição em sais minerais, suplementos orgânicos e o balanceamento e tipo de reguladores vegetais para a indução da diferenciação da parte aérea ou raiz das plantas (SANTOS et al., 2005).

Um dos meios mais utilizados em micropropagação *in vitro* nos últimos tempos tem sido o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), otimizado para a cultura de calos em tabaco. No entanto, o meio MS é considerado um meio básico utilizado por diversas culturas. A exemplo, ápices caulinares de mamão foi testado no meio MS com metade da sua concentração de nutrientes, e foi verificado a sua eficiência para o estabelecimento da cultura em *in vitro* (BERTOZZO; MACHADO, 2010).

O meio MS tem demonstrado mais eficiência para a maioria das espécies herbáceas, no entanto, as espécies mais lenhosas frequentemente não se mostram responsivas a composição nutritiva do MS. Desta forma, o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) de composição mais diluída em nutrientes, tem sido o mais apropriado para as espécies lenhosas (MELO et al., 1999). De acordo com Pasqual (2001) citado por Soares et al., (2009), o meio WPM possui 25% das concentrações de íons nitrato e amônia quando comparado ao meio MS, no entanto, apresenta mais potássio e um elevado nível de íons sulfato.

Para se obter um meio de cultura melhorado é necessário que haja uma adequação do suprimento nutricional à espécie que se está trabalhando, como por exemplo, o meio de cultura JADS, foi desenvolvido especificamente para o cultivo *Eucalyptus grandis*, e mostrando sucesso com outras espécies do mesmo gênero (SANTOS et al., 2005; ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006; BRAVO et al., 2008; BORGES, et al., 2011).

4.2.6 Consistência do meio de cultura

A consistência do meio de cultura exerce efeito fundamental na morfogênese e no crescimento das brotações, podendo causar sérios transtornos ao desenvolvimento esperado do explante, se as suas exigências básicas não forem atendidas (KARASAWA et al., 2002). Os meios podem ser líquidos, sólidos ou semissólidos.

Nos trabalhos com cultivo *in vitro*, a maioria utiliza o meio de cultura com adição de agente geleificante, a exemplo o ágar, phytigel e outros componentes, por isso é preciso enfatizar a importância do meio sólido para o crescimento vegetativo. No meio sólido, há diferenças nas quantidades de nutrientes que se estabelecem à medida que os tecidos crescem (SIQUEIRA, et al., 2013). A natureza física do meio sólido possibilita apenas a absorção dos nutrientes pelas partes da planta que estão em contato direto com o meio, refletindo em baixa produção de biomassa (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Porém, sabe-se que a solidez é também uma base de sustentação do explante, um aspecto bom para deixar sempre o explante de pé, mas por outro lado, a dureza do meio dificulta a difusão de nutrientes como já comentado acima.

Os meios de cultura líquidos têm proporcionado bons resultados para a micropropagação de diversas espécies vegetais, como o abacaxi (FEUSER et al., 2001) e a cana-de-açúcar (LORENZO et al., 1998). São rapidamente preparados, mais baratos e proporcionam maior homogeneidade, uma vez que a difusão de nutrientes do meio tem maior facilidade de difundir-se (SIQUEIRA, et al., 2013). Em concordância Etienne e Berthouly (2002) afirmam que meio líquido é mais economicamente viável, pela redução de custos em preparar esse meio, pois não haverá gastos adicionais com componentes geleificantes. O meio líquido também viabiliza uma maior taxa de multiplicação,

diminui problemas de contaminação e possibilita maior automação do processo de produção de mudas *in vitro*.

4.2.7 Elementos minerais no meio de cultura

Os elementos minerais em diferentes concentrações podem surgir efeitos benéfico ou maléfico no vegetal, dependendo da sua concentração. Pensando em plantas lenhosas, como exemplo o caçari, a micropropagação requer estudos mais específicos e desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências do explante. Os meios nutritivos utilizados no cultivo *in vitro* fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Embora o meio MS, considerado o meio mais básico utilizado para uma variedade de espécies e que tem favorecido o crescimento e desenvolvimento das plantas, a utilização de composições mais diluídas tem sido adotada, para algumas espécies lenhosas, como é o caso da videira, gerando melhor resultado no intuito de produzir mudas em larga escala (SILVA; DOAZAN, 1995).

Nos estudos com meio de cultura, várias mudanças já ocorreram na concentração de nutrientes na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro*. Essas modificações visam principalmente à redução ou incremento de alguns componentes, como por exemplo, os micronutrientes, que podem promover melhor crescimento em tecidos vegetais. O boro (B) é um micronutriente que não atende ao critério direto de essencialidade, mas satisfaz o critério indireto. A maior prova da sua essencialidade consiste em que, nos solos das regiões tropicais, é o nutriente que mais promove deficiências nas culturas. O sintoma da deficiência do boro em plantas é a paralisação do crescimento dos meristemas apicais (FAQUIN, 2001).

Resultados significantes com o boro, já foram identificados por Villa et al. (2009). Os pesquisadores avaliando doses de ácido bórico observaram resultados importantes para videira 'Kobber', a dose de 4,0 mg L⁻¹ adicionado ao meio de cultura, proporcionou maior número de folhas e comprimento de raízes. O ferro (Fe) é outro micronutriente, que revela efeito essencial para a organização dos meristemas e crescimento das brotações (HANSEN et al., 2006). Em cultura de tecidos, pode ser adicionado nas formas quelatizada ou

inorgânica, sendo utilizado, no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), a fonte $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

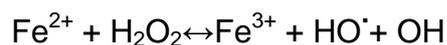
O zinco (Zn) é um elemento também muito importante, pois, é responsável direto pela síntese do triptofano, um precursor da auxina (ácido indolacético), e indireto pela síntese de proteína. A ausência do triptofano estimula a formação de calosidade nos tecidos vegetais (VILLA et al., 2009). A principal função do zinco no metabolismo vegetal é como componente ativador enzimático, e está envolvido no metabolismo de auxinas, em particular no ácido indolacético (AIA) (FAQUIN, 2001). Os sintomas mais típicos da carência do elemento consistem no encurtamento dos internódios e na produção de folhas pequenas cloróticas e lanceoladas (BROADLEY et al., 2007).

A adição de fontes de silício (Si) trazem valores benéficos nas plantas, elevando o conteúdo de hemicelulose e lignina, aumentando assim a rigidez na parede celular, fazendo com que sejam alcançadas elevadas taxas de sobrevivência de plantas na aclimatização (CAMARGO et al., 2007). A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos como aumento da eficiência da capacidade fotossintética, redução da transpiração, crescimento de plantas e aumento da resistência mecânica das células (ZHOU, 1995). Em estudo com morangueiro, Braga et al. (2009) verificaram que a deposição de cera foi observada com a utilização de silicato de sódio (NaSiO_3) evitando com isso a perda de água pela epiderme.

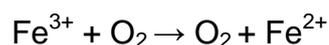
Os macronutrientes são os elementos requeridos em maiores quantidades pelas plantas e desempenham efeitos sensacionais no metabolismo. O nitrogênio (N) é um dos principais macronutrientes, pois constitui aminoácidos, nucleotídeos e coenzimas. Pode ser acrescido aos meios de cultura na forma orgânica ou na forma mineral (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). O potássio (K) atua em várias funções metabólicas das plantas, como ativador de enzimas, respiração e síntese de proteínas, transporte no floema, osmorregulação e balanço de cátion/ânion (REIS; MONNEART, 2001). O fósforo (P) que de acordo com Raven et al., (2007), faz parte de compostos fosfatados (ATP e ADP), ácidos nucleicos, coenzimas e fosfolipídios.

4.2.8 Ferro e suas características

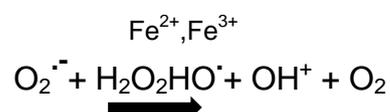
O ferro em condições de excesso pode deslocar o balanço redox celular para um estado pró-oxidante, causando uma diversidade de sintomas morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (BRIAT; LEBRUN, 1999; HELL; STEPHAN, 2003), gerando estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) embora causem danos oxidativos às células, não o fazem com tanta intensidade quanto os chamados radicais hidroxilas (HO^{\cdot}). Ânion superóxido e peróxido de hidrogênio podem reagir com excesso de Fe^{2+} livre na célula, através da reação de Fenton (HELL; STEPHAN, 2003). Numa primeira fase o Fe^{2+} reage com H_2O produzindo radicais hidroxilas:



Nos sistemas biológicos, contudo, o consumo de Fe^{2+} poderia limitar a reação; íons Fe^{3+} , entretanto, podem ser reciclados para a forma ferrosa por reagentes de redução como os superóxidos:



O conjunto destas duas reações, chamado reação de Haber-Weiss, explica a formação de radicais hidroxílicos, na presença de Fe^{2+} :



Os radicais hidroxilas são espécies de oxigênio extremamente reativas, não-seletivas, oxidando quase todas as moléculas encontradas em células vivas, incluindo DNA, proteínas, lipídios, membranas e açúcares (HELL; STEPHAN, 2003). Além disso, o excesso de Fe^{2+} livre nos sistemas vegetais acelera a oxidação, mediada pelo O_2 e H_2O_2 , de importantes metabólitos como ascorbato, glutatona e nucleotídeos (BECANA et al., 1998; KAMPFENKEL et

al., 1995); estimula a produção de etileno (PENG; YAMAUCH, 1993); inibe a atividade de H⁺-ATPase da membrana plasmática (SANTOS et al., 2001); aumenta o teor de citocromo b₆f nos cloroplastos (SUH et al., 2002); reduz o teor de clorofila (NEVES et al., 2009) e, conseqüentemente do crescimento e da produtividade da planta (NEVES et al., 2009).

4.3 Fertilizante comercial Maxsol[®] MX-21

O fertilizante comercial Maxsol[®] MX-21 é utilizado para cultivo hidropônico e é constituído por macro e micronutrientes. Como macro-elemento possui nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S). E como micro-elemento é constituído por boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn). Diante da composição do fertilizante ser tão rico, assim como os meios de cultura protocolados, o uso *in vitro* do fertilizante poderia ser uma alternativa para verificar o comportamento da espécie, já que na pesquisa trabalhos foram realizados com fertilizantes comerciais, como NPK, principalmente na cultura das orquídeas e resultados ótimos foram comprovados nos ensaios.

Além disso, o Maxsol[®] tem demonstrado ser um bom fertilizante para mudas de caçari cultivadas em casa de vegetação na Embrapa Roraima, promovendo rápido crescimento, plantas vigorosas e saudáveis. Aliado a esse comportamento, direcionou-se a pesquisa para se observar o comportamento da espécie sob esse fertilizante no cultivo *in vitro*, na tentativa de se verificar o benefício para a aceleração do processo de regeneração do caçari no ambiente *in vitro*.

Para o caçari, uma espécie que está em processo de domesticação, o Maxsol[®] é uma hipótese de gerar ou não bons resultados, por isso a realização de experimentos com o fertilizante comercial pode vir revelar as hipóteses questionadas.

4.4 Reguladores de crescimento

A adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo tem como objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que foram isolados da planta matriz, bem como estimular o alongamento ou a multiplicação da parte aérea (CALDAS et al., 1998).

A indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por concentração adequada e balanceada de reguladores vegetais adicionadas ao meio, como a citocinina, a qual é muito favorável na fase de multiplicação *in vitro*. As citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações até determinada concentração, a partir da qual, ocorre diminuição da altura em virtude de possível efeito fitotóxico da citocinina (Reis et al., 2008).

As citocininas (6-Benzilaminopurina- BAP; Zeatina- ZEA; Cinetina- CIN; Thidiazuron- TDZ, entre outras) provocam respostas diferenciadas, sendo que BAP induz a formação de grandes números de brotos e a alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (CALDAS et al., 1998), além disso tem se mostrado mais eficaz na multiplicação de diversas espécies lenhosas (ARAGÃO, ALOUFA, COSTA, 2011). ZEA é uma citocinina de ocorrência natural, ao contrário de CIN, que é um regulador sintético. No entanto, estas duas citocininas têm estruturas moleculares similares, e ambas podem estimular a divisão de células vegetais maduras juntamente com uma auxina (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O TDZ promove o crescimento e a rediferenciação de tecidos (MATSUMOTO, 2000). A atividade de citocinina do TDZ foi detectada em bioensaios de calos de *Phaseolus lunatus* L. cv. Kingston, onde ele foi mais ativo que a zeatina. É um composto do grupo das feniluréias e não apresenta o anel purina comum às citocininas tipo adenina, tais como, benzilaminopurina, cinetina ou zeatina, podendo ser a mais potente das difenil uréias que já foram avaliadas para uso em cultura de tecidos vegetais (MOK et al., 1982). Estudos com o TDZ mostram que este é mais ativo biologicamente em baixas concentrações que outras citocininas sintéticas como cinetina e benzilaminopurina, é mais resistente às oxidases, além de ser mais estável (MOK et al., 1987).

5. TRABALHOS REALIZADOS COM O CAÇARI NO CULTIVO *IN VITRO*

Os estudos com a propagação *in vitro* do caçari iniciaram no ano de 2010, os primeiros experimentos foram direcionados para se obter protocolos de desinfestação. Desta forma, vários produtos, concentrações e tempos foram

testados visando o controle de dois fatores limitantes no cultivo *in vitro*, a contaminação (fúngica e bacteriana) e o processo de oxidação. Por ser uma espécie nativa e em processo de domesticação, na literatura há poucos trabalhos com o caçari na parte de propagação *in vitro*, o que tornou ser essa uma pesquisa inicial, permitindo surgir os primeiros resultados do comportamento do caçari no ambiente *in vitro*.

Nos primeiros trabalhos para se obter protocolos de desinfestação foi possível verificar que o hipoclorito de sódio na concentração de 1,5% de cloro ativo, no tempo 12 minutos em contato com o tecido da planta, propiciou 98% de desinfestação em segmentos caulinares. Ainda como resultado, foi possível observar que é possível controlar a contaminação bacteriana no cultivo *in vitro*, adicionando no meio de cultura 100 mg.l⁻¹ do antibiótico ampicilina (ARAÚJO, 2012).

Nessa primeira fase de protocolo não foi levado em consideração o meio de cultura, mas como base científica, foi feita uma revisão de literatura, e foi selecionado como meio de cultura padrão o WPM para iniciar os trabalhos com o caçari. Esse meio é o mais utilizado para espécies lenhosas e mirtáceas em geral (MELO et al., 1999). A relação dessa espécie com o meio WPM nos trabalhos iniciais mostram-se promissoras. Os segmentos caulinares de caçari se regeneram com facilidade.

Posteriormente, novas pesquisas foram desenvolvidas, com o intuito de obter protocolos de regeneração. Assim, diversos experimentos foram desenvolvidos, focando os principais fatores que influenciavam positivamente na fase de regeneração, tais como: meios e concentrações de sais, carvão e antioxidantes, pH e ágar. Os resultados foram promissoras, o meio WPM foi considerado o melhor nessa primeira fase, sem necessidade do uso de antioxidantes, somente de carvão ativado, pH (5,7) e ágar na concentração de 7 g.L⁻¹ (ARAÚJO, 2015).

Apesar do avanço nos trabalhos visando a regeneração da espécie, alguns ajustes ainda são necessários, como por exemplo verificar se o meio WPM pode ser modificado para aumentar a eficiência na fase de regeneração e se a ausência de ferro pode interferir na regeneração e oxidação dos explantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1715-1719, 2006.

ANDRADE, J. K. C. **Propagação vegetativa com o uso de estacas herbáceas de camu-camu (*Myrciaria dúbia* (Kunth) Mc Vaugh) em câmara de subirrigação**. 2014. 64p. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2014.

ANDRADE, J. S. et al. Mudanças na concentração de vitamina C total durante a maturação e amadurecimento de frutas de caçari (*Myrciaria dúbia* (HBK) McVaugh) cultivadas em terras altas na Amazônia Central Brasileira. **Acta Horticulture**, v. 370, n. 1, p 177- 180, 1995.

ANDRADE, R. A; JESUS, N; MARTINS, A. B. G. Embebição e germinação de sementes de caçari. **Maringá**, v. 28, n. 4, p. 499-501, Out./Dez., 2006.

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. A. Efeito do BAP (6-BENZILAMINOPURINA) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, Lavras, v.17, n.3, p. 339-345, 2011.

ARAÚJO, M. C. R. **Organogênese e embriogênese somática somática em caçarizeiro (*Myrciaria dúbia* (Kunth) McVaugh)**. 2015. 80p. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.

ARAUJO, M. C. R. **Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de caçarizeiro**. 2012. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.

AZEVEDO, M. C. H; RODRIGUEZ, A. D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLS-DAD and HPLS-MS . **Journal of food composition and analysis**, v.17, p.385-396.2004.

BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*peltophorum dubium* (spreng.) Taub.). **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BECANA, M. et al. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidante protection, **Plant and Soil**, v.201, n.2, p.137-147, 1998.

BERTOZZO, F; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoeira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, nov./dez., 2010.

BRIAT, J. F. LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **C.R. Académie des Science**, v.322, n.20, p.43-54, 1999.

BORGES, S. R. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.2, p.173-182, 2011.

BRAGA, F. T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p. 128-132, 2009.

BRAVO, C. D. V. et al. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, v.38, n.8, pet al.2181-2185, 2008.

BROADLEY, M. R. *et al.* Tansley review: zinc in plants. **The New Phytologist, Lancaster**, v. 173, p. 677-702, 2007.

BROADLEY, M. et al. Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. **New Phytologist**, Cambridge, v.152, n.1, p. 9-27, 2007.

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

CAMARGO, M. S; KORNDÖRFER, G. H; PEREIRA, H. S. Solubilidade do silício em solos: influência do calcário e ácido silícico aplicado. **Bragantia**, v.66, p.637-647, 2007.

CERQUEIRA, E. S. et al. Indução de calos em erva-de touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.26, n.2, p.301-308, mar./abr., 2002.

CHAGAS, E. A. et al. Intraespecifi variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. v.15, n.4, p. 265-271, 2015.

CHAGAS, E. C. et al. Propagação do caçari (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc vaugh), **Agro@ambiente On-line**, v. 6, p. 67, 2012.

DEBERGH, P. C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 291-300, 1991.

DELGADO, J. P. M.; YUYAMA, K. Comprimento de estaca de camu-camu com ácido indolbutírico para a formação de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, n.32, p.522-526, 2010.

ERIG, A. C; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, v.6, n.1-2, p.91-96, 2005.

ESASHIKA, T.; OLIVEIRA, L. A. de.; MOREIRA, F. W. Teores foliares de nutrientes em plantas de camucamuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) submetidas a adubações orgânica, mineral e foliar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, n.6, p.391-400, 2011.

ETIENNE, H; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Wageningen, v.69, p.215–31, 2002.

FACHINELLO, J. C; HOFFMANN, A; NACHTIGAL, J. C. (Eds). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF, Embrapa Informações Tecnológicas. 221p. 2005.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/ FAEPE, 182 p, 2001.

FEUSER S; NODARI, R. O; GUERRA, M. P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.06-10, 2001.

FREIRE, K. C. S. et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de mangaba oriundas da cultura de embrião (*Hanconia speciosa* Gomes). **Scientia Plena**, v.7, p.110-202, 2011.

GAMBORG, O. L; SHYLUK, J. P. Nutrition, media, and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: THORPE, T.A. (Ed). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic, p.21-44, 1981.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPQ, p. 99-169, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*, v. 219, n.1, p1-14, 1984.

HANSEN, N.C. et al. Iron nutrition in field crops. In: BARTON, L.L.; ABADIA, J. (Ed.). **Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms**. Dordrecht: Springer, p.23-59, 2006.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, p .880, 2002.

HELL, R.; STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, v.216, n4, p.165-167,1995.

HORBACH, M. A. et al. Micropropagação de plântulas de erva- mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.1, p.113-119, jan, 2011.

JUSTI, K. C. et al. Nutritional composition and vitamin c stability in storeD caçari (*Myrciaria dubia*) pulp. **Arch Latinoam Nutr**.50: 405 - 408 2000.

KAMPENKEL, K. VAN MONATAGU, M. V. INZÉ, D. et al. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, v.225, n.5, p. 165-167, 1995.

KARASAWA, M. M. G. et al. Proliferação de capim elefante em diferentes concentrações de regulador de crescimento e consistências do meio de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p.1243-1251, 2002.

LEITZKE, L. N; DAMIANI, C. R; SCHUCH, M. W. Multiplicação e enrizamento *in vitro* de amoreira-preta 'xavante': efeito da concentração de sais, do tipo de

explante e de carvão ativado no meio de cultura. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1959-1966, 2009.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society, **Seattle**, v.30, p.421-427, 1980.

LORENTE, H. J. **Biblioteca de La Agricultura**. Editorial LEXUS. p.130-131, 1999.

LORENZO, J. C. et al. Sugar cane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.200, p. 54-197, 1998.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: BARRUETO CID, LP. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cernagen, p. 83-105, 2000.

MELO, N. F. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.1, p.102-107, jan./mar. 1999.

MOK, M.C. et al. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2, 3-Thiadiazol-5-yl urea (thidiazuron). **Phytochemistry**, Elmsford, v. 21, p. 1509- 1511, 1982.

MOK, M.C., MOK, D.W.S., TURNER, J.E., **et al.** Biológica! And biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Virgínia, v. 22, n. 6, p. 119-1197, 1987.

MOREIRA, D. J. M. et al. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.275-290, 2001.

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C. de; LEMOS, O. F. de. Concentrações de citocininas e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.38, n.1, p.72-76, 2008.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEVES, N. R. et al. Photosynthesis and oxidative stress in the resting plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 407, n.7, p. 3740-3745, 2009.

OLIVA, C; VARGAS, V; LINARES, C. Selección de Plantas Madre promisorias de *Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh), caçari arbustivo, em Ucayali-Perú. **Folia Amazônica**, Iquitos, v. 14. n. 2. p 85-89, 2005.

OLIVEIRA, F. F. M. et al. Micropropagação de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, Mossoró, RN, v.20, n.3, p.152-159, 2007.

PAIVA, R; OLIVEIRA, L. M. de. **Fisiologia e produção vegetal**. Lavras: UFLA, 104p, 2006.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002.

PENG, X. X.; YAMAUCHI, M. Ethylene production in rice bronzing leaves induced by ferrous iron. **Plant and Soil**, v.149, n.1, p. 227-234, 1993.

PICÓN, B. C; DELGADO, DE LA F. F; PADILHA, T. C. **Descritores de caçari**. Lima: INIA, Programa Nacional de Cultivos Tropicales, (INIA. Informe Técnico, 8), 55p. 1987.

PINEDO, R. A. Descoberto o poder nutricional do caçari. **Revista Frutas e Derivados**, Campinas, ano8, n. 8, p. 10, 2007.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7. ed , 2007.

REIS, E.S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v.55, p.160-7, 2008.

REIS, J. R. A; MONNEART, P. H. Exportação de nutrientes nos tubérculos de batata em funções de doses de sulfato de potássio. **Horticultura Brasileira**, Brasília. v.19, p.227-231, 2001.

RIBAS, L. L. F. et al. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.517-524, 2005.

RIVA RUIZ, R. **Tecnología de producción agronômica del caçari**. In: CURSO AMAZONÍA PERUANA, Pucallpa. Memória... Pucallpa: INIA, 13-18p. 1994.

SANTOS, P. S. et al Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1512, n. 3, p. 357-366, 2001.

SANTOS, A. S. A. et al. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith): a influência das citocininas sintéticas na cultura de tecido. **Revista de Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.8, n.35, jul./dez. 2005.

SILVA, A. L; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **Journal International Science of Vigne et Vin**, v. 29, p. 1-9, 1995.

SILVA, F. V. C. et al. A. Propagação vegetativa de caçari por estaquia: efeito de fitorregulador e substratos. **Agro@ambiente**, v. 3, n. 2, p. 92-98, jul-dez, 2009.

SIQUEIRA, D. L. et al. Micropropagação da bananeira 'Maçã', cultivada *in vitro* em diferentes volumes de meio líquido. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.6, p. 745-751, nov/dez, 2013.

SOARES, F. P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA3 e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, Edição Especial, p.1847-1852, 2009.

SOUSA, G. C. et al. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schamburgkia crespa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, RS, v.5, n.1, p.405-407, jul. 2007.

SOUZA, J. A. de. et al. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Revista Ciência Rural**, v.38, n.7, out, 2008.

SUGUINO, E. et al. Propagação vegetativa de caçari por meio de enxertia intergenérica na família Myrtaceae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1477-1482, 2003.

SUGUINO, E; ARAÚJO, P. S. R; SIMÃO, S. **Cultivo do caçari (*Myrciaria dúbia*)**. Piracicaba: série Produtor Rural – nº 16, 2001.

SUH, H. J. et al. Photodynamic effect of iron excesso on photosystem II function in pea plants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n.1, p. 513-518, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THORPE, T. A; HARRY, I. S; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press,. p. 311-336, 1991.

VIÉGAS, I. J. M. *et al.* Efeito da omissão de macronutrientes e boro no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral de plantas de camucamuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 26, n. 2, p. 315-319, 2004.

VILLA, F. et al. Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura dsd1, modificado com fontes de boro e zinco. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 468-472, 2009.

VILLA, F; et al. Meios de cultura de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.2, p.109-117, Mar./Apr. 2010.

WINKLE, S; JOHNSON, S; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, New York, v. 21, p. 1175-1182, 2003.

YUYAMA, K. et al. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 2, p. 1-7, 2011.

YUYAMA, K. et al. **Camu-camu**, Editora CRV, Curitiba, 216 p. 2011.

YUYAMA, K. A cultura de caçari no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 335-390, 2011a.

_____. O rei da vitamina C. **Revista de Divulgação Científica do INPA**, Manaus, n. 7, p. 22-26, 2011b.

YUYAMA, K; AGUIAR, J. P. L; YUYAMA, L. K. O. Caçari: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazonica**, v.32, n.1, p.169-174, 2002.

YUYAMA, K; VALENTE, J. P; (ORGANIZADORES). **CAÇARI *Myrciaria dúbia* (KUNTH) MC VAUGH.** 1.ed. CVR, Curitiba- Brasil: Financiado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT) do INPA, ISBN 978- 85- 8042- 142- 2. 216 p. 2011.

ZANATTA, C. F. et al. Determination of anthocyanins from caçari (*Myrciaria dúbia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.9535, 2005.

ZHOU TS. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v.75, p.605-607, 1995.

CAPÍTULO I: Regeneração *in vitro* de caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) em meio de cultura contendo diferentes concentrações de fertilizante comercial e ferro

RESUMO: Os fertilizantes comerciais são acrescentados aos meios de cultura como fonte de macro e micronutrientes em substituição ou como complemento aos sais normalmente empregados. O ferro (Fe) revela bom efeito para o crescimento das brotações e também pode influenciar na oxidação dos explantes. Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da consistência do meio de cultura e diferentes concentrações de fertilizante comercial e Fe na regeneração *in vitro* de caçari. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima e foi utilizado como explantes segmentos caulinares de caçari provenientes de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação. Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 125 mm e 30 ml de meio de cultura, de acordo com os tratamentos dos seguintes experimentos: 1 - Diferentes doses de Maxsol® (0; 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 g.L⁻¹) em meio de cultura líquido e sólido e; 2 - Diferentes concentrações de ferro (Fe) (0; 25; 50; 75 e; 100%) em meio de cultura líquido e sólido. O meio padrão utilizado para todos os experimentos foi o WPM. Após a inoculação, os explantes permaneceram por 15 dias no escuro e, posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e luminosidade de 32 µmol.m⁻².s⁻¹. Após 90 dias, foram avaliadas as variáveis número de brotos, comprimento dos brotos e porcentagem oxidação. Para ambos os experimentos, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 2 x 5, com cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes. A adição do fertilizante Maxsol®, na dose de 0,75 g.L⁻¹, no meio de cultura promove melhor regeneração de brotos de caçari. O meio de cultura sem adição de ferro, proporciona melhor desempenho para o estabelecimento dos explantes de caçari. O ferro na fase de regeneração dos explantes de caçari não se mostra imprescindível e sua presença não contribui para a diminuição do processo de oxidação.

Palavras-chaves: Fruteira Nativa. Camu camu. Micropropagação. Nutrição.

CHAPTER I: In vitro Regeneration of caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh.) In culture media containing different concentrations of commercial fertilizer and iron.

ABSTRACT: Commercial fertilizers are added to the culture medium as a source of macro and micronutrients in place of or in addition to the salts normally used. Iron (Fe) shows good effect for the growth of shoots and can also influence the oxidation of explants. Therefore, the objective was to evaluate the effect of the consistency of the culture medium and different concentrations of commercial fertilizer and Fe in the *in vitro* regeneration of caçari. The experiment was conducted at the Embrapa Roraima Tissue Culture

Laboratory and was used as explants shoot segments of caçari from mother plants grown in a greenhouse. After sterilization, explants were inoculated into 125 mm test tubes and 30 ml of culture medium, according to the experiments of the following treatments: 1 - Maxsol® Different doses (0, 0.25, 0.50; 1.0 and 1.5 g.L⁻¹) in liquid culture media and solid; 2 - Different concentrations of iron (Fe) (0, 25, 50, and 75, 100%) in liquid and solid culture. The culture medium used for all experiments was WPM. After inoculation, the explants remained for 15 days in the dark and then were transferred to a growth room with 16 hours of photoperiod, temperature 25 ± 2 ° C and light 32µmol.m⁻².s⁻¹. After 90 days, the variable number of shoots, length of shoots and oxidation percentage were evaluated. For both experiments, the experimental design was completely randomized in a factorial 2 x 5, with five replications, each replication consisted of five explants. The addition of fertilizer Maxsol® at a dose of 0.75 g.L⁻¹ in the culture medium promotes better healing of caçari shoots. The medium without addition of iron culture, provides better performance for the establishment of explants caçari. The iron in the regeneration phase of the explants caçari shown not essential and their presence does not contribute to the reduction of the oxidation process.

Keywords: Native Fruit. Camu camu. Micropropagation. Nutrition.

1. INTRODUÇÃO

O caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) é uma das fruteiras tipicamente amazônicas, que cresce na margem dos rios e lagos de toda a bacia Amazônica (ZANATTA; MERCADANTE 2007; DELGADO; YUYAMA 2010; YUYAMA 2011). O fruto dessa espécie tem despertado grande interesse em alguns países pelo seu potencial de produção de ácido ascórbico, que pode atingir mais de 8.000 mg em 100 g de polpa integral (YUYAMA et al., 2011; CHAGAS et al., 2015). O fruto dessa espécie é utilizado na produção de diversos produtos (AKTER et al., 2011; CHAGAS et al., 2012a). Assim, a produção e o beneficiamento de seus frutos tornam-se uma alternativa viável ao desenvolvimento da fruticultura na Amazônia em geral, como fonte de alimentos e meio de agregar valor aos recursos naturais disponíveis na região (PINEDO et al. 2010, WELTER et al. 2011, NEVES et al. 2015). Na Amazônia Setentrional e, mais especificamente no Estado de Roraima, é significativa a ocorrência de populações nativas de camu-camu, as quais estão distribuídas em diversas partes do Estado (CHAGAS et al. 2010, CHAGAS et al., 2015). Essa riqueza e variabilidade genética ainda continuam desconhecidas e pouco estudadas (CHAGAS et al. 2012b).

Com relação ao cultivo *in vitro*, é escasso os estudos encontrados na literatura sobre a micropropagação da espécie. Desta forma, são necessárias a realização de pesquisas, principalmente voltadas para a propagação vegetativa e multiplicação de genótipos que sejam altamente produtivos e resistentes a pragas e doenças para auxiliar os programas de melhoramento e futuramente plantios comerciais em terra-firme (CHAGAS et al., 2012).

Os trabalhos de propagação vegetativa via micropropagação do caçari é recente e vêm sendo estudados desde o ano de 2010 (ARAÚJO, 2012, SILVA, 2012). Essa técnica é de grande importância, pois possibilita a produção de um grande número de plantas assépticas em um curto espaço físico e de tempo. Resultados promissores no cultivo *in vitro* de caçari vêm sendo obtido gradativamente nos últimos anos. Contudo, devido ao caçari possuir elevada variabilidade genética em suas populações nativas e ser uma espécie lenhosa, o que dificulta o processo de diferenciação e crescimento *in vitro*, a micropropagação dessa espécie requer estudos mais específicos para se obter uma metodologia que atendam às exigências da cultura *in vitro*.

Nesse sentido, a fase de regeneração ou também chamada de estabelecimento dos explantes, vem sendo estudada com êxito para o caçari (ARAÚJO et al., 2015). Os autores obtiveram resultados promissores na fase de estabelecimento. Portanto, a obtenção de um protocolo de micropropagação pode demorar um longo tempo dependendo de cada espécie. Desta forma, diversos fatores devem ser estudados para que seja alcançado um protocolo ideal para a espécie estudada. Assim, um dos fatores importantes a serem estudados neste momento e que influencia e determina o rendimento da produtividade *in vitro* é o equilíbrio nutricional do meio de cultura e a sua interação com material genético ou explante.

O Maxsol[®] é um fertilizante comercial muito utilizado em cultivos hidropônicos. Na Embrapa Roraima, esse fertilizante tem sido aplicado na nutrição de mudas de caçari cultivadas em casa de vegetação com sucesso, promovendo rápido crescimento, plantas vigorosas e saudáveis. Aliado a esse comportamento, diversas pesquisas têm comprovado benefício dos fertilizantes adicionados no meio de cultura (FAVETTA; COLOMBO; FARIA, 2014; FREITAS et al., 2014). Assim, o Maxsol[®] tem despertado expectativas boas no cultivo *in vitro* de caçari.

O ferro é um dos micronutrientes presente no meio de cultivo, considerado elemento essencial nas transformações energéticas. Ocorre em proteínas do grupo heme e não-heme, está diretamente envolvido no metabolismo de ácidos nucleicos, atua como ativador enzimático e pode influenciar o desenvolvimento *in vitro* e promover oxidação dos explantes (UTINO et al., 2001). O caçari é uma espécie lenhosa e tende a sofrer o processo oxidativo mais intenso do que outras espécies que não sejam lenhosas. Assim, o Fe pode desencadear esse processo se a concentração desse elemento não estiver balanceada no meio de cultura, pois cada espécie possui distintas exigências nutricionais (FARIA et al., 2004).

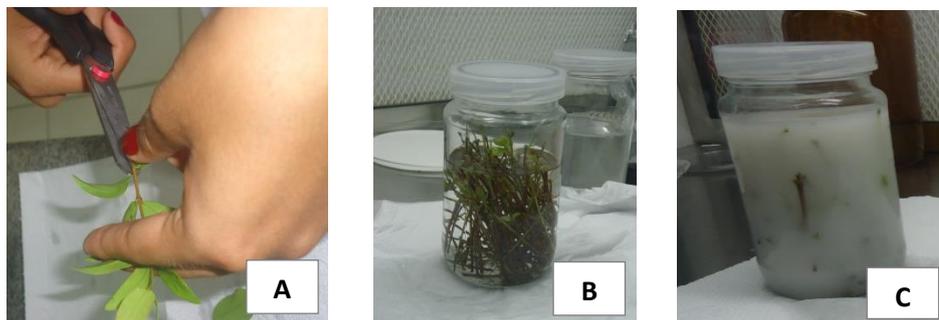
Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito da consistência do meio de cultura e diferentes concentrações de fertilizante comercial e Fe na regeneração *in vitro* de caçari.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima, Boa Vista-RR, Brasil. Para a instalação do experimento foram utilizadas como fonte de explantes plantas matrizes de caçari consideradas de bom estado fitossanitário, mantidas em casa de vegetação, sob cuidados diários de irrigação, nutricional e sanitário. Antes da retirada dos explantes, as plantas foram pulverizadas com fungicida (Nativo® 2ml.L⁻¹) durante 30 dias, com intervalo de um dia entre uma aplicação e outra.

Foram utilizados como fonte de explantes segmentos caulinares com 4 pares de gemas axilares e ± 6 cm de comprimento, oriundos de brotações novas. Após a coleta, os segmentos foram levados ao laboratório de cultura de tecidos e passaram por um processo de pré-limpeza, com a excisão das folhas e o excesso de caule, deixando-o no tamanho ideal de ± 1 a 1,5 cm, com um par de gemas e prontos para serem inoculados após todo processo de desinfestação. Em seguida foram lavados em água corrente, para lixiviação parcial de compostos fenólicos liberados por consequência do corte dos tecidos. Posteriormente, ficaram 24h imersos na solução de fungicida com 1 ml.L⁻¹ de Nativo® e 1 ml.L⁻¹ do bactericida Kasumin®, conforme Figura 1.

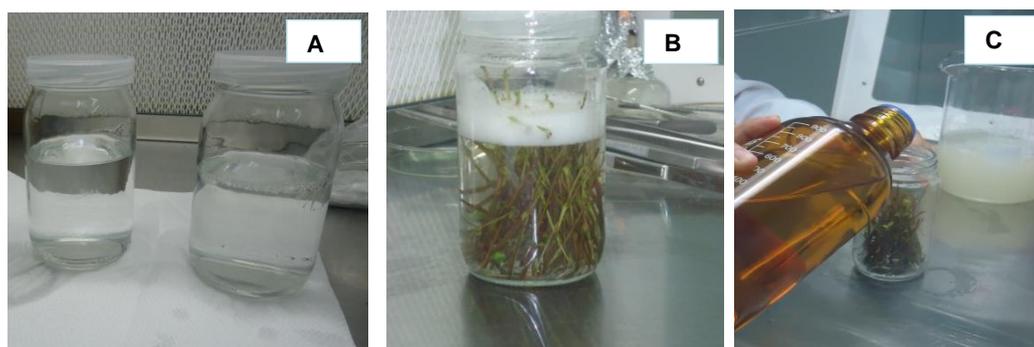
Figura 1. Processo de pré-asepsia (A), explantes após a pré-asepsia (B) e explantes imersos na solução de fungicida e bactericida (C).



Fonte: Ribeiro, 2015.

Posteriormente, os segmentos caulinares foram levados para a sala de inoculação e, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestados passando primeiro por uma solução de álcool 70%, imersos por 1 minuto e, logo após, foram imersos em hipoclorito de sódio a 1,5% por 12 minutos, seguido de tríplice lavagem com água destilada, deionizada e autoclavada (água DDA) para retirada total dos produtos da superfície dos tecidos, conforme Figura 2.

Figura 2–Solução de álcool (A), explantes imersos na solução de hipoclorito de sódio (B) e tríplices enxágue dos explantes.



Fonte: Ribeiro, 2015.

Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 125 mm e 30 ml de meio de cultura WPM, de acordo com os tratamentos dos seguintes experimentos: 1 - Diferentes doses de Maxsol® (0; 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 g.L⁻¹) em meio de cultura líquido e sólido; 2 - Efeito de diferentes concentrações de ferro (Fe) (0; 25; 50; 75 e; 100%) em meio de

cultura líquido e sólido. O meio padrão utilizado para todos os experimentos foi o WPM, acrescido de 4 g.L^{-1} de carvão ativado, solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar e pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes permaneceram por 15 dias no escuro e, posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade de $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após 90 dias, foram avaliadas as variáveis número de brotos, comprimento dos brotos e porcentagem oxidação.

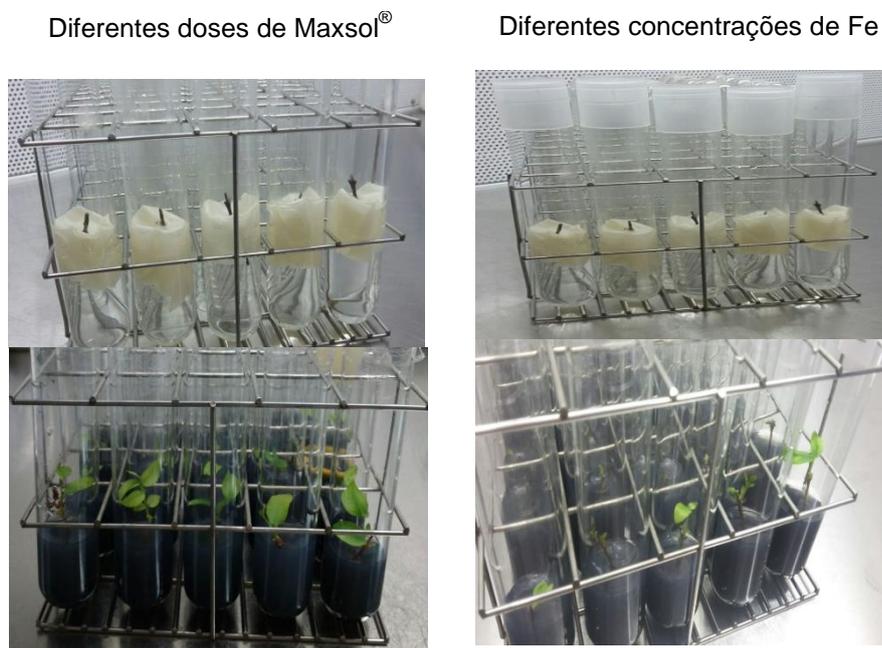
Para ambos os experimentos, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 2×5 , com cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os dados quantitativos à regressão polinomial ($p < 0,05$) com auxílio do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Consistência do meio de cultura e doses de MAXSOL[®] na regeneração *in vitro* de segmentos caulinares de caçari

Verificou-se que não houve interação entre os fatores consistência do meio de cultura e doses de Maxsol[®] testados. Para o primeiro fator, verificou-se ainda que houve 100% de oxidação e morte dos explantes, evidenciado que o meio de cultura líquido não foi adequado para o cultivo *in vitro* de caçari, nas condições do presente experimento. Na Figura 3 é possível observar a diferença dos explantes cultivados em meio de cultura líquido e sólido.

Figura 3 – Aspecto geral dos experimentos com segmentos caulinares de caçari cultivados em meio de cultura líquido (A) e sólido (B) com diferentes doses de Maxsol[®] e ferro.



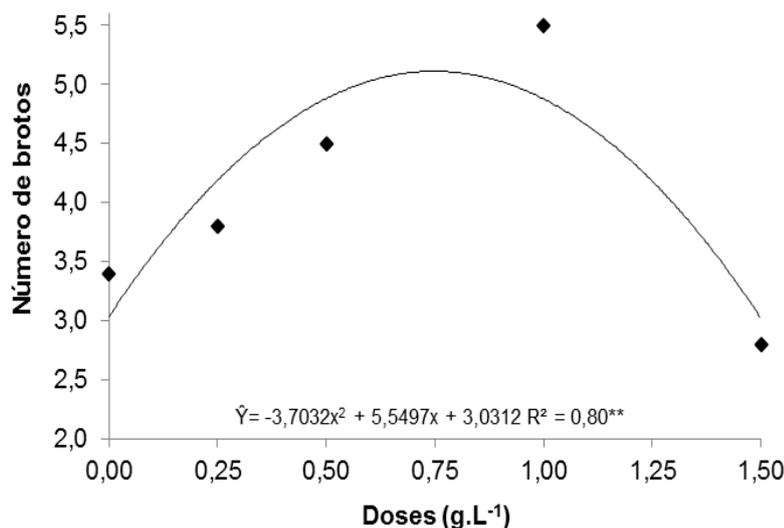
Fonte: Ribeiro, 2015.

Para as doses do fertilizante comercial, foi possível observar que houve diferença significativa somente para número de brotos e comprimento dos brotos

Verificou-se que houve aumento no número de brotos à medida que se elevou a dose de fertilizante testado até $0,75 \text{ g.L}^{-1}$, obtendo-se 5,1 brotos (Figura 4). A partir dessa dose, verificou-se que não houve resposta positiva para o número de brotos. Provavelmente, nessas condições, doses mais elevadas no meio de cultura pode ser prejudicial e causar fitotoxicidade, não proporcionando efeitos positivos no aumento do número de brotos. O resultado obtido no presente trabalho foi superior ao encontrado por Araújo (2015), o qual obteve 2,15 brotos na multiplicação de caçari.

[

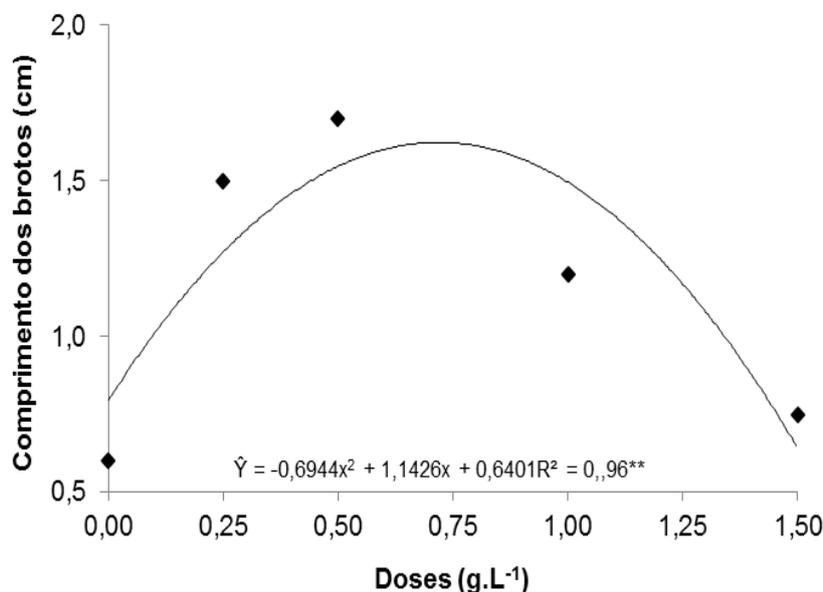
Figura 4 – Número de brotos de segmentos caulinares de caçari cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de fertilizante comercial.



Ainda com relação ao número de brotos, verificou-se que apesar do resultado obtido ser satisfatório (5,1 brotos), essa resposta depende da capacidade responsiva da espécie. Em pessegueiro, por exemplo, Silva et al. (2003) obtiveram média de 14 brotos por ápice caulinar quando cultivado no meio WPM. Essa diferença pode estar relacionada com o fato do caçari ser uma espécie lenhosa, o que em geral, dificulta o seu cultivo *in vitro*. Essa constatação também corrobora com os resultados obtidos por Soares et al. (2007). Trabalhando com multiplicação de explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), espécie lenhosa, os autores obtiveram média de quatro brotos. Resultado semelhante ao obtido para o caçari que também é uma espécie lenhosa.

Para comprimento de brotos foi possível observar comportamento semelhante quanto ao número de brotos. Verificou-se que o comprimento de broto aumentou à medida em que se elevou a dose de Maxsol no meio de cultura até atingir 0,75 g.L⁻¹, obtendo-se 1,8 cm de comprimento. A partir da dose de máxima eficiência não houve resposta positiva para o aumento do comprimento do broto (Figura 5). Araújo (2015), trabalhando com cultivo *in vitro* de caçari, também obteve resultados semelhantes para comprimento de brotos. Assim, pelos resultados, foi possível observar que houve uma boa resposta dos explantes ao cultivo *in vitro* e nutrição com Maxsol.

Figura 5 – Comprimento de brotos provenientes de segmentos caulinares de caçari cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de fertilizante comercial.



A utilização de fertilizantes *in vitro* também tem sido estudada em diversas espécies. Para híbridos de orquídea (*Cattleya walkeriana* x *C. loddigesii*), a utilização dos fertilizantes Peters[®] proporcionou ótimos resultados para o desenvolvimento dos brotos (RODRIGUES et al., 2012). Resultados semelhantes também foi verificado com o uso fertilizantes comerciais Hyponex[®] e OKF (ALAM et al., 2002). No caso do caçari, também foi observado resultados positivos quanto ao uso de Maxsol até 0,75 g.L⁻¹. Rodrigues et al. (2012) também trabalhando com orquídea, observou maior comprimento do broto em resposta ao aumento da dose de fertilizante (2,6 cm). De forma semelhante, bons resultados também foram obtidos por Moraes et al. (2009), ao avaliarem o crescimento de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. em meio de cultura MS (50% da concentração original) contendo os fertilizantes: Hyponex (NPK 6,5-6-19) e Kristalon laranja (NPK 6-12-36).

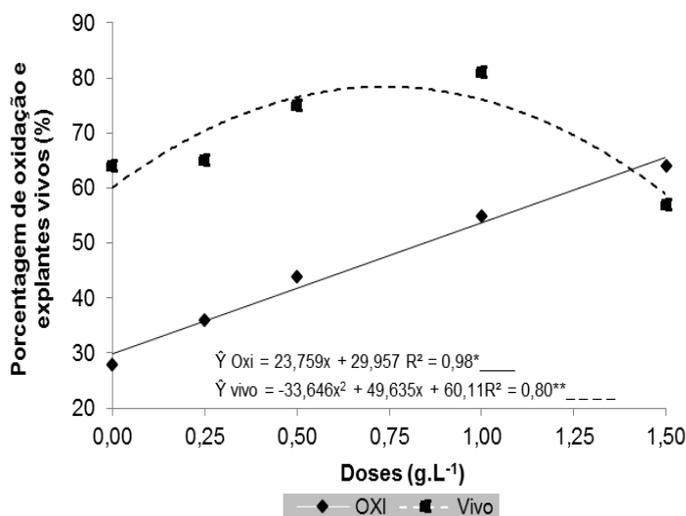
Para o caçari, o comprimento máximo obtido foi de 1,8 cm, resultado semelhante ao encontrado para figueira quando cultivada em meio WPM, onde obtiveram-se comprimento máximo de brotos de 2,8 cm (FERREIRA; PASQUAL, 2008).

Outra importante informação é a relação entre o número de brotos e o seu comprimento. Soares et al. (2007) mencionam que quanto maior o número de brotos, menor tende a ser o seu comprimento. Desta forma, é mais vantajoso que essa exista uma boa relação entre número de brotos e comprimento. Trabalhos realizados por Araújo (2015) verificou-se que o número de brotos (2,15) encontrado, foi menor em relação a este trabalho, porém, os comprimentos dos brotos apresentaram-se em tamanho semelhante a outros estudos mencionados acima. Assim, esse resultado corrobora com os de Araújo (2015), onde menciona que segmentos caulinares de caçari cultivados somente no meio WPM proporcionou um crescimento maior dos brotos. Além disso, Soares et al. (2007) também mencionam que é vantajoso obter brotos normais e alongados (maiores do que 1,5 cm) porque esses tendem a enraizarem mais facilmente do que brotos curtos (SOARES et al., 2007).

Verificou-se o que a porcentagem de oxidação aumentou, de acordo que se elevou as doses do fertilizante, atingindo 64% de oxidação. Esse resultado permite dizer que as doses crescentes do fertilizante, causaram um efeito fitotóxico sobre o explante.

Para porcentagem de explantes vivos houve um crescente percentual (75%) até a dose de 0,75 g.L⁻¹, a partir dessa dose verificou-se uma diminuição desse percentual. (Figura 7).

Figura 7 – Porcentagem de explantes oxidados e vivos de caçari cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de fertilizante comercial.



Espécie de orquídea cultivada em diferentes fertilizantes (Hiponex[®] e Kristalon laranja[®]), apresentaram resultados diferentes quando relacionado com o caçari. Ambos fertilizantes, as doses não interfeririam na porcentagem de sobrevivência, havendo 100% de explantes vivos (CUNHA et al., 2011), comparando com os resultados do caçari, as doses crescentes do fertilizante Maxsol[®] elevou bastante o percentual de oxidação, obtendo-se um ótimo índice de sobrevivência, apenas até certa dose.

Comparando apenas o tratamento testemunha desse trabalho (WPM sem fertilizante) com outros na literatura, verificou-se também que em segmentos nodais de *Eugenia involucrata*, o tratamento testemunha apresentou o percentual mais baixo de oxidação (GOLLE et al., 2012).

O meio de cultura suplementado com fertilizante tem indicado bons resultados para a maioria das orquídeas (PEDROSO DE MORAES et al., 2009; JU; SCHNITZER; FARIA, 2012; UNEMOTO et al., 2007), já para outras espécies, principalmente lenhosas como o caçari, praticamente não tem trabalhos publicados, por isso a dificuldade de comparar resultados, principalmente discutir dados com porcentagem de explantes oxidados e vivos. Os trabalhos com uso de fertilizantes são voltados mais para as espécies ornamentais e a maioria dos autores não analisam as variáveis de porcentagem, pois a espécie não sofre intensamente o processo de oxidação quando comparado com as espécies lenhosas.

Experimento 2: Consistência do meio de cultura e concentrações de Ferro na regeneração *in vitro* de segmentos caulinares de caçari

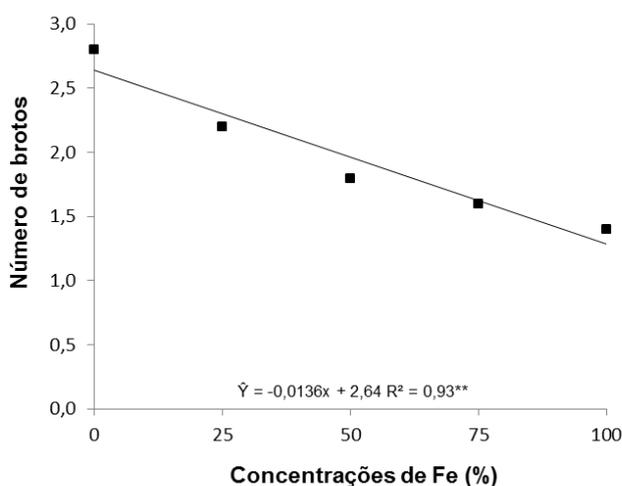
Verificou-se que não houve interação entre os fatores consistência do meio de cultura e concentrações de Fe testados. Para o primeiro fator, semelhante ao que ocorreu no primeiro experimento, verificou-se que houve 100% de oxidação e morte dos explantes, constatando novamente que nas condições do presente experimento, o meio de cultura líquido não foi adequado para o cultivo *in vitro* de caçari, nas condições do presente experimento.

Para concentração de Fe testado, observou-se que diferença estatística para número de brotos e comprimento de brotos e porcentagem de

explantes vivos. Já para porcentagem de oxidação, não houve diferença significativa.

Para a variável número de brotos, verificou-se que a concentração de Fe no meio de cultura original não foi suficiente para garantir o ótimo crescimento e desenvolvimento do explante *in vitro*. Houve um decréscimo linear no número de brotações à medida em que se aumentou as doses de Fe no meio de cultura. Maior número de broto foi obtido na concentração normal do meio WPM, a qual proporcionou 2,8 brotações por explante de segmentos caulinares de caçari (Figura 8).

Figura 8 – Número de brotos de segmentos caulinares de caçari cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de Ferro.

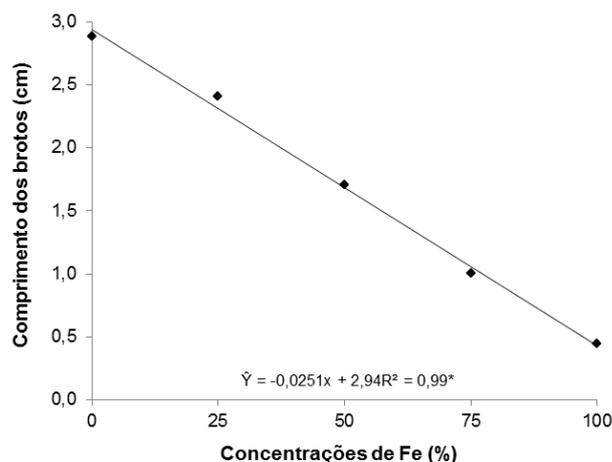


Schwalbert et al. (2014) estudando a espécie *Desmodium incanum* com metade da concentração de ferro do meio de cultura MS, observaram bons resultados para número de brotações (1,5 brotos). Este resultado é semelhante aos resultados obtidos para o caçari, no qual o acréscimo de ferro na fase de regeneração *in vitro* não implicou na melhoria do número de brotos do caçari. Vários trabalhos com redução de sais e sais específicos do meio de cultura vêm sendo estudados, pois cada espécie requer um balanço nutricional *in vitro* específico, além de que alguns sais ao serem reduzidos, conseqüentemente também há a redução de problemas com oxidação (UTINO; CARNEIRO; CHEVES, 2001).

Para algumas espécies bem conhecidas, a exemplo as orquídeas, a redução de sais do meio de cultura MS tem sido benéfica para o seu desenvolvimento no ambiente *in vitro* (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009, CORDEIRO et al., 2011; CUNHA et al., 2011; DEZAN et al., 2012; RODRUGUES et al., 2013). Esse efeito positivo foi observado no presente trabalho ao retirar o excesso de sais de ferro no meio de cultivo, sendo um bom indicativo de estudo

Para comprimento das brotações observou-se um comportamento semelhante ao número de brotos. Houve maior crescimento na ausência de ferro. Com o aumento das concentrações de Fe no meio de cultura, houve redução do comprimento dos brotos (Figura 9).

Figura 9 - Comprimento dos brotos provenientes de segmentos caulinares de caçari cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de Ferro.



Ferreira (2014), trabalhando com segmentos nodais de tamarindo, observou que ao reduzir todos os sais do meio de cultura WPM em diferentes concentrações não promoveu nenhuma diferença significativa para o comprimento dos brotos. Esse resultado é diferente do encontrado para o caçari, onde as menores concentrações e até mesmo a ausência de sais de ferro no meio WPM permitiram maior incremento para o crescimento dos brotos.

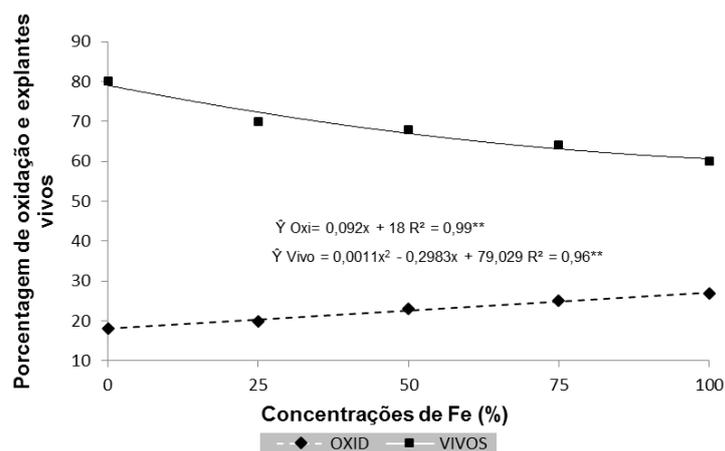
Já para a catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*Tul. – Fabaceae) e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*Mart. – Fabaceae), verificou-se que as concentrações de sais podem implicar no desenvolvimento dessas duas

espécies. A elevação do conteúdo de sais do meio WPM (concentração 100% de sais) proporcionou melhor crescimento e estabelecimento *in vitro*. Esses resultados para as distintas espécies, só explicam que essas variações são respostas do comportamento diferente de cada uma e que o balanço de nutrientes presentes no meio de cultivo é específico para cada ser vivo vegetal (SCHWALBERT et al., 2014).

Também verificou-se que houve aumento de explantes oxidados a medida que se elevou as concentrações de ferro, atingindo 20% de oxidação. Mesmo havendo um efeito linear de oxidação diante das concentrações de ferro, o percentual pode ser considerado baixo.

Quanto a porcentagem de explantes vivos, houve diminuição dos indivíduos regenerados à medida em que se elevou as concentrações de ferro, atingindo 64% de explantes vivos na concentração de 100% de ferro. Mesmo com a elevação das concentrações de ferro, observou-se que a diminuição da porcentagem dos explantes vivos foi baixa, corroborando também com o baixo percentual de oxidação obtido nesse trabalho (Figura 10).

Figura 10 – Porcentagem de oxidação e explantes vivos de caçari cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de Ferro.



A diferença entre os explantes regenerados e oxidados podem ser melhor visualizados através da Figura 11.

Figura 11 – Diferença entre os explantes vivos (A) e oxidados (B) de caçari cultivados *in vitro* em função das diferentes concentrações de ferro.



Fonte: Ribeiro, 2015.

Como observado na Figura 10, a oxidação apresentou baixo percentual, o que tornou possível obter ótima permanência de explantes vivos. Tal resultado demonstrou que as concentrações de ferro não afetaram o desenvolvimento dos explantes de caçari *in vitro*, evidenciando pouca quantidade de explantes oxidados.

Mesmo considerando as variáveis anteriores, as quais demonstraram que a ausência de ferro não implicou na formação de novos indivíduos e nem na elevação do nível de oxidação, ainda assim, alguns autores não recomendam a retirada desse micronutriente na fase de regeneração, pois é essencial para o crescimento dos explantes em todo o ciclo da planta (UTINO; CARNEIRO; CHAVES, 2001; JUCOSKI, 2011).

Diferentes resultados foram encontrados para tamarindo, onde observou-se que a elevação das concentrações de sais não contribuiu para o nível de oxidação, havendo pouca oxidação e a formação de calos na base dos explantes (FERREIRA, 2014).

Em estudos com banana, os autores observaram também resultados semelhantes, onde as concentrações de ferro proporcionaram um efeito linear de oxidação, recebendo nota de grau de oxidação de 3,14 (UTINO; CARNEIRO; CHAVES, 2001). O excesso de Fe livre nos sistemas vegetais acelera a oxidação, mediada pelo oxigênio e o peróxido de hidrogênio, reduz o teor de clorofila diminuindo a taxa fotossintética, providencia o aparecimento de manchas cloróticas e marrons, e conseqüentemente a redução do crescimento e desenvolvimento da planta (NEVES et al., 2009).

4. CONCLUSÕES

- A adição do fertilizante Maxsol[®], na dose de 0,75 g.L⁻¹, no meio de cultura promove melhor regeneração de brotos de caçari.
- O meio de cultura sem adição de ferro, proporciona melhor desempenho para o estabelecimento dos explantes de caçari.
- O ferro na fase de regeneração dos explantes de caçari não se mostra imprescindível e sua presença não contribui para a diminuição do processo de oxidação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTER, M. S. et al. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, n.44, p.1728-1732, 2011.
- ALAM, M. K. et al. *In vitro* seed propagation of dendrobium (*Dendrobium transparens*) orchid as influenced by different media. **Biotechnology**, v.1:p. 111-115, 2002.
- ARAÚJO, M. C. R. **Organogênese e embriogênese somática somática em caçarizeiro (*Myrciaria dúbia* (Kunth) McVaugh)**. 2015. 80p. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.
- ARAUJO, M. C. R. **Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de caçarizeiro**. 2012. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.
- CHAGAS, E. A. et al. Distribuição Geográfica de Populações Nativas de Camu-camu no Estado de Roraima. In: Guerra AM (Org.) Anais do 21^o Congresso Brasileiro de Fruticultura, Natal, RN, CD Rom. 2010.
- CHAGAS, E. A. et al. Intraespecifi variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. v.15, n.4, p. 265-271, 2015.
- CHAGAS, E. C. et al. Propagação do caçari (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc vaugh), **Agro@mbiente On-line**, v. 6, p. 67, 2012.

COLOMBO, R. C.; FAVETTA, V.; FARIA, R. T. de. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *halaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.6, p. 873-876, 2012.

CORDEIRO, G.M. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana*X *Laelia purpurata* Lindley) em diferentes meios de cultura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.18, pp. 22-28, 2011.

CUNHA, T. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v.7, pp.1-5, 2011.

DELGADO, J. P. M.; YUYAMA, K. Comprimento de estaca de camu-camu com ácido indolbutírico para a formação de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 522-526, 2010.

DEZAN, L.F. et al. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. **Idesia**, v.30, n.2, 2012.

FARIA, R.T. et al. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.3, p.489-492, 2004.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. et al. Otimização de protocolo para micropropagação da figueira "Roxo de Valinhos". **Ciência Rural**, v.38, n.4, 2008.

FREITAS, E. M. de. et al. Propagação *in vitro* de *cattleya intermedia* graham ex Hook. (orchidaceae) em diferentes meios de cultura. **Caderno pedagógico, Lajeado**, v. 11, n. 1, p. 30-41, 2014.

GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

JU, S. M.; SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, n.1, v.40, p.28-34, 2012.

JUCOSKI, G. O. **Toxicidade de ferro e metabolismo antioxidativo em *Eugenia uniflora* L.** 2011. 93p. Tese (Doutorado em Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MORAES, C. P. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* a. Richard (orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaio e Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. v.13, n. 2, p. 57-65, 2009.

NEVES, L. C. et al. Determining harvest time of camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) using measuring pre-harvest attributes. **Scientia Horticulturae**, v.186, n. 1 15-23, 2015.

NEVES; N. R. et al. Photosynthesis and oxidative stress in the resting plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 9, p. 3740-3745, 2009.

PEDROSO DE MORAES, C. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, p. 67-69, 2009.

PINEDO P. M. et al **Camu-camu (*Myrciaria dubia*, Myrtaceae): Aportes para aprovechamiento sostenible en la Amazonía peruana.** Editora TALENTO G SAC, Lima-Perú, 137p, 2010.

RIBEIRO, S. I.; MOTA, M. G. C.; CORRÊA, M. L. P. Recomendações para o cultivo do camucamuzeiro no Estado do Pará. **Circular Técnica**, Embrapa, Belém (PA), 2002.

RODRIGUES, D. T. et al. Concentrações e composições químicas do meio nutritivo para o cultivo *in vitro* de orquídea. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 59, n.1, p. 1-8, 2012.

RODRIGUES, F.A. et al. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na mutiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Bioscience Journal**, v.29, n.1, p.77–82, 2013.

SCHWALBERT, R. et al. Concentrações de sais do meio ms no cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum*. **Enciclopédia biosfera, Centro científico conhecer** - Goiânia, v.10, n.18; p. 1010, 2014.

SILVA, A. L. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 297-300, 2003.

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

TEIXEIRA, A.S.; CHÁVES, L.S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). **Acta Amazonica**. v.34, n.1, p. 89-96, 2004.

UNEMOTO, L.K. et al. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, p. 267-269, 2007.

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*) *in vitro*. I. Concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, SP, v. 23, n. 2, p. 225-229, 2001.

YUYAMA, K. et al. **Camu-camu**, Editora CRV, Curitiba, 216 p. 2011

YUYAMA, K. A cultura de caçari no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 335-390, 2011

WELTER, M. K. et al. Efeito da aplicação de pó de basalto no desenvolvimento inicial de mudas de camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n. 4, p. 922-931, 2011.

ZANATTA, C.; MERCADANTE, A. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v.10, n.1, p. 1526-1532, 2007.

CAPÍTULO 2: Multiplicação *in vitro* de caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) sob diferentes concentrações de citocininas

RESUMO: O caçari é uma espécie nativa da Amazônia e encontra-se em processo de domesticação. Recentemente, alguns estudos têm sido realizados visando a proliferação *in vitro* da espécie visando a obtenção de protocolos para a multiplicação de clones superiores e outros estudos importantes em programas de melhoramento genético. As citocininas são substâncias que causam divisão celular nas plantas e têm sido bastante utilizadas em estudos *in vitro*, sendo as mais importantes BAP (6-benzilaminopurina), TDZ (Thiudzuron) e cinetina. Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de caçari. O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Roraima. Foram utilizados segmentos caulinares de caçari provenientes de brotações novas de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação. Após obtenção, foram desinfestados em câmara de fluxo laminar utilizando álcool 70%, por 1 min. e hipoclorito de sódio 1,5 % por 12 min. e, em seguida, foram inoculados meio de cultura WPM contendo diferentes citocininas (BAP, TDZ e cinetina), combinados com suas concentrações (0; 2; 4; 8 e 10 mg.L⁻¹). O experimento foi instalado utilizando-se delineamento experimental inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 3 x 5, com cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes. Após inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e luminosidade de 32 μmol.m⁻².s⁻¹. Após 90 dias, foram avaliadas as variáveis número de brotos, comprimento dos brotos e porcentagem oxidação. As análises foram realizadas pelo programa computacional SISVAR. Verificou-se que maior proliferação de brotos de caçari é obtida com BAP na concentração de 4,9 mg.L⁻¹. A adição de citocinina no meio de cultura não foi benéfica para o comprimento de brotos. As concentrações de citocininas testadas causaram efeito oxidativo elevado, indicando a necessidade de testar concentrações mais baixas.

Palavras-chaves: Camu-camu. Micropropagação. BAP. TDZ. Cinetina.

CHAPTER 2: *In vitro* multiplication of caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh.) with different concentrations of cytokinins.

ABSTRACT: The caçari is a native species to the Amazon and is in the process of domestication. Recently, some studies have been conducted to the *in vitro* proliferation of the species in order to obtain protocols for the multiplication of superior clones and other important studies in breeding programs. Cytokinins are substances that cause cell division in plants and have been widely used in *in vitro* studies, the most important BAP (6-benzylaminopurine), TDZ (Thiudzuron) and kinetin. In this sense, the objective was to evaluate the effect

of different concentrations of cytokinin on *in vitro* multiplication of caçari. The experiment was conducted in tissue culture laboratory of the Embrapa Roraima. stem segments of caçari from mother plants grown in a greenhouse were used. After obtaining, was realized sterilization in a laminar flow hood using 70% alcohol for 1 min. and 1.5% sodium hypochlorite for 12 min. and then they were inoculated in WPM media containing different cytokinins (BAP, kinetin and TDZ), combined in different concentrations (0, 2, 4, 8 and 10mg.L⁻¹). The experiment was conducted using a completely randomized design in a factorial 3 x 5, with five repetitions each repetition consists of five explants. After inoculation, the explants were transferred to a growth room with 16 hours of photoperiod, temperature 25 ± 2 ° C and light 32µmol.m⁻².s⁻¹. After 90 days, the variable number of shoots, length of shoots and oxidation percentage were evaluated. The analyzes were done using the software SISVAR. It was found that most caçari proliferation of shoots is obtained with BAP at concentration of 4.9 mg.L⁻¹. The addition of cytokinin in the culture medium was not beneficial to the length of sprouts. Tested cytokinins concentrations caused high oxidative effect, indicating the need to test lower concentrations.

Keywords: Camu-camu. Micropropagation. BAP. TDZ. Kinetin.

1. INTRODUÇÃO

As citocininas são muito importantes na regulação do crescimento e da morfogênese, pois estimulam a divisão das células, a indução e a proliferação de brotações (HOWELL et al., 2003; MENDES et al., 2015). Segundo Mok et al. (1987), de acordo com a estrutura química, as citocininas são classificadas em dois grupos: as derivadas da adenina (como a 6-benzilaminopurina – BAP) e as derivadas das feniluréias (como o N-phenyl- N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea - Thidiazuron, TDZ).

A adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo tem como objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que foram isolados da planta matriz, bem como estimular o alongamento ou a multiplicação da parte aérea (CALDAS et al., 1998; GALLO, 2015). Assim, a indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por concentração adequada e balanceada de reguladores vegetais adicionadas ao meio, como a citocinina, a qual é muito favorável na fase de multiplicação *in vitro*. As citocininas estimulam a indução de brotos adventícios a partir de calos ou induz a multibrotação em gemas axilares ou

apicais até determinada concentração, a partir da qual, ocorre diminuição da altura em virtude de possível efeito fitotóxico da citocinina (REIS et al., 2008), ficando claro a importância de determinar a melhor concentração desse hormônio para o desenvolvimento das espécies.

O caçari (*Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh) é uma das fruteiras tipicamente amazônicas, que cresce na margem dos rios e lagos de toda a bacia Amazônica (ZANATTA; MERCADANTE 2007; DELGADO; YUYAMA 2010; YUYAMA 2011). O fruto dessa espécie tem despertado grande interesse em alguns países pelo seu potencial de produção de ácido ascórbico, que pode atingir mais de 8.000 mg em 100 g de polpa integral (YUYAMA et al., 2011; CHAGAS et al., 2015). Porém, com relação ao cultivo *in vitro*, é escasso os estudos encontrados na literatura sobre a micropropagação da espécie.

Estudos mais recentes voltados para a obtenção de protocolos de micropropagação do caçari têm sido realizados por Araujo (2012) e Silva (2012). Essa técnica é de grande importância, pois possibilita a produção de um grande número de plantas assépticas em um curto espaço físico e de tempo. Assim, resultados promissores no cultivo *in vitro* de caçari vêm sendo obtido gradativamente nos últimos anos. Contudo, devido o caçari possuir elevada variabilidade genética em suas populações nativas e ser uma espécie lenhosa, o que dificulta o processo de diferenciação e crescimento *in vitro*, a micropropagação dessa espécie requer estudos mais específicos para se obter uma metodologia que atendam às exigências da cultura *in vitro*.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de caçari.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima, Boa Vista-RR, Brasil. Para a instalação do experimento foram utilizadas como fonte de explantes plantas matrizes de caçari consideradas de bom estado fitossanitário, mantidas em casa de vegetação, sob cuidados diários de irrigação, nutricional e sanitário. Antes da obtenção dos explantes, as plantas foram pulverizadas com fungicida (Nativo® 2ml.L⁻¹), durante 30 dias, com intervalo de um dia entre uma aplicação e outra.

Foram utilizados como fonte de explantes, segmentos caulinares com um par de gemas axilares, com ± 2 cm de comprimento, oriundos de brotações novas. Após a coleta, os segmentos foram levados ao laboratório de cultura de tecidos e passaram por um processo de pré-limpeza, com a excisão das folhas e o excesso de caule e, em seguida, foram lavados em água corrente para lixiviação parcial de compostos fenólicos liberados por consequência do corte dos tecidos. Posteriormente, ficaram imersos durante 24h na solução de fungicida e bactericida na concentração de 1 ml.L^{-1} de fungicida Nativo[®] e 1 ml.L^{-1} de bactericida Ksaumin[®].

Posteriormente, os segmentos caulinares foram levados para a sala de inoculação e, em câmara de fluxo laminar, passaram pelo processo de desinfestação. Os segmentos foram desinfestados inicialmente em solução de álcool 70%, imersos por 1 minuto e, logo após, no hipoclorito de sódio a 1,5% por 12 minutos, seguido de tríplice lavagem com água destilada, deionizada e autoclavada (água DDA) para retirada total dos produtos da superfície dos tecidos.

Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 125 mm, com 30 ml de meio de cultura WPM, acrescidos de diferentes citocininas (BAP, TDZ e cinetina) e suas concentrações (0; 2; 4; 8 e 10 mg.L^{-1}).

Após a inoculação, os explantes permaneceram por 15 dias no escuro e, posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade de $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após 90 dias, foram avaliadas as variáveis número de brotos, comprimento dos brotos e porcentagem oxidação.

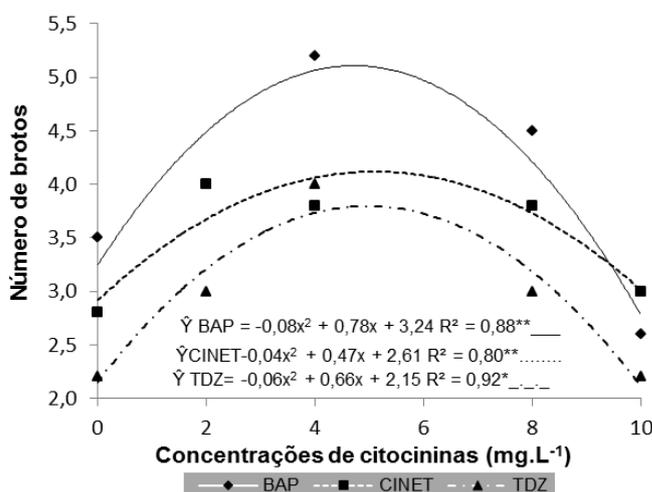
O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 3×5 , com cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo os dados quantitativos comparados através do teste de Tukey e os quantitativos através de regressão polinomial ($p < 0,05$), com auxílio do programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS E DICUSSÃO

Houve efeito da interação entre citocininas e concentração para as variáveis número (NB) e comprimento dos brotos (CB). Para porcentagem de oxidação (OX), somente houve efeito significativo para o fator concentração.

A citocinina BAP foi a que proporcionou maior número de brotos. Quando os segmentos caulinares de caçari foram submetidos ao cultivo *in vitro* com BAP, verificou-se que houve aumento do número de brotos à medida que se elevou a concentração dessa citocinina até 4,9 mg.L⁻¹, obtendo-se 5,20 brotos. A partir dessa concentração, houve uma diminuição no número de brotos obtidos (Figura1). Comportamento semelhante foi observado no número de brotos para cinetina e TDZ. Contudo, verificou-se que o número de brotos obtidos na presença das duas citocininas foram significativamente inferiores, proporcionando 3,80 e 3,30 brotos nas concentrações de 5,9 e 5,5 mg.L⁻¹, respectivamente. Alguns autores também observaram em seus estudos que o BAP foi mais eficiente do que o TDZ na proliferação de brotos, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho (OLIVEIRA et al., 2007; SOARES et al., 2011). A maior eficiência do BAP em relação à cinetina e TDZ também foi observado por Rocha et al. (2008). Os autores observaram que o BAP foi mais eficiente do que o TDZ e cinetina na multiplicação de brotos de algodão *in vitro*, sendo que as duas últimas não proporcionaram bons resultados, semelhantemente na multiplicação de segmentos caulinares de caçari.

Figura 1 – Número de brotos provenientes de segmentos caulinares de caçari cultivados *in vitro* em função de diferentes citocininas (BAP, CIN, TDZ) e concentrações.



O BAP tem sido a citocinina mais eficiente no processo de multiplicação para diversas espécies, fato observado também no presente trabalho. Esse resultado é semelhante ao observado por Machado et al. (2008). Os autores observaram maior número de brotos (6,0) para multiplicação de segmentos caulinares de videira no meio de cultivo contendo $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. A eficiência no uso de BAP na proliferação de brotos de diversas espécies tem sido comprovada por diversos autores (ROCHA et al., 2008; GRIMALDI, 2009; SOARES et al., 2011). Contudo, estas diferenças de concentrações de BAP utilizadas na multiplicação *in vitro* de espécies lenhosas indicam que as respostas a este fitorregulador variam de acordo com cada espécie e cultivar. Portanto, o fator genético é muito importante na determinação do número de gemas ou brotos por explante em relação à concentração de BAP utilizada (LEONTIEVORLOV et al., 2000).

Em mangabeira, Soares et al. (2011) trabalhando com segmentos caulinares, observou que BAP promoveu maior número de brotos (1,98). Oliveira et al. (2007), visando à indução de brotações em *Annona glabra* L., observaram a formação de 1,33 quando adicionaram ao meio de cultura WPM $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Já Grimaldi (2009), cultivando explantes de pera, verificou uma média de 5,0 brotos no meio de cultura com $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Este resultado está dentro do esperado, já que o BAP é comumente utilizado na faixa de $0,5$ a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

Para comprimento de brotos (Figura 2), verificou-se que o aumento da concentração de citocinina no meio de cultura (BAP, TDZ e CIN) não proporcionaram efeito positivo no crescimento das brotações, sendo que os melhores resultados foram obtidos na ausência destas. Verificou-se, de modo em geral, que a medida em que se elevou a concentração de citocinina no meio de cultura houve uma diminuição no comprimento dos brotos. Esse efeito pode ser melhor visualizado através da Figura 3.

Figura 2 – Comprimento de brotos provenientes de segmentos caulinares de caçari cultivados *in vitro* em função de diferentes citocininas (BAP, CIN, TDZ) e concentrações.

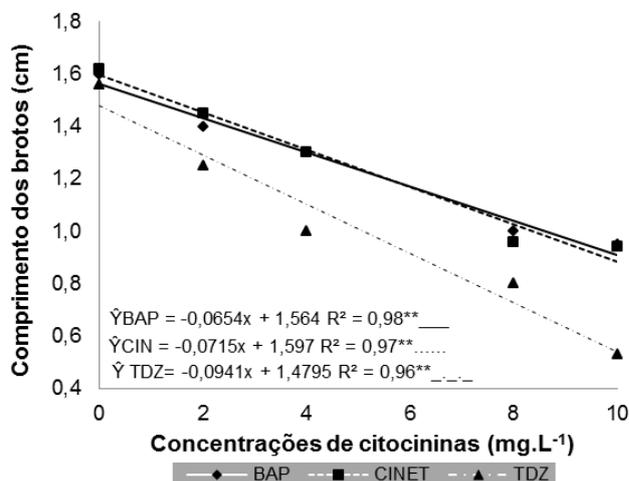


Figura 3 – Aspectos gerais do comprimento de brotos provenientes de segmentos caulinares de caçari cultivados *in vitro* em função de diferentes citocininas (BAP, CIN, TDZ) e concentrações (0; 2,0; 4,0; 8,0; 10 mg.L⁻¹).



O efeito negativo da adição de citocinina no comprimento de brotações são relatados em diversos trabalhos. Machado et al. (2006), verificaram que o tratamento controle (sem adição de CIN) promoveu maior comprimento dos brotos (4 cm) no cultivo *in vitro* de videira. Dzazio; Biasi e Zanette (2002), também constataram que concentrações de 0, 1, 5 e 10 μ M de cinetina não

influenciaram no crescimento dos brotos. Skala e Wysokinska (2004) e Garlet et al. (2011) também observaram redução no alongamento de brotos de *Salvia nemorosa* L. e de *Mentha gracilis* Sole, respectivamente, durante a proliferação *in vitro* destas espécies com o aumento da concentração de citocinina. Esses resultados corroboram com a afirmação de Pasqual (2001), que relata que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações no cultivo *in vitro*, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

As citocininas, de modo em geral, são biologicamente muito ativas e a intensidade varia de uma para outra. Ribeiro et al. (2010), descreve que o TDZ é a citocinina com maior atividade biológica na multiplicação, em relação a outras fontes. Isso deve-se ao incremento da atividade da enzima fosfatase ácida, responsável pela interconversão nucleotídeo-nucleosídeo da estrutura de citocininas endógenas, tornando-a biologicamente ativa, atuando como um inibidor de crescimento se utilizado em elevadas concentrações. Essa afirmação está de acordo com os resultados observados no presente trabalho. Ou seja, as citocininas proporcionaram aumento no número de brotos (Figura 1), porém não foram eficientes quanto a crescimento dos mesmos (Figura 2).

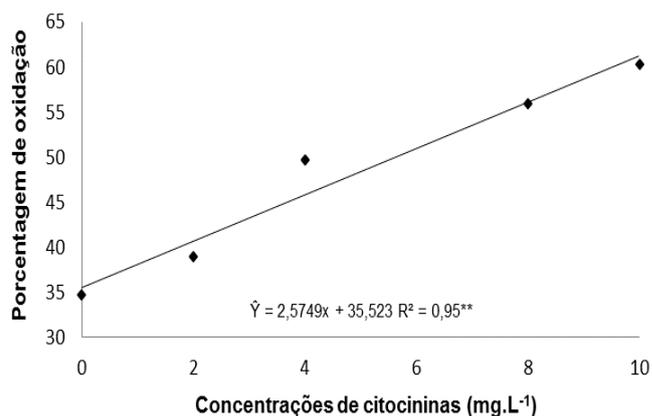
Assim, dependendo da finalidade do cultivo *in vitro*, multiplicação ou alongamento de brotos, é necessário que se adicione ao meio a concentração adequada, sendo esta específica também para cada (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Por exemplo, na multiplicação *in vitro* de ameixeiras foi observado que a adição de BAP ao meio de cultura, apesar de propiciar uma alta taxa de brotos, apresentou pequeno comprimento médio de brotos (RODRIGUES et al., 1999) semelhante ao que ocorreu no presente estudo com o caçari. Resultado semelhante também foi obtido por Chaves; Schuch e Erig (2005), os quais observaram que a adição crescente de BAP ao meio nem sempre proporcionava alongamento de brotos.

Por outro lado, para o algodão, Rocha et al. (2008) observaram que a adição de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP no meio de cultivo promoveu maior comprimento de brotações. Já no mesmo estudo, o comprimento foi menor quando cultivado na presença de CIN e TDZ.

Para a porcentagem de oxidação (Figura 4) observou-se uma tendência linear crescente para as concentrações testadas,

independentemente do tipo de citocinina. Ou seja, a medida que se aumentou as concentrações no meio de cultura, houve um aumento na porcentagem de explantes oxidados, chegando até 60,20 %, na concentração máxima de 10 mg.L⁻¹.

Figura 4 – Porcentagem de oxidação de segmentos caulinares de caçari cultivados *in vitro* em função de diferentes concentrações de citocinina.



O aumento da oxidação dos tecidos *in vitro* ocasionado pela adição de citocininas em elevadas concentrações tem sido reportado em diversos estudos. Salgado et al. (2001) notaram que o TDZ possui efeito inibitório na regeneração de brotos, quando utilizado em concentrações acima do nível ótimo. Este efeito inibitório no crescimento de brotos deve ter ocorrido em virtude do seu efeito fitotóxico, causado pela produção de etileno. Carvalho et al. (2011) citam que o TDZ apresenta efeito estimulatório na biossíntese do etileno e conseqüentemente resulta na senescência e na maior taxa de oxidação dos explantes (CARVALHO et al., 2011).

Importante ressaltar que as concentrações de fitormônios são específicos para cada espécie e etapa da micropropagação e, por isso, necessita ser estabelecida em cada espécie estudada. Salgado et al. (2001) também observaram que o TDZ possui efeito inibitório na regeneração de brotos, quando utilizado em concentrações acima do nível ótimo. Han et al. (1997) verificaram que o TDZ, em concentração acima de 0,01 mg L⁻¹, não promoveu a multiplicação de brotos em *Ficus benjamina* devido a presença de alto percentual de oxidação (46%). No presente trabalho, a porcentagem de oxidação foi crescente a medida em que elevou a concentração de citocinina

no meio, concordando com Pasqual (2001), o qual relata que elevadas concentrações de citocininas podem causar efeitos fitotóxicos no cultivo *in vitro*. Por outro lado, em videira, observou-se que o aumento das concentrações não aumentou significativamente o percentual de explantes oxidados, atingindo até 33,3 % na dose máxima de 10 μM (CARVALHO et al., 2011).

CONCLUSÕES

- Maior proliferação de brotos de caçari é obtida com BAP na concentração de 4,9 mg.L^{-1} ;
- A adição de citocinina no meio de cultura não foi benéfica para o comprimento de brotos;
- As concentrações de citocininas testadas causaram efeito oxidativo elevado, indicando a necessidade de testar concentrações mais baixas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, M. C. R. **Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de caçarizeiro**. 2012. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa/CNPH, v. 1, n. 7, p. 87-132, 1998.

CARVALHO, D. C. de. et al. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 108-114, 2011.

CHAGAS, E. A. et al. Intraespecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. v.15, n.4, p. 265-271, 2015.

CHAVES, A. da C., SCHUCH, M. W. ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n.6, p. 1281-1287, 2005.

DELGADO, J. P. M.; YUYAMA, K. Comprimento de estaca de camu-camu com ácido indolbutírico para a formação de mudas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n. 12, p.522-526, 2010.

DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-a'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.

GALLO, C. M. Cultivo *in vitro* e criopreservação de *Vasconcellea quercifolia* A. St.Hil. 2015. 104p. Tese (Doutorado em Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2015.

GARLET, T.M.B. et al. Influência de citocininas na micropropagação de *Mentha gracilis* Sole. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.30-4, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBABEMBRAPA, 1998.

GRIMALDI, F. **Propagação *in vitro* de pereira, cultivar packham's triumph (*pyrus communis*, L.)**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages – SC, 2009.

HOWELL, S.H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, v.8, n. 3, p.453-9, 2003.

MACHADO, M. P. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira vr043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 648-655, jul./ago., 2006.

LEONTIEV-ORLOV, O. et al. 6- benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de Prunáceas (*Prunus* sp.) **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, n.1, p. 42-46, 2000.

MENDES, D. J. Influência dos ácidos naftaleno acético e ácido indol butírico (auxinas) no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cyrtopodium*

saintlegerianum Rchb. F. (Orchidaceae). **Revista Eletrônica De Educação Da Faculdade Araguaia**, v. 7, n. 9, p. 13-40, 2015.

MOK, M.C. et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, v.22, n.6, p.1194-7, 1987.

OLIVEIRA, L.M. de. et al. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.29, n.1, p.25-30, 2007.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.

REIS, E.S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v.55, p.160-7, 2008.

RIBEIRO, C.S.N. et al. Efeito do thidiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n.4, p. 366- 371, 2010.

ROCHA, M. S. do. et al. Indução de superbrotamento e regeneração de plantas *in vitro*, nas cultivares de algodão colorido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande – PB, v.12, n.5, p.503–506, 2008.

RODRIGUES, A.C. et al. Estudo de Micropropagação e morfogênese em ameixeira e pessegueiro. **Relatório Técnico- Científico PIBIC/CNPq**. Erechim. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), 1999, 151p.

SALGADO S. M. L. et al. Efeito da utilização de TDZ e Benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciência e Agrotecnologia**

SANTOS, A.S. de A. et al. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de Carauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 8, n.35, p.62-65, 2005.

SANTOS, B. R. **Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd.)**. 2001. 89f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2001.

SILVA, M. L. **Desinfestação e estabelecimento de sementes de *Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh germinadas *in vitro***. 2012. 56p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2012.

SKALA, E.; WYSOKINSKA, H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L., from shoot tips and leaf explants. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.***, v.40, n. 11, p.596-692, 2004.

SOARES, F. P. et al. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *hancornia speciosa* Gomes. ***CiênciaAgrotécnica*** ,Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, 2011.

YUYAMA, K. A cultura de caçari no Brasil. ***Revista Brasileira de Fruticultura***, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 335-390, 2011.

ZANATTA, C.; MERCADANTE, A. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu–camu (*Myrciaria dubia*). ***Food Chemistry***, v.10, n.1, p. 1526-1532, 2007.