



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

MARCELA LIEGE DA SILVA

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE SEMENTES DE  
*Myrciaria dubia* (H. B. K) McVaugh GERMINADAS *in vitro***

Boa Vista

2012

MARCELA LIEGE DA SILVA

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE SEMENTES DE  
*Myrciaria dubia* (H. B. K) McVaugh GERMINADAS *in vitro***

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: Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas

Boa Vista

2012

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)  
Biblioteca Central Profª Maria Auxiliadora de Sousa Melo

S586d Silva, Marcela Liege da  
Desinfestação e estabelecimento de sementes de  
*Myrciaria dúbia* (H.B.K.) McVaugh germinadas *in vitro*. --  
Boa Vista, 2012.  
55 p. : il.

Orientador: Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
Roraima, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1 – Domesticação. 2 – Fruteira nativa. 3 – *Myrciaria  
dúbia*. 4 – Cultura de tecidos. 5 - Assepsia. I - Título. II –  
Chagas, Edvan Alves (orientador).

CDU 634.42(811)

## MARCELA LIEGE DA SILVA

Desinfestação e estabelecimento de sementes de *Myrciaria dubia*  
(H. B. K) Mcvaugh, germinadas *in vitro*

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

Aprovada: dia 02 de março de 2012

---

Pesquisador Dr. Edvan Alves Chagas  
Orientador – Embrapa Roraima

---

Professor Dr. Alberto Moura de Castro  
EAGRO/UFRR

---

Professor Dr. Wellington Farias Araújo  
CCA/UFRR

---

Professor Dr. Marcio Akira Couceiro  
EAGRO/UFRR

Aos meus pais, Jânio Antônio da Silva e Tânia F. de Oliveira Silva,  
pelo amor, apoio e incentivo.

**OFEREÇO**

A Deus.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, mais importante que o lugar que ocupas em mim é a intensidade de sua presença em tudo o que faço;

Aos meus pais, Jânio Antônio da Silva e Tânia Fátima de Oliveira Silva, e aos meus irmãos, Joeser Elias da Silva e Priscila Elisama da Silva, pelo amor, carinho e apoio que tanto me tem dirigido ao longo da vida;

À minha família e aos meus amigos, que mesmo tão distantes, sempre me apoiaram e torceram por mim;

À Universidade Federal de Roraima, ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (POSAGRO), à Biofábrica e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Roraima), pela oportunidade de realização do curso;

Ao professor Dr. Edvan Alves Chagas pela orientação, paciência, apoio, por muito contribuir em minha formação profissional e por ter acreditado no meu trabalho;

À minha querida amiga Pollyana Cardoso Chagas, pelos bons momentos compartilhados e pelo companheirismo por todos os anos de amizade;

Aos professores, Dr. Wellington Farias Araújo e Dra. Sandra Cátia Pereira Uchôa, pelo apoio e auxílio nos trabalhos acadêmicos;

Aos colegas da UFRR e Embrapa Roraima, Olisson, Bruna, Isabel, Jaqueline, Bil, Samuel, Juca, Pedro, Leidiani, Verônica e em especial Nilma e Elias Ariel, pelo apoio na realização dos trabalhos e pela paciência nos momentos mais difíceis;

Ao CNPq/FEMARH, pela bolsa concedida e apoio financeiro para a realização do curso, via projetos processo 557023/2009-2 e processo 550963/2010-3, sob coordenação do Dr. Edvan Alves Chagas;

A CAPES/FINEP, pelo auxílio financeiro para a realização do trabalho;

Aos membros da banca examinadora.

da Silva, Marcela Liege. **Desinfestação e estabelecimento de sementes de *Myrciaria dúbia* (H. B. K) McVough germinadas *in vitro***. 2012. 58p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, ano 2012.

## RESUMO

O camu-camu é uma fruta que possui elevado conteúdo de ácido ascórbico e vem se destacando na produção de concentrados e suplementos naturais. Devido a essa importância, a domesticação do camu-camu vem sendo estudada há alguns anos. Dentre os diferentes processos de propagação, o cultivo *in vitro* tem sido importante no processo de clonagem de materiais selecionados. Contudo, ainda não existem trabalhos exitosos que viabilizassem o estabelecimento *in vitro* da espécie e proporcionassem à multiplicação de materiais selecionados e/ou a produção de mudas de qualidade. Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho desenvolver procedimentos para a desinfestação e estabelecimento *in vitro* a partir de sementes de camu-camu. Para a desinfestação, avaliou-se a aplicação de fungicida e formol; o uso de fungicida e hipoclorito de sódio e o efeito de concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão das sementes. Para o cultivo *in vitro* de sementes de camu-camu foram testadas a inoculação em diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose e diferentes concentrações do meio MS e de sacarose. Verificou-se que a utilização de fungicida combinado com formol e hipoclorito foi eficiente na desinfestação de sementes de camu-camu, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando as sementes foram imersas por 3 horas em fungicida seguida por 3 horas de imersão em formol e posteriormente, por 25 minutos no hipoclorito. O uso de fungicida por 6 horas e em seguida de hipoclorito por 25 minutos, sem adição de formol, também pode ser utilizado na assepsia das sementes de camu-camu. A utilização de hipoclorito de sódio para desinfestação de sementes de camu-camu na concentração de 0,5 a 1% de cloro ativo, por 20 e 60 minutos, mostraram-se eficiente. Os produtos utilizados na desinfestação das sementes não foram prejudiciais à germinação das sementes avaliadas. A adição de sacarose nos meios de cultura MS, WPM e BOXUS não resultou no crescimento inicial de de camu-camu *in vitro*.

**Palavras-chave:** Domesticação, Fruteira nativa, *Myrciaria dubia*, Cultura de Tecidos, Assepsia.

da Silva, Marcela Liege. **Disinfestation and establishment of in vitro-germinated seeds of *Myrciaria dúbia* (H. B. K) McVough**. 2012. 58p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, ano 2012.

### ABSTRACT

The camu-camu is a fruit which possesses a high content of ascorbic acid and has been standing out in the production of concentrates and natural supplements. Due to that importance, the domestication of the camu-camu has been being studied for some years. Among the different propagation processes, the *in vitro* cultivation has been important in the process of cloning of selected materials. However, there is not yet successful works which make the *in vitro* establishment of the species viable and provide the multiplication of selected materials and/or production of high quality seedlings. In this context, it was intended through the present work to develop procedures for both the disinfestation and *in vitro* establishment from camu-camu seeds. For the disinfestations, the application of fungicide and formol; the use of fungicide and sodium hypochlorite and the effect of concentrations of sodium hypochlorite and immersion time of the seeds were evaluated. For the *in vitro* cultivation of camu-camu seeds, the inoculation in different culture media and sucrose concentrations and different concentrations of the MS medium and sucrose were tested. It was found that use of fungicide combined with formol and hypochlorite was efficient in disinfestation of camu-camu seeds, the best results were obtained when the seeds were immersed for 3 hours in fungicide followed for 3 hours' immersion in formol and afterwards for 25 minutes in hypochlorite. Use of fungicide for 6 hours and next of hypochlorite for 25 minutes, without the addition of formol, also can be utilized in the asepsis of camu-camu seeds. The utilization of sodium hypochlorite for disinfestation of camu-camu seeds at the concentration of 0.5 to 1% of active chlorine for 20 and 60 minutes proved efficient. The products utilized in the disinfestation of the seeds were not harmful to the germination of the seeds evaluated. The addition of sucrose into the culture media MS, WPM and BOXUS did not result into the initial growth of camu-camu *in vitro*.

**Key words:** Domestication, Native fruit-bearing plant, *Myrciaria dubia*, Tissue culture, Asepsis.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 Objetivos Gerais.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
3.1 Aspectos Botânicos.....	12
3.2 Importância Econômica.....	13
3.3 Propagação do Camu-Camu.....	14
3.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	15
3.5 Desinfestação <i>in vitro</i> .....	16
3.6 Meios de Cultura.....	18
3.7 Fungicidas.....	19
3.8 Sacarose.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 Condução dos experimentos.....	22
4.2 Material Vegetal.....	22
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	29
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49

## 1 Introdução

A Amazônia apresenta uma das maiores biodiversidade do mundo, na qual estão incluídas espécies vegetais ainda não domesticadas e com grande potencial econômico. O camu-camu, caçari, ou araçá-d'água (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) é um arbusto, pertencente à família Myrtaceae, e encontra-se distribuído desde a parte leste do Pará, passando pelo médio e alto Rio Amazonas e parte oriental da Cordilheira dos Andes (Bacia Amazônica) no Peru. Ocorre em países como Colômbia, Venezuela, Guiana Inglesa e Bolívia. No Brasil, também ocorre nas margens de todos os rios que deságuam no rio Amazonas, passando pelos estados de Rondônia, Mato Grosso e Tocantins (YUYAMA *et al.*, 2010).

O fruto é muito usado no preparo de refresco, sorvete, picolé, polpa de fruta, geléia, licor caseiro, xarope, xampu e marmelada. Dificilmente são usados *in natura* devido a sua elevada acidez (SILVA *et al.*, 2011a). O camu-camu possui um grande potencial econômico devido ao seu elevado conteúdo de ácido ascórbico, cerca de 6112 mg.100 g<sup>-1</sup> (YUYAMA, 2002), que é superior ao encontrado na maioria das plantas cultivadas, como a acerola 1.074 mg.100 g<sup>-1</sup> (FREITAS *et al.*, 2006), e a goiaba 60 mg.100 g<sup>-1</sup> (SANTOS DA ROSA, 2005). O ácido ascórbico tem função muito importante devido a sua ação fortemente redutora, sendo largamente utilizado como antioxidante para estabilizar a cor e o aroma de alimentos (ALDRIGUE *et al.*, 2002). Além disso, é uma vitamina essencial que deve ser ingerido diariamente. (CHAVES *et al.*, 2004).

Devido a essa importância econômica e pela dificuldade de sua propagação assexuada (FERREIRA; GENTIL, 2003), a micropropagação vem se destacando por apresentar vantagens sobre as formas de propagação convencional, especialmente quando há necessidade da multiplicação de cultivares melhoradas. Por meio desta técnica é possível exercer o controle sobre a produção das mudas, produzindo-as durante todo o ano e obtendo-se um número elevado de indivíduos geneticamente idênticos a partir de uma planta selecionada (SCHUCH; ERIG, 2005). Contudo, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, está na dificuldade de obter material propagativo livre de contaminação por fungos e bactérias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A etapa de desinfestação tem papel fundamental, pois um dos maiores problemas na utilização da cultura de tecidos está na contaminação dos explantes.

Esse problema é mais grave no cultivo de espécies lenhosas, as quais estão inseridas todas as espécies amazônicas com potencial de uso na fruticultura. O problema é maior quando os explantes são retirados diretamente do campo.

Para minimizar os problemas de contaminação e viabilizar o processo de estabelecimento *in vitro*, diversas substâncias têm sido testadas, sendo os compostos à base de cloro e etanol, os mais utilizados no processo de desinfestação (SILVA *et al.*, 2005) e, em alguns casos, a adição de antibióticos e fungicidas ao meio de cultura (FERREIRA; SANTOS; BRAGADO, 2009). Estudos comprovam o sucesso na utilização desses produtos na desinfestação de explantes de fruteiras nativas quando se deseja estabelecer tecidos vegetais *in vitro* para posteriores estudos de multiplicação. As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos seus princípios ativos e os tempos de exposição, podem variar bastante.

Neste contexto, torna-se necessário, para se iniciar os trabalhos de micropropagação do camu-camu, a realização de estudos que visem à obtenção de protocolos de desinfestação e estabelecimento.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver procedimentos para a desinfestação de sementes de camu-camu e estabelecimento *in vitro*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do uso dos fungicidas Derosal<sup>®</sup> e Cerconil<sup>®</sup> e formol na desinfestação de sementes de camu-camu germinadas *in vitro*;
- Avaliar o efeito do hipoclorito de sódio e seu tempo de imersão na desinfestação de sementes de camu-camu germinadas *in vitro*;
- Avaliar o efeito de diferentes meios de cultura, concentrações de sais e sacarose na microprogação de sementes de camu-camu.

### 3 Revisão de Literatura

#### 3.1 Distribuição e Aspectos Botânicos

O camu-camu ou araçá d'água [*Myrciaria dubia* (Humb., Bonpl. & Kunth) McVough] é uma planta frutífera nativa da Amazônia encontrado normalmente às margens dos rios, lagos e igapós (YUYAMA, 2002). Pertence a classe Dicotiledônea, ordem Myrtacea, família Myrtaceae e gênero *Myrciaria* (PICÓN BAOS; DELGADO; PADILHA TRUEBA, 1997; TEIXEIRA; CHAVES; YUYAMA, 2004).

No Brasil, nas áreas de ocorrência natural, a espécie é conhecida por diversos nomes como caçari, araçá d'água ou sarão, dependendo da região que é encontrada (ZANATA, 2004).

A espécie é encontrada geralmente na região central do Estado do Pará, as margens de médio e alto rio Amazonas, até a parte oriental do Peru, ao longo do rio Casiquiare e parte da alta e média bacia do rio Orinoco (MCVAUGH, 1969; ALVES; BORGES; MOURA, 2000).

Segundo CHÁVEZ FLORES (1988), nos estados do Amazonas, Rondônia e Roraima, o camu-camu é encontrado naturalmente, porém, não tão frequente e abundante como se observa ao longo dos rios e lagos da Amazônia peruana, onde são encontradas grandes populações nativas e monoespecíficas (PETERS; VASQUEZ, 1987).

A espécie também é encontrada ao longo dos rios Ucayali e Amazonas e seus afluentes, principalmente às margens do rio Supay, e do rio Nanay no Peru (MENDOZA *et al.*, 1989; VILLACHICA, 1996).

Com relação aos aspectos botânicos, as plantas de camu-camu são arbustos de 4 a 8 metros de altura, com uma ramificação que se inicia desde a base; as folhas são simples, opostas, ovuladas ou elípticas; a raiz principal é de forma cônica e possui muitos fios absorventes; a flor é de cor branca, subséssil com quatro pétalas; os frutos são globosos, de superfície lisa e brilhante, de cor vermelha escura a preta púrpura com dois a quatro centímetros de diâmetro, apresentando de uma a quatro sementes com peso médio de 8,4 g, reniformes, aplanadas, cobertas de uma pilosidade branca (PINEDO, 2002).

### 3.2 Importância Econômica

Segundo Suguino (2002), o fruto do camu-camu é consumido de diversas maneiras, em países como Estados Unidos, França e Japão, podendo ser considerado um produto de exportação, fazendo com que seu cultivo seja considerado uma nova opção para o desenvolvimento de novos produtos agrícolas, principalmente, quando se considera suas características agrônômicas e nutricionais.

No Brasil, a principal utilização é como polpa, e vem sendo disponibilizada no norte do país, para produção de diversos produtos, como refresco, sorvete, picolé, polpa de fruta, geléia, licor caseiro, xarope, xampu e marmelada. Dificilmente são usados *in natura* devido a sua elevada acidez (SILVA *et al.*, 2011a). A polpa do camu-camu possui elevado teor de ácido ascórbico (vitamina C), entre 877 e 3.133 mg 100 g<sup>-1</sup> de polpa que é superior ao encontrado na maioria das plantas cultivadas (PINEDO *et al.*, 2004). Yuyama (2002), constatou que esse valor poderia atingir até 6112 mg 100g<sup>-1</sup> de polpa, o que foi encontrado em frutos coletados na região leste do estado de Roraima, nas margens do rio Urubu.

O fruto de camu-camu por apresentar baixo pH e baixo grau de doçura, tem sido utilizado basicamente na agroindústria para produção de sucos, néctares, geléias e licores (VIERA *et al.*, 2010). Atualmente, inúmeros processos tecnológicos estão sendo adaptados e aperfeiçoados para a obtenção de diversos outros produtos derivados de camu-camu, visando valorar o seu uso em condições regionais onde a fruta não é conhecida (RODRIGUES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2011b). Segundo Maeda e Andrade (2003), a polpa também apresenta características desejáveis para produção de bebida alcoólica fermentada, destacando-se o alto rendimento em bebida, que atingiu valores de 85 a 90 % em relação ao volume de mostro.

Além do uso na agroindústria, também têm sido desenvolvidos diversos estudos na área nutracéutica, onde têm sido identificados compostos, por exemplo, miricetina e quercetina (RODRIGUES; MARX, 2006), que são substâncias antioxidantes de ocorrência natural (SOUSA; SILVA; VIEIRA, 2007).

### 3.3 Propagação do Camu-Camu

A forma mais utilizada para propagação do camu-camu ainda é por sementes, o que pode ocasionar no seu cultivo, uma grande variabilidade no ciclo, na produção e no teor de vitamina C dos frutos. Entretanto, mudas obtidas por sementes não são recomendadas para formação de pomares comerciais, pois além de retardar o início da produção dos frutos, desenvolvem plantas desuniformes, quanto ao crescimento, floração e frutificação, dificultando as atividades de manejo da cultura, inclusive a própria colheita (LIRA JUNIOR *et al.*, 2007).

Embora a alta variabilidade em uma espécie seja desejável em programas de melhoramento, a uniformidade de plantas dentro de uma população clonal é vantajosa para a produção comercial. Quando se projeta sua produção em maior escala, é necessário aproveitar certas características úteis, como o alto rendimento, os níveis maiores de ácido ascórbico e o maior tamanho do fruto, dentre outras características (OLIVA; VARGAS; LINARES, 2005).

A multiplicação vegetativa do camu-camu vem sendo estudada visando maior produtividade, uniformidade de produção, precocidade na frutificação bem como garantir as qualidades desejáveis da planta-mãe (SILVA *et al.*, 2009; YUYAMA *et al.*, 2010).

Dentre as técnicas de propagação do camu-camu, destacam-se a enxertia, no qual ocorre a combinação de características desejáveis de dois genótipos, o porta-enxerto e o enxerto; e a estaquia, que é um método de propagação em que segmentos destacados de uma planta, sob condições adequadas, emitem raízes e originam uma nova planta, com características idênticas àquela que lhe deu origem (HARTMANN *et al.*, 2002).

Santana (1998), avaliando diferentes porta-enxertos da família Myrtaceae (*Myrciaria* sp., *M. cauliflora*, *Psidium densicomum*, *P. guava*, *P. guineense*, *P. friedrichsthalianum* e *Eugenia uniflora*), obteve os melhores resultados na formação de mudas de *M. dubia* com as espécies *Myrciaria* sp. (22%) e *Psidium guineense* (20%), com garfagem de topo em fenda cheia; em garfagem de fenda lateral, essas mesmas espécies apresentaram resultados bem distintos, 40% e 0%, respectivamente. Entretanto, quando a enxertia foi realizada com o camu-camu em porta enxertos da família Myrtaceae, adaptados a terra firme como a goiabeira

(*Psidium guajava* L.) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), a enxertia se mostrou incompatível (SUGUINO, 2002).

Para a propagação de camu-camu por estacas, Pereira (2002) recomenda utilizar ramos juvenis provenientes de posições basais, com 8 mm de diâmetro, imersos de 12 a 24 horas em 200 ppm de ácido naftalenoacético (ANA), para conseguir 90% de enraizamento. Contudo, alguns trabalhos estudando a propagação vegetativa por estaquia de camu-camu, não obtiveram sucesso. Costa da Silva (2009) observou que o uso dos fitorreguladores AIB e AIA não se mostraram eficiente no enraizamento de estacas. Também Utia e Pinedo (1979), não obtiveram sucesso no enraizamento de estacas apicais e basais de camu-camu, submetidas a três diferentes substratos areia, solo e serragem.

### **3.4 Cultivo *in vitro***

O cultivo *in vitro* é um método promissor para as espécies nativas gerando pomares com populações de plantas homogêneas além de acelerar os métodos de propagação convencional (SOUSA; SILVA; VIEIRA, 2007). Segundo Pasqual (2001), a cultura de tecidos compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial. Essas técnicas permitem o cultivo sob condições físicas, químicas e biológicas ótimas.

A produção de plantas *in vitro* é baseada na totipotência celular, em que a célula vegetal já diferenciada volta ao seu estado meristemático e, após, redefine seu padrão de diferenciação (TERMIGNONI, 2005). Por meio desta técnica, fragmentos de tecidos vegetais vivos, denominados “explantes”, são retirados de plantas de interesse e cultivados em meio nutritivo definido, sob condições assépticas.

A micropropagação pode ser enquadrada como uma técnica de propagação vegetativa *in vitro* (XAVIER; WENDLING; DA SILVA, 2009). Comparada a outras técnicas, têm sido considerada aquela que mais se difundiu nos últimos anos, com aplicações comprovadas em diversas espécies de plantas. Dessa forma, a micropropagação pode ocorrer por meio de organogênese direta, com a formação de órgãos diretamente, sem a passagem por fases intermediárias. Ou indireta,

passando obrigatoriamente pela fase de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As duas formas são fundamentais para o cultivo *in vitro*.

Outra etapa da micropropagação é a rizogênese, quando ocorre a formação de raízes nas partes aéreas, obtidas no estágio de multiplicação, que permite a constituição de plantas completas para posterior aclimatização às condições *ex vitro*. O enraizamento de espécies lenhosas, que inclui a maioria das frutíferas, é a etapa mais difícil, segundo Schuch e Erig (2005).

### **3.5 Desinfestação *in vitro***

O uso de processos de desinfestações que garantam a assepsia dos propágulos vegetativos a serem introduzidos *in vitro* é essencial na cultura de tecidos e permite a obtenção de explantes livres de bactérias, fungos e leveduras. Esses microorganismos no meio de cultura agem de forma indireta, comprometendo o desenvolvimento normal dos cultivos por competir com o explante pelos nutrientes e vitaminas e também produzirem metabólitos fitotóxicos, como os ácidos láctico e acético e o cianeto (LIMA; MORAES, 2006).

As substâncias mais utilizadas no processo de desinfestação são os compostos à base de cloro e etanol (SILVA *et al.*, 2005a). Dentre os produtos germicidas à base de cloro utilizados para desinfestação dos explantes, o mais comum é o hipoclorito de sódio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), que é uma solução aquosa alcalina com 10% de cloro ativo e cerca de 10-13 g L<sup>-1</sup> de soda residual, de coloração amarela e odor característico.

Algumas hipóteses do mecanismo de ação do cloro sugerem que há uma combinação com proteínas da membrana celular dos microorganismos, formando compostos tóxicos e levando à inibição das enzimas essenciais (DONINI *et al.*, 2005).

Juntamente com o hipoclorito de sódio, são comumente adicionadas gotas de detergente para melhorar o contato das soluções à base de cloro com os tecidos. O mais utilizado é o Tween 20, mas detergentes normais de cozinha podem substituí-lo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O Tween 20 tem a função de aumentar a penetração da solução no tecido (PASQUAL, 2001).

Picolotto *et al.* (2007) observaram que a utilização de hipoclorito de sódio a 5% por 20 minutos foi mais eficiente na desinfestação de sementes de jaboticabeira (*Myrciaria* spp.), em comparação à concentração de 2,5%.

O etanol geralmente é utilizado pela sua ação germicida, surfactante e de dissolução das gorduras, podendo auxiliar a ação dos outros produtos. Geralmente é utilizado nas concentrações de 70% e 80% por alguns segundos, uma vez que acima desta concentração é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos (PASQUAL, 2001).

Outros produtos podem ser utilizados na descontaminação de explantes, como cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de cálcio e formol, porém muitos deles apresentam riscos de toxicidade.

O formaldeído é um gás, normalmente utilizado em solução aquosa, incolor com odor penetrante e irritante, e provoca efeitos tóxicos em seres humanos e animais. Entretanto, vem sendo utilizado na desinfestação de diferentes explantes para o cultivo *in vitro*. O uso do paraformaldeído por 2 h em *Limonium platyphyllum* Lincz., eliminou a contaminação por fungos, porém interferiu na regeneração de brotações do material *in vitro* (FIOR; PRESTES; RODRIGUES, 2001).

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o cloreto de mercúrio, embora raramente, devido a sua toxidez. Ribas *et al.* (2002) trabalhando com diferentes concentrações de cloreto de mercúrio na assepsia de explantes de *Aspidosperma polyneuron*, observou que o HgCl<sub>2</sub> a 0,05% de por 10 minutos foi mais eficiente.

As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos seus princípios ativos e os tempos de exposição, podem variar bastante (XAVIER; WENDLING; DA SILVA, 2009). O efeito positivo do tempo de desinfestação foi verificado em abacaxizeiro e em marmeleiro (MORAES; ALMEIDA; CAZÉ FILHO, 2007; BIANCHI *et al.*, 2003). Os mesmos autores verificaram que a desinfestação por 10 minutos utilizando hipoclorito de sódio a 2%, proporciona maior sobrevivência de gemas.

### **3.6 Meios de Cultura**

No cultivo *in vitro* utilizam-se meios nutritivos determinados para que as plantas se desenvolvam, com formulações de acordo com as necessidades de cada

vegetal. Para promover maior crescimento, normalmente, incluem-se certos componentes orgânicos, como macro e micronutrientes, carboidrato, normalmente a sacarose, vitaminas, aminoácidos, agente geleificante e reguladores de crescimento (PASQUAL, 2001). Desta forma, as condições *in vitro* se assemelham àquelas necessárias para que as plantas se desenvolvam no ambiente, como energia proveniente da luz, água, elementos minerais, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As condições *in vitro* devem ser adequadas aos processos de germinação e desenvolvimento inicial da plântula, permitindo, frequentemente, uma maior germinação das sementes do que em viveiros (NOLETO; SILVEIRA, 2004). Contudo, os níveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos nos meios de cultivo influenciam vários processos metabólicos apresentando efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos (MALDANER *et al.*, 2006).

As primeiras formulações nutritivas foram desenvolvidas em estudos de nutrição mineral de plantas, que culminaram na definição da solução nutritiva de Knop (GAUTHERET, 1934). Outros meios nutritivos foram formulados, com composição diferente de macronutrientes, como o meio nutritivo formulado por White (1945). Durante muitos anos esse meio foi utilizado como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies.

A fim de aperfeiçoar o crescimento de calo *in vitro*, modificações posteriores foram desenvolvidas envolvendo, principalmente, o aumento das concentrações dos sais em geral, a diminuição na concentração de sódio e o acréscimo de nitrogênio na forma de amônio para complementar o nitrato (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio MS foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio de White com extrato de folhas de fumo.

Para espécies lenhosas, o meio MS não tem se mostrado satisfatório em alguns casos, tendo-se observado melhor desempenho nas formulações com composições mais diluídas em macronutrientes. O meio WPM (Wood plant médium) (LLOYD; MCCOWN, 1980), especialmente desenvolvido para espécies lenhosas, têm sido frequentemente utilizado como alternativa ao meio MS. Este meio apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íon sulfato (MELO *et al.*, 1999; PASQUAL, 2001).

Outro meio de cultura *in vitro* que pode ser utilizado, é o BOXUS, tem semelhança ao MS, quanto aos micronutrientes e vitaminas, mas apresenta diferentes concentrações em macronutrientes e compostos orgânicos.

Neste contexto, a micropropagação *in vitro* de espécies lenhosas requer estudos mais específicos e desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências dos explantes (COELHO, 1999; DECCETI, 2000; PEREIRA, 2004).

### 3.7 Fungicidas

Em espécies lenhosas, na qual se enquadra o camu-camu, são encontradas algumas dificuldades como oxidação fenólica e excesso de contaminação por microrganismos, devido à intensidade luminosa, tipos de explantes e genótipos utilizados. Dentre estes problemas, a contaminação fúngica, presente no interior dos tecidos e que é conhecida como contaminação endógena, é um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro*. Para solucionar esses problemas, adequações ao meio de cultivo, como composição de nutrientes, uso de desinfestantes e compostos antioxidantes podem ser utilizados (TEIXEIRA, 2008).

Estudos de eficiência de fungicidas são importantes para indicações dos intervalos de aplicação e concentrações necessárias ao manejo de doenças, pois muitos fungicidas podem ter efeitos fitotóxicos, reduzindo o crescimento e interferindo no desenvolvimento de plantas, se utilizados inadequadamente (GAO; HOFSTRA; FLETCHER, 1988), além de possibilitar a seleção de isolados resistentes (ALFENAS; DEMUNER; SILVA, 1987; LEROUX, 2003).

Freitas *et. al.* (2011) relatam a eficiência de fungicidas sistêmicos no controle as diversas contaminações. No estabelecimento *in vitro* de *Aniba rosaeodora* Ducke, constatou que adição de Benomyl no meio de cultivo, reduziu a contaminação fúngica e apresentou efeito positivo no estabelecimento inicial de explantes de ápices caulinares de pau-rosa.

Em estudos com *Aspidosperma ramiflorum*, Silva *et al.* (2007), testaram a eficiência do tratamento de sementes com solução fungicida Tebuconazole (Folicur<sup>®</sup>), visando o seu estabelecimento *in vitro*, e verificaram sua eficiência na desinfestação. Os autores não observaram interferência do fungicida sobre a germinação das sementes.

Embora os fungicidas Clorotalonil + Tiofanato-metilico (Cerconil<sup>®</sup>) e Carbendazim (Derosal<sup>®</sup>) sejam do mesmo grupo químico (benzimidazol) e possuam o mesmo modo de ação (sistêmico), o princípio ativo Carbendazim apresentou

melhor resultado na descontaminação superficial dos explantes de mangueira (ANDRADE *et al.*, 2008).

Em trabalhos realizados com embriões de dendê, Cardoso, (2010), observou a eficácia do fungicida Carbendazim (Derosal®) no combate a proliferação de fungos.

### 3.8 Sacarose

A sacarose é a fonte de carboidrato mais utilizado na micropropagação (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Variações na concentração de sacarose no meio de cultura afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta *in vitro*, influenciando no crescimento e na diferenciação das culturas (BARG; UMIEL, 1977; OZAIAS-AKINS; VASIL, 1982; KUMAR; BENDER; NEUMANN, 1984). A sacarose influencia vários processos metabólicos das culturas cultivadas *in vitro* e apresenta efeito sobre o crescimento e diferenciação dos tecidos, além de manter a osmolaridade adequada do meio (SKREBSKY; NICOLOSO; FERRÃO, 2004).

Para Grattapaglia e Machado (2004), a disponibilidade de uma fonte de energia é indispensável para que ocorra a rizogênese e ressaltam que a concentração de sacarose no meio de cultura deve ser mantida entre 2 e 3%. Deve-se manter a sacarose no nível normalmente utilizado (30 g L<sup>-1</sup>) ou, até mesmo, aumentá-lo numa fase anterior a aclimatização. (LEITE; NELSON; FINARDI, 2000).

Para o cultivo *in vitro* de embriões, Garcia *et al.* (2002) relatam que dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento, os carboidratos podem ser utilizados em concentrações mínimas no meio de cultura ou até dispensável. Pasqual *et al.* (2002), realizaram estudos com embriões de tangerina “Poncã” e observaram a influência da sacarose (15 a 30 g L<sup>-1</sup>) sobre o crescimento e desenvolvimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicular das plântulas. Já Nunes *et al.* (2008) relatam a ausência de resposta de embriões, oriundos de frutos maduros e secos de pinhão-manso, ao aumento nas concentrações de sacarose. Segundo estes autores, provavelmente o processo de germinação para esses embriões ocorre em razão das reservas nutricionais dos cotilédones, presentes nos embriões excisados, e das fontes nutricionais presentes no meio de cultura, que o tornam independente do fornecimento de sacarose.

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Condução dos experimentos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos (Biofábrica), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Roraima, no Campus do Cauamé, em parceria com a Embrapa Roraima, coordenadas 2° 52' 15,49" N e 60° 42' 39,89" W, em Boa Vista-RR.

### **4.2 Material Vegetal**

As sementes de camu-camu utilizadas para instalação dos experimentos foram oriundas de plantas selecionadas de uma população natural coletadas no município de Porto Velho-RO, no período de outubro de 2011. As sementes selecionadas foram extraídas manualmente de frutos maduros e de tamanho homogêneo, separadas com auxílio de uma peneira, lavadas em água corrente para retirada dos resíduos de polpa e de casca.

Em condições de laboratório, as sementes foram acondicionadas em um recipiente de 20 litros e cobertas totalmente com água potável (YUYAMA, 2011), onde permaneceram por 20 dias até a instalação de todos os experimentos constantes neste trabalho. As sementes foram retiradas do recipiente, escarificadas com auxílio de uma esponja grossa de cozinha com a finalidade de retirar o excesso de mucilagens e penugens, lavadas com água corrente e tratadas com solução contendo hipoclorito de sódio (2%).

Em seguida, foram instalados os seguintes experimentos:

#### **Experimento 1: Uso de fungicida e formol na desinfestação *in vitro* de sementes de camu-camu**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, quatro repetições, cinco frascos por repetição e duas sementes por frasco, totalizando 200 sementes.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos, onde permaneceram submersas em solução fúngica constituída pela combinação de Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> e Cerconil<sup>®</sup>, posteriormente foram retiradas e lavadas em água destilada, após, foram imersas em formol e, por último, tratadas com hipoclorito de sódio, de acordo com os tratamentos abaixo:

- Controle;
- 3 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 3 h formol + 25 min. em Hipoclorito de sódio;
- 6 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 6 h formol + 25 min. em Hipoclorito de sódio;
- 12 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 12 h formol + 25 min. em Hipoclorito de sódio;
- 24 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 24 h formol + 25 min. em Hipoclorito de sódio.

### **Experimento 2: Desinfestação *in vitro* de sementes de camu-camu: uso combinado de fungicida e formol**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 7 tratamentos, quatro repetições, cinco frascos por repetição e duas sementes por frasco, totalizando 280 sementes.

Delineou-se o presente experimento visando ajustar o tempo de imersão das sementes aos tratamentos propostos abaixo e, seguindo a mesma metodologia citada acima:

- Controle;
- 1 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 1 h formol + 25 min. em Hipoclorito de sódio;
- 2 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 2 h formol + 25 min. em Hipoclorito de sódio;
- 3 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 3 h formol + 25 min. em Hipoclorito;
- 4 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2g L<sup>-1</sup>) + 4 h formol + 25 min. em Hipoclorito;

- 5 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 5 h Formol + 25 min. em Hipoclorito de sódio;

- 6 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 6 h formol + 25 min. em Hipoclorito de sódio.

### **Experimento 3: Aplicação combinada de fungicida e hipoclorito de sódio na desinfestação *in vitro* de sementes de camu-camu**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, quatro repetições, cinco frascos por repetição e duas sementes por frasco, totalizando 200 sementes.

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores e, visando a não utilização de formol, devido ser um produto de maior risco para a saúde, instalou-se o presente experimento, seguindo a mesma metodologia citada no experimento 1, porém com os seguintes tratamentos:

- Controle;

- 3 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 25 min. em Hipoclorito de sódio;

- 6 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 25 min. em Hipoclorito de sódio;

- 12 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 25 min. em Hipoclorito de sódio;

- 24 h em Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>) + 25 min. em Hipoclorito de sódio.

### **Experimento 4: Concentrações de hipoclorito e tempo de imersão na desinfestação *in vitro* de sementes de camu-camu**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4, com 16 tratamentos, quatro repetições, cinco frascos por repetição e duas sementes por frasco, totalizando 640 sementes.

As sementes foram mantidas por 1 hora em solução fúngica constituída de Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> + Cerconil<sup>®</sup> na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>. Após, as sementes foram

lavadas em água corrente e transportadas para a câmara de fluxo laminar, onde permaneceram imersas em álcool 70% por 5 minutos. Posteriormente, as sementes foram submetidas aos tratamentos constituídos por soluções hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (0; 0,5; 1 e 2% de cloro ativo, com tween 20), por 0, 20, 40 e 60 minutos. Adicionou-se 1 gota de tween 20 na solução para auxiliar na remoção das impurezas da semente e aumentar a penetração da solução no tecido.

### **Condições de cultivo**

Ao final de cada tratamento, as sementes foram lavadas 3 vezes com água destilada e autoclavada e, imediatamente, inoculada em frasco de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura MS, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 7 g L<sup>-1</sup> de agar e 4,5 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes do processo de autoclavagem a 120 °C e 1 atm durante 20 minutos.

Após inoculação, os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas.

### **Variáveis analisadas e análise estatística**

Após 35 dias foram avaliados:

- Índice de Contaminação das sementes: determinado pela análise visual das sementes e expresso em porcentagem. Ao término das avaliações de índice de contaminação, os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento por mais 35 dias, totalizando 70 dias.

Após esse período, foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Índice de Velocidade de Germinação: foi calculado de acordo com Maguirre (1962) utilizando a seguinte fórmula:  $IVG = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots + G_n/N_n$ , onde  $G_n$  = número de sementes com protusão de raiz;  $N_n$  = número de dias da semeadura até as contagens.

- Comprimento de parte aérea e comprimento de raiz: realizado com auxílio de uma régua milimetrada. Mediu-se o comprimento da parte aérea, iniciando-se na inserção do sistema radicular até o ápice da maior folha. O comprimento da raiz foi medido em função da maior raiz presente na plântula. As medições foram expressas em cm.

- Massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz e massa fresca total: realizada com auxílio de uma balança digital de precisão e expressa em g por plântula. Retirou-se as plântulas dos frascos, foi feita uma limpeza para retirada dos restos de meio de cultura e, em seguida, procedeu-se à medição.

- Massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz, a massa seca total: realizada com auxílio de uma balança digital de precisão e expressa em g por plântula. Após todas as avaliações, as plântulas foram postas a secar em estufa de secagem por 72 horas a 60 °C. Após, retirou-se as plântulas e quantificou-se a massa seca média por plântula, expressa em g por plântula.

- Número de brotações: feita visualmente fazendo-se a contagem do número de brotos por plântulas.

Os dados obtidos foram transformados em arco seno de raiz quadrada de  $(X+0,5)$  submetidos à análise de variância, os dados qualitativos foram submetidos ao teste de tukey e os dados quantitativos à regressão polinomial, ao nível de 5% de probabilidade (GOMES, 2000). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2005).

### **Experimento 5: Cultivo *in vitro* de sementes de camu-camu sob diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4, com 12 tratamentos, quatro repetições, cinco frascos por repetição e duas sementes por frasco, totalizando 480 sementes.

As sementes foram mantidas por 1 hora em solução fúngica constituída de Derosal<sub>500</sub><sup>®</sup> (5 mL L<sup>-1</sup>) combinado com Cerconil<sup>®</sup> ( 2 g L<sup>-1</sup>). Após, as sementes foram lavadas em água corrente e transportadas à câmara de fluxo laminar, onde permaneceram imersas em álcool 70% por 5 minutos. Posteriormente, as sementes foram submetidas à solução hipoclorito de sódio a 2% por 25 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas 3 vezes com água destilada e autoclavada e, imediatamente, inoculadas em frasco de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura de acordo com os seguintes tratamentos: três meios de cultura (MS, WPM e BOXUS), combinados com diferentes concentrações de sacarose (0, 30, 60 e 90 g L<sup>-1</sup>). O meio foi acrescido 100 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 7 mg L<sup>-1</sup> de agar e 4,5 g L<sup>-1</sup> de

carvão ativado. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes do processo de autoclavagem a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 1atm durante 20 minutos.

Após inoculação, os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas.

### **Experimento 6: Cultivo *in vitro* de sementes de camu-camu sob diferentes concentrações do meio MS e de sacarose**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $4 \times 4$ , com 16 tratamentos, quatro repetições, cinco frascos por repetição e duas sementes por frasco, totalizando 640 sementes.

As sementes foram mantidas por 1 hora em solução fúngica constituída de Derosal 500<sub>500</sub><sup>®</sup> ( $5\text{ mL L}^{-1}$ ) combinado com Cerconil<sup>®</sup> ( $2\text{ g L}^{-1}$ ). Após, as sementes foram lavadas em água corrente e transportadas à câmara de fluxo laminar, onde permaneceram imersas em álcool 70% por 5 minutos. Posteriormente, as sementes foram submetidas à solução hipoclorito de sódio a 2% por 25 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas 3 vezes com água destilada e autoclavada e, imediatamente, inoculadas em frascos de 250 ml contendo 30 ml de meio, conforme os distintos tratamentos constituídos de diferentes concentrações do meio MS original (25, 50, 75 e 100%), combinados com 0, 15, 30 e  $45\text{ g L}^{-1}$  de sacarose. O meio foi acrescido de  $100\text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $7\text{ g}^{-1}$  de agar e  $4,5\text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado. Cada frasco de 250 ml foi acrescido com 30 ml de meio de cultura e o pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes do processo de autoclavagem a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 1atm durante 20 minutos.

Após inoculação, os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas.

### **Variáveis analisadas e análise estatística**

Após 70 dias da inoculação, os tratamentos foram avaliados de acordo com as variáveis abaixo:

- Comprimento de parte aérea e comprimento de raiz: realizado com auxílio de uma régua milimetrada. Mediu-se o comprimento da parte aérea, iniciando-se na

inserção do sistema radicular até o ápice da maior folha. O comprimento da raiz foi medido em função da maior raiz presente na plântula. As medições foram expressas em cm.

- Massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz e massa fresca total: realizada com auxílio de uma balança digital de precisão e expressa em g por plântula. Retiraram-se as plântulas dos frascos, fez uma limpeza para retirada dos restos de meio de cultura e, em seguida, procedeu-se a medição.

- Massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz, a massa seca total: realizada com auxílio de uma balança digital de precisão e expressa em g por plântula. Após todas as avaliações, as plântulas foram postas a secar em estufa de secagem por 72 horas a 60 °C. Após, retirou-se as plântulas e quantificou-se a massa seca média por plântula, expressa em g por plântula.

- Número de brotações: feita visualmente fazendo-se a contagem do número de brotos por plântulas.

Os dados obtidos foram transformados em arco seno de raiz quadrada de  $(X+0,5)$  submetidos à análise de variância e as médias a regressão polinomial, ao nível de 5% de probabilidade (GOMES, 2000). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR versão 5.1 (FERREIRA, 2005).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Experimento 1: Uso de fungicida e formol na desinfestação *in vitro* de sementes de camu-camu

Houve efeito significativo para os tratamentos e dias avaliados após a inoculação, isoladamente.

Constatou-se eficiência no processo de desinfestação quando as sementes foram tratadas por 12 horas de imersão em solução fúngica (Derosal<sup>®</sup> combinado com Cerconil<sup>®</sup>), posteriormente, mais 12 horas de imersão em formol e, finalmente, 25 minutos de imersão em hipoclorito de sódio (Tabela 1). Este tratamento não diferiu estatisticamente do tratamento com 3 horas de imersão em solução fúngica, seguido de 3 horas de imersão em formol e, posteriormente, 25 minutos de imersão em hipoclorito de sódio, o qual apresentou 5% de contaminação. Para os demais tratamentos, excetuando-se o controle, verificaram-se porcentagens mínimas de contaminações entre 11 e 15%. Por outro lado, para o tratamento controle, onde as sementes não foram submetidas a nenhum tratamento de desinfestação, houve 100% de contaminação das sementes (Tabela 1).

**Tabela 1** – Porcentagem de contaminação *in vitro* de embriões de camu-camu cultivados *in vitro* em meio MS sob diferentes horas de imersão em fungicida combinada com formol e hipoclorito de sódio. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

TRATAMENTOS	CONTAMINAÇÃO (%)	DESCONTAMINAÇÃO (%)
12 h Solução Fúngica + 12 h formol + 25 min. Hipoclorito de sódio	0a	100a
3 h Solução fúngica + 3 h formol + 25 min. Hipoclorito de sódio	5ab	95ab
6 h Solução fúngica + 6 h formol + 25 min. Hipoclorito de sódio	11bc	89bc
24 h Solução fúngica + 24 h formol + 25 min. Hipoclorito de sódio	15c	85c
CONTROLE	100d	0d

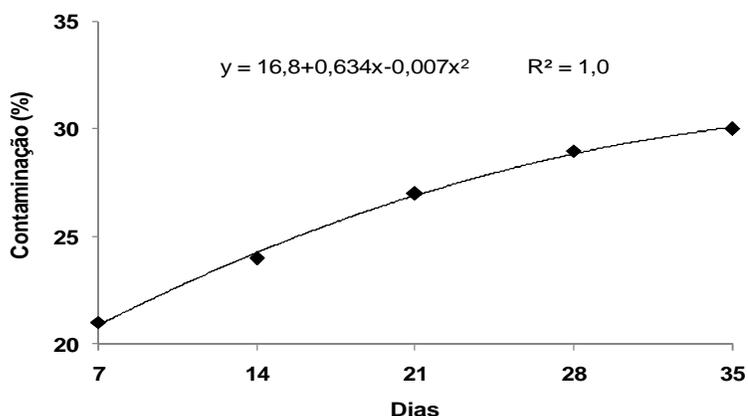
CV= 40%

Médias seguidas de letras distintas não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Solução fúngica: constituída de 5 ml L<sup>-1</sup> de Derosal<sup>®</sup> combinado com 2 g L<sup>-1</sup> de Cerconil<sup>®</sup>.

Flôres (2007) obteve resultados razoáveis na utilização dos fungicidas Thiabendazole<sup>®</sup> e Captan<sup>®</sup>, em sementes de açoita-cavalo, observando médias de contaminação fúngica de 35% a 62%. No presente trabalho as porcentagens de desinfestação foram entre 85 e 100%, evidenciando avanço no processo de desinfestação de sementes de camu-camu *in vitro*. O sucesso obtido pode ser

atribuído aos princípios ativos utilizados, Clorotalonil + Tiofanato-metílico (Cerconil<sup>®</sup>) e Carbendazim (Derosal<sup>®</sup>).

Avaliando-se a porcentagem de contaminação durante os dias de avaliação (Figura 1), observou-se um aumento nesta variável à medida que os tratamentos foram sendo avaliados até aproximadamente 35 dias após a inoculação (30%). Esse resultado pode ser explicado devido ao fato de o tratamento controle ter apresentado 100% de contaminação. Assim, houve um reflexo da porcentagem de contaminação desse tratamento (100%) na porcentagem de contaminação ao longo do tempo avaliado (Figura 1).

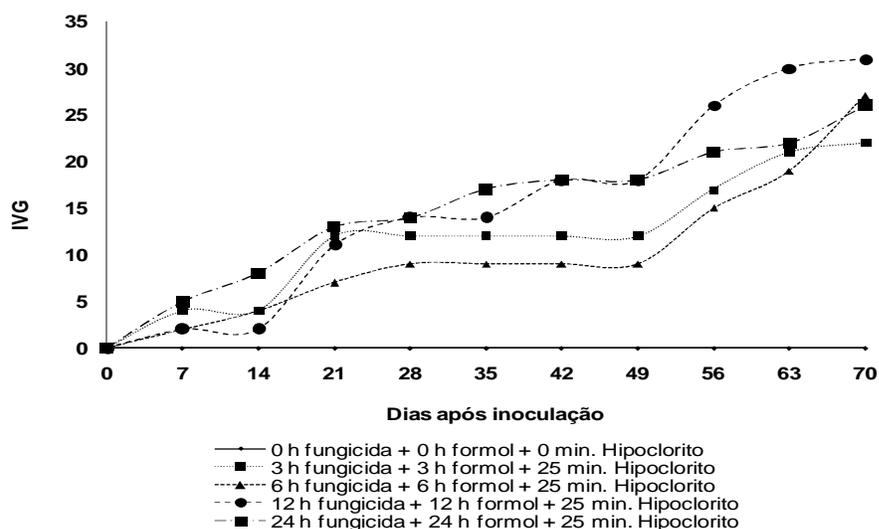


**Figura 1** – Porcentagem de contaminação de embriões de camu-camu cultivados *in vitro* em meio MS no período de 35 dias após a inoculação. Boa Vista, UFRR, RR, 2012.

Verificou-se que o uso combinado de solução fúngica + formol + hipoclorito de sódio foi eficiente para a desinfestação de sementes de camu-camu. Tal constatação também foi observada por (FIOR; PRESTES; RODRIGUES, 2005). Esses autores observaram que a utilização de formol por 2 h em *Limonium platyphyllum* Lincz foi eficiente na descontaminação. Contudo, os autores ressaltam que houve interferência na regeneração de brotações do material *in vitro*. No presente trabalho não foi observado tal efeito sobre a germinação e crescimento das plântulas *in vitro* (Figura 1).

Quanto ao índice de velocidade de germinação (Figura 2), observou-se que o tratamento em que sementes foram tratadas por 12 horas em solução fúngica, mais 12 horas em formol e, posteriormente mais 25 minutos em hipoclorito de sódio, foi o

que apresentou maior IVG, 31 sementes, seguido do tratamento em que as sementes foram tratadas por 6 horas em solução fúngica mais 6 horas em formol e, posteriormente mais 25 minutos em hipoclorito, atingindo um IVG de 27 sementes.



**Figura 2** – Índice de Velocidade de Germinação de sementes de camu-camu cultivadas *in vitro* em meio MS. UFRR, Boa Vista, RR 2012.

Por outro lado, o tratamento utilizado como controle, apresentou 100% de contaminação das sementes, o que explica o IVG igual a 0 (Figura 2).

Substâncias utilizadas para desinfestação dos explantes em cultura de tecidos podem interferir no processo de divisão celular e conseqüentemente no desenvolvimento de plantas normais. Os efeitos positivos de fungicidas para desinfestação foram observados na desinfestação e na regeneração de segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa* (FLORES; MALDANER; NICOLOSO, 2006). Estes autores verificaram a eficácia de soluções contendo fungicida benomyl, álcool etílico, hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio. Resultado semelhante também foi obtido por Salgado *et al.* (2001). Estes autores observaram que somente os tratamentos utilizando o fungicida benomyl aumentaram a quantidade de matéria verde de plantas de crisântemo (*Dendranthema morifolium*). No presente trabalho, também foi observada a eficiência da combinação de solução fúngica, formol e hipoclorito de sódio.

## Experimento 2: Desinfestação *in vitro* de sementes de camu-camu: uso combinado de fungicida e formol

Não houve interação significativa entre os tratamentos e tempo de avaliação testada. Porém, verificou-se efeito significativo para os fatores tratamentos e dias após a inoculação, isoladamente.

Em relação aos tratamentos utilizados, o melhor resultado obtido, 7% de contaminação, foi observado quando as sementes foram submetidas a 3 horas de imersão em solução fúngica + 3 horas de imersão em formol + 25 minutos de imersão em hipoclorito de sódio. Contudo, este não diferiu estatisticamente dos tratamentos com 4 horas de imersão em fungicida + 4 horas de imersão em formol + 25 minutos de imersão em hipoclorito, o qual apresentou 11% de contaminação (Tabela 2).

**Tabela 2** – Porcentagem de contaminação *in vitro* de embriões de camu-camu cultivados *in vitro* em meio MS sob diferentes horas de imersão em fungicida combinada com formol e hipoclorito de sódio. Boa Vista, UFRR, RR 2012.

TRATAMENTO	CONTAMINAÇÃO (%)	DESCONTAMINAÇÃO (%)
3 h Solução fúngica + 3 h formol + 25 min. Hipoclorito de Sódio	7 a	93 a
4 h Solução fúngica + 4 h formol + 25 min. Hipoclorito de Sódio	11 ab	89 ab
5 h Solução fúngica + 5 h formol + 25 min. Hipoclorito de Sódio	17 abc	83 abc
1 h Solução fúngica + 1 h formol + 25 min. Hipoclorito de Sódio	21 bc	80 bc
6 h Solução fúngica + 6 h formol + 25 min. Hipoclorito de Sódio	20 c	79 bc
2 h Solução fúngica + 2 h formol + 25 min. Hipoclorito de Sódio	29 c	71 c
CONTROLE	100 d	0 d

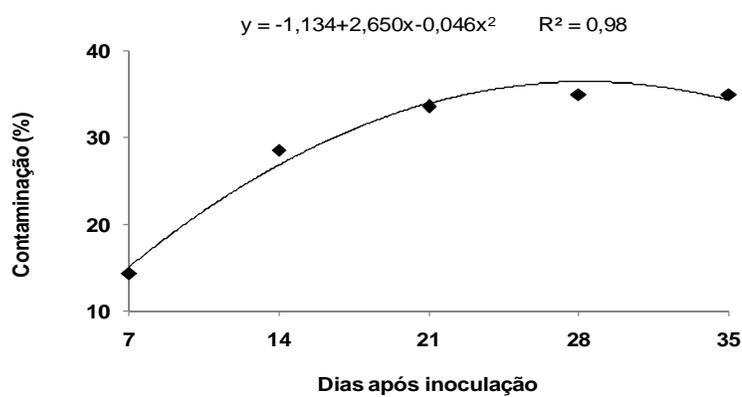
CV=40%

Médias seguidas de letras distintas não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Solução fúngica: constituída de 5 mL L<sup>-1</sup> de Derosal<sup>®</sup> combinado com 2 g L<sup>-1</sup> de Cerconil<sup>®</sup>.

De modo geral, todos os tratamentos testados foram eficientes na desinfestação de sementes de camu-camu onde se observou porcentagens de descontaminações entre 71 a 93% (Tabela 2). A eficiência dos tratamentos é evidenciando quando se compara os tratamentos com o tratamento controle, onde houve 100% de contaminação.

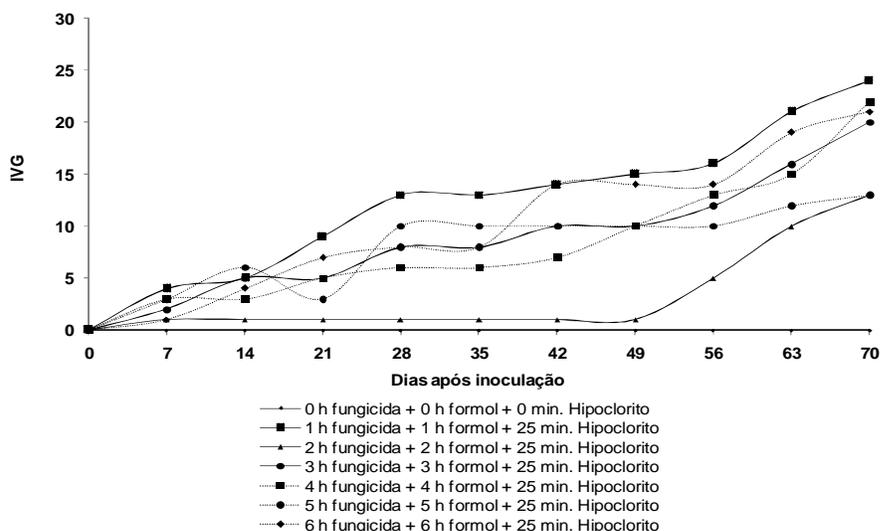
Em relação ao fator dias após inoculação, observou-se que a menor contaminação foi obtida aos 7 dias (15%). Para os demais dias de avaliação, houve

aumento da porcentagem de contaminação até os 28 dias, atingindo 39% de contaminação. A partir daí, observou-se uma tendência de diminuição da contaminação (Figura 3). Esse resultado, provavelmente, ocorreu em função dos valores verificados para o tratamento controle em que houve 100% de contaminação e esta constatação também foi verificada no momento das avaliações, onde se observaram que as contaminações tendem a aumentar com o tempo de incubação em sala de crescimento nos recipientes com problema de assepsia.



**Figura 3** – Porcentagem de contaminação de embriões de camu-camu cultivados *in vitro* em meio MS no período de 35 dias após a inoculação. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Verificou-se para o tratamento no qual as sementes ficaram por 1 hora em fungicida + 1 hora em formol + 25 minutos em hipoclorito, um IVG de 24, ao final de 70 dias. Para o tratamento em que as sementes foram imersas em fungicida por 4 horas + em formol por 4 horas + 25 minutos em hipoclorito, o IVG foi de 22. No tratamento em que as sementes ficaram por 6 horas em fungicida + 6 horas em formol + 25 minutos em hipoclorito, o IVG foi de 21 sementes. Verificou-se para o tratamento em que as sementes foram imersas em fungicida por 3 horas + formol por 3 horas + 25 minutos em hipoclorito, um IVG de 20. Ao final dos 70 dias de inoculação, os tratamentos em que as sementes foram imersas em fungicida por 5 horas + formol por 5 horas + hipoclorito por 25 minutos e em fungicida por 2 horas + formol por 2 horas + hipoclorito por 25 minutos, respectivamente, apresentaram o mesmo IVG semelhante (13) (Figura 4).



**Figura 4** – Índice de Velocidade de Germinação de sementes de camu-camu cultivadas *in vitro* em meio MS. Boa Vista, UFRR, RR 2012.

Estas substâncias utilizadas para desinfestação dos explantes não afetaram o vigor das sementes mensurado pelo IVG. As reservas endógenas das sementes, juntamente com a ação promotora de germinação e de quebra de dormência do hipoclorito de sódio, provavelmente influenciaram na germinação do camu-camu.

### **Experimento 3: Aplicação combinada de fungicida e hipoclorito de sódio na desinfestação *in vitro* de sementes de camu-camu**

Não houve interação significativa entre os fatores testados. Houve efeito significativo apenas para os fatores tratamentos e dias após a inoculação, isoladamente.

De acordo com a Tabela 3, notou-se que os tratamentos com 6 horas de imersão em solução fúngica + 25 minutos de imersão em hipoclorito de sódio e 12 horas de imersão em solução fúngica + 25 minutos de imersão em hipoclorito de sódio apresentaram apenas 14% de contaminação, o que proporcionou 86% de desinfestação das sementes. Os demais tratamentos não diferiram entre si, exceto do tratamento controle, onde se verificou 100% de contaminação. Esse resultado já era esperado uma vez que os meios de cultura possuem todos os elementos essenciais para o crescimento de fungos e bactérias. Assim, em geral, faz-se

necessária o uso de diferentes agentes descontaminantes para que seja possível a desinfestação e o estabelecimento de explantes em condições *in vitro*.

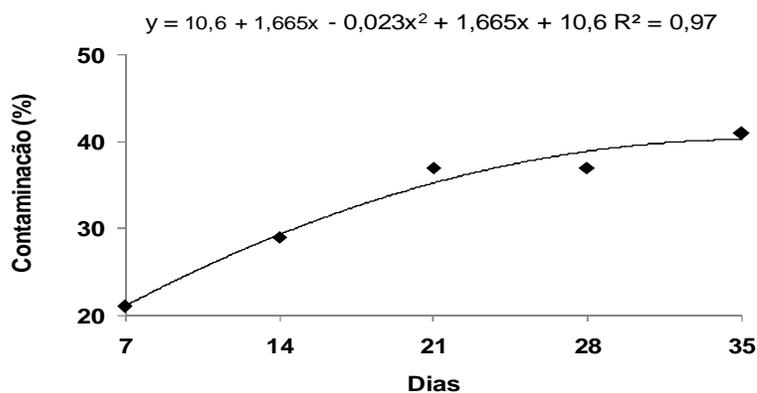
**Tabela 3** – Porcentagem de contaminação *in vitro* de embriões de camu-camu cultivados *in vitro* em meio MS sob diferentes horas de imersão em fungicida combinada com formol e hipoclorito de sódio. Boa Vista, UFRR, RR 2012.

TRATAMENTOS	CONTAMINAÇÃO(%)	DESCONTAMINAÇÃO(%)
6 h Solução fúngica + 25 min. Hipoclorito de Sódio	14 a	86 a
12 h Solução fúngica + 25 min. Hipoclorito de Sódio	14 a	86 a
24 h Solução fúngica + 25 min. Hipoclorito de Sódio	15 ab	85 ab
3 h Solução fúngica + 25 min. Hipoclorito de Sódio	22 b	78 b
CONTROLE	100 c	0 c

CV=25%

Médias seguidas de letras distintas não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Solução fúngica: constituída de 5 mL L<sup>-1</sup> de Derosal<sup>®</sup> combinado com 2 g L<sup>-1</sup> de Cerconil<sup>®</sup>.

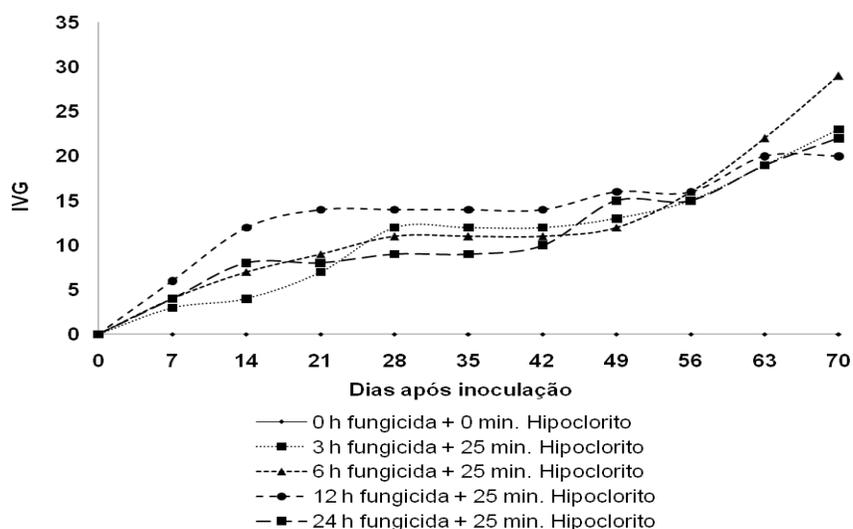
De acordo com a Figura 5, observou-se que a menor taxa de contaminação, 21%, foi obtida aos 7 dias. Após esse período houve um crescimento na contaminação, chegando a 41% ao final de 35 dias após a inoculação. Essa porcentagem de contaminação ao final das avaliações pode ser explicada devido ao fato de o tratamento controle ter apresentado 100% de contaminação e esse valor ter diluído nos outros tratamentos.



**Figura 5** – Porcentagem de contaminação de embriões de camu-camu cultivados *in vitro* em meio MS no período de 35 dias após a inoculação. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Conforme podemos notar na Figura 6, o tratamento com 6 horas de imersão em fungicida + 25 minutos de imersão em hipoclorito, apresentou IVG de 29 sementes ao final de 70 dias. Verificou-se para o tratamento, o qual as sementes ficaram em fungicida por 3 horas + hipoclorito por 25 minutos, um IVG de 23 sementes. Para o tratamento em que as sementes ficaram 24 horas em fungicida + 25 minutos em hipoclorito, o IVG observado foi de 22 sementes. No tratamento em que as sementes foram imersas por 12 horas em fungicida + 25 minutos em hipoclorito, e verificou-se IVG de 20 sementes.

O hipoclorito de sódio pode agir como um promotor da germinação e da quebra de dormência. Isto demonstra que esta substância pode escarificar o tegumento, aumentando sua permeabilidade à água, oxigênio e a solutos, como facilitar a remoção ou oxidação de inibidores de germinação (HISIÃO; WORSHAM; MORELAND, 1981).

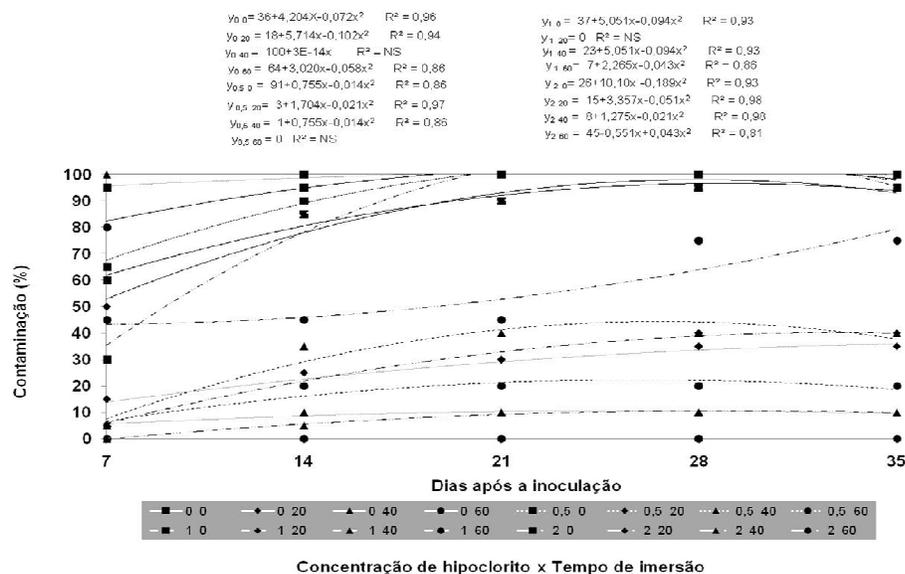


**Figura 6** – Índice de Velocidade de Germinação de sementes de camu-camu cultivadas *in vitro* em meio MS. Boa Vista, UFRR, RR 2012.

#### **Experimento 4: Concentrações de hipoclorito e tempo de imersão na desinfestação *in vitro* de sementes de camu-camu**

De acordo com a Figura 7, notou-se que os tratamentos em que as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo por 20 minutos, 0,5% por 60 minutos e 1,0% por 20 minutos, foram os que apresentaram maiores taxas de

desinfestação ao final de 35 dias após a inoculação, alcançando 0% de contaminação. Por outro lado, maiores porcentagens de contaminações foram obtidas nos tratamentos utilizados como controle em que não se utilizou hipoclorito de sódio, ou seja, as sementes ficaram imersas em água destilada. Esse resultado evidencia a eficiência do hipoclorito de sódio na desinfestação e controle da sanidade do material introduzido *in vitro*.



**Figura 7** – Porcentagem de contaminação de sementes de camu-camu cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão em meio MS, no período de 35 dias após a inoculação. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

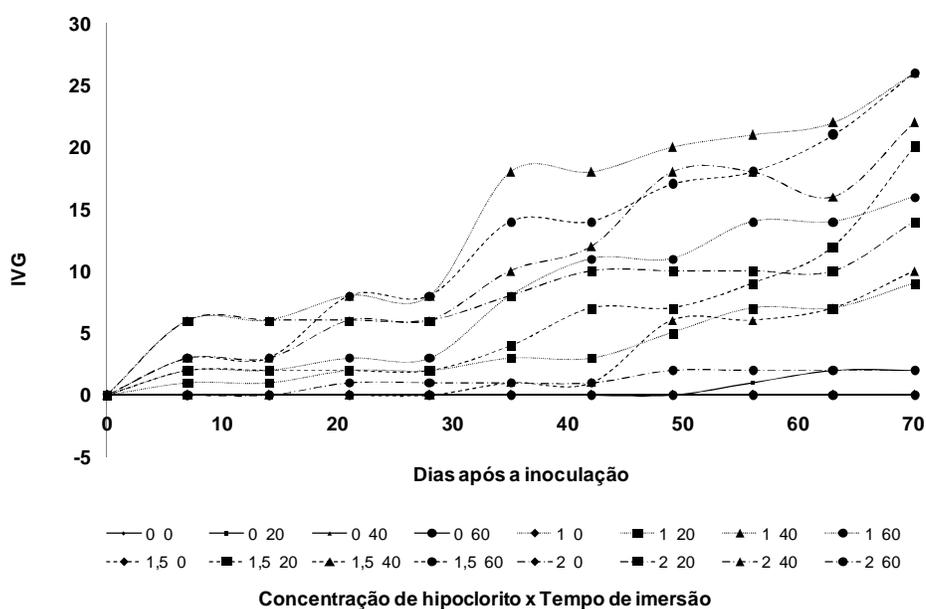
Picolotto *et al.* (2007) demonstraram a eficiência de 5% de cloro ativo na desinfestação de sementes de jaboticabeira. Estes resultados corroboram com os encontrados por Coutinho *et al.* (2000), os quais observaram que os valores de germinação de conídios fúngicos nos tratamentos que foram utilizadas as concentrações de 1,0; 2,0 e 5,0% foram inferiores ao do tratamento em que foi empregada a concentração de 0,5% do produto.

No presente trabalho, provavelmente, a rapidez entre a coleta dos frutos, a retirada das sementes e sua imediata inoculação *in vitro*, proporcionaram excelentes resultados de desinfestação nas concentrações mais baixas de hipoclorito, quando comparado aos resultados encontrados por outros autores. Isso é importante, pois

permite a economia de material de laboratório, diminuindo os custos e aumentando a eficiência do processo de inoculação *in vitro*.

Quanto ao IVG (índice de velocidade de germinação), verificou-se que as concentrações mais baixas de cloro ativo não afetaram o vigor das sementes. Verificou-se no presente trabalho que o IVG das sementes submetidas aos tratamentos com 0,5% e 1% de cloro ativo foi superior ao observado no tratamento com 2% de cloro ativo (Figura 8) apresentando IVG de 26 sementes. Provavelmente a alta concentração do produto pode ter apresentado efeito tóxico às sementes.

Segundo Rocha (2005), o hipoclorito de sódio pode aumentar a porcentagem de germinação, devido a ação do produto ser resultante de modificações nas propriedades das membranas celulares do tegumento ou no fornecimento de oxigênio adicional para a semente.

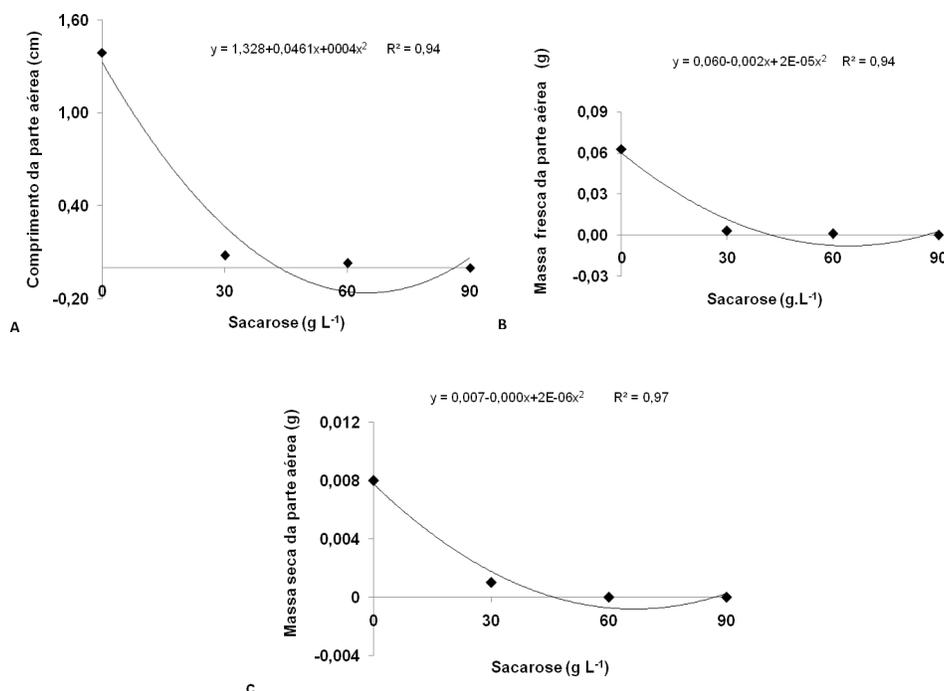


**Figura 8** – Índice de Velocidade de germinação (IVG) de sementes de camu-camu cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempo de imersão em meio MS, no período de 70 dias após a inoculação. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

### Experimento 5: Cultivo *in vitro* de sementes de camu-camu sob diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose

Houve efeito significativo da adição de sacarose no meio de cultura para todas as variáveis analisadas.

Conforme se pode observar na Figura 12, houve uma diminuição dos valores de todas as variáveis estudadas com o aumento da concentração de sacarose. Maior comprimento de parte aérea (1,3 cm) foi obtido na ausência de sacarose (Figura 12A). Comportamento semelhante também foi observado para massa fresca (Figura 12B) e massa seca da parte aérea (Figura 12C) de plântulas, os quais apresentaram 0,06 g e 0,007 g de massas fresca e seca da parte aérea, respectivamente.



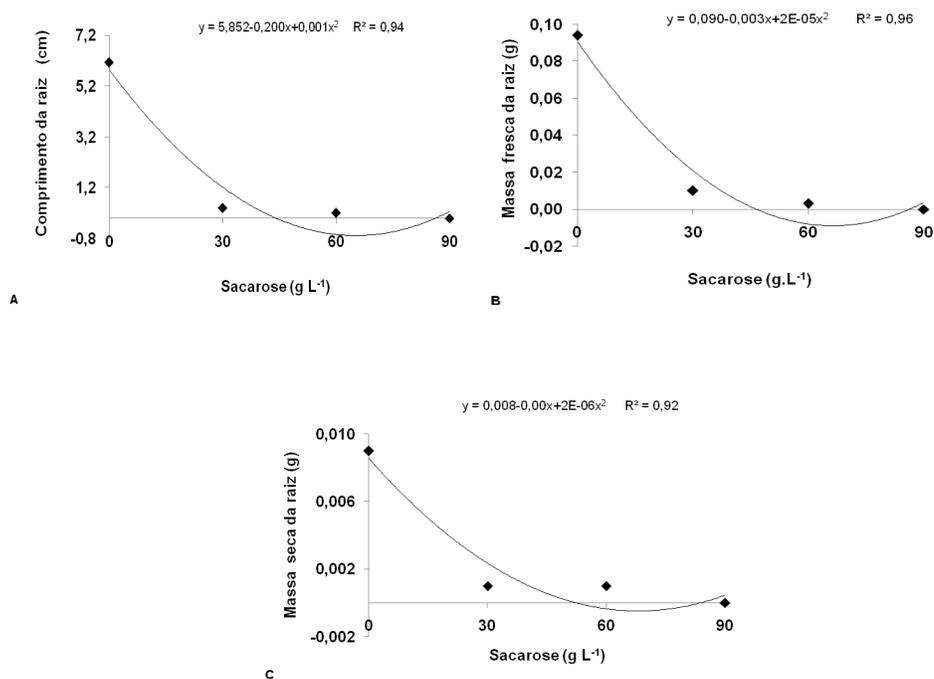
**Figura 12** - Comprimento da parte aérea 12A, Massa fresca da parte aérea 12B, Massa seca da parte aérea 12C de plântulas de camu-camu cultivadas *in vitro* em meio MS, WPM e BOXUS sob diferentes concentrações de sacarose, no período de 70 dias após a inoculação. UFRR, Boa Vista, RR 2012.

Diante dos resultados expostos é notória a utilização das reservas cotiledonares pelas sementes, motivo pelo qual essas se desenvolveram sem a

adição de sacarose. Entretanto, o acréscimo da concentração de sacarose no meio de cultura, pode ter influenciado a osmolaridade da semente, inibindo assim o seu desenvolvimento.

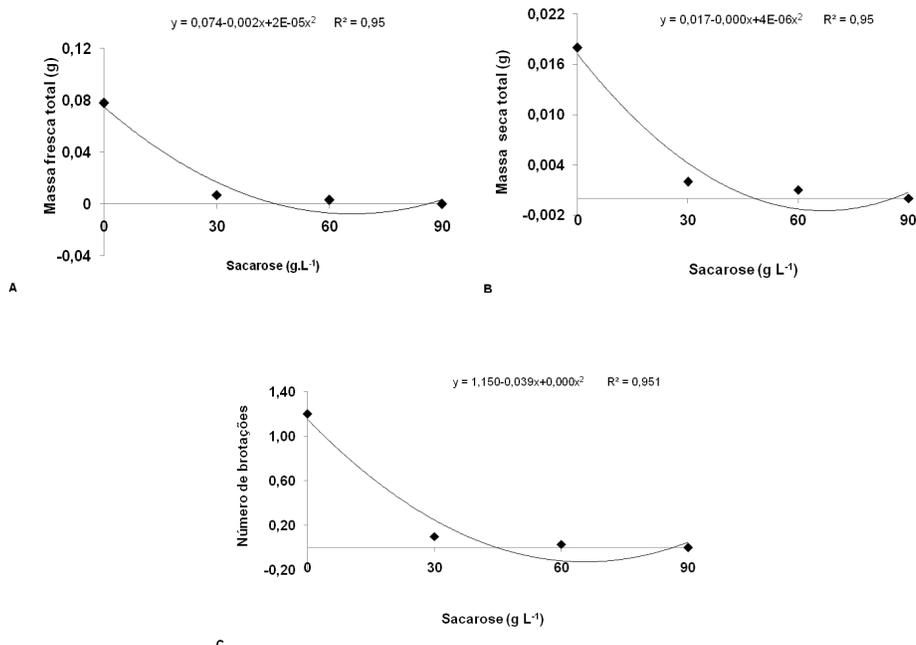
Resultados semelhantes foram obtidos por Pasqual *et al.* (2002b) em trabalhos realizados com embriões imaturos de tangerina “poncã”. Estes autores observaram que na ausência e em concentrações baixas de sacarose, as plântulas de tangerina *in vitro* apresentaram as maiores taxas de crescimento para as características de massa de matéria seca das raízes.

À medida que foram elevadas as concentrações de sacarose no meio de cultura, as variáveis comprimento (Figura 13A), massa fresca (Figura 13B) e massa seca de raiz (Figura 13C), apresentaram valores estatisticamente inferiores, sendo os melhores resultados observados na ausência de sacarose, assim como verificado na figura 12.



**Figura 13** - Comprimento da raiz 13A, Massa fresca da raiz 13B, Massa seca da raiz 13C de plântulas de camu-camu cultivadas *in vitro* em meio MS, WPM e BOXUS sob diferentes concentrações de sacarose, no período de 70 dias após a inoculação. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Comportamento semelhante foi observado para as variáveis massa fresca total (Figura 14A), massa seca total (Figura 14B) e número de brotações (Figura 14C), em que os melhores resultados apresentados foram obtidos na ausência de sacarose. Para essas características também houve um decréscimo à medida que se elevou a concentração de sacarose.



**Figura 14** - Massa fresca total 14A, Massa seca total 14B, Número de brotações 14C de plântulas de camu-camu cultivadas *in vitro* em meio MS, WPM e BOXUS sob diferentes concentrações de sacarose, no período de 70 dias após a inoculação. UFRR, Boa Vista, RR 2012.

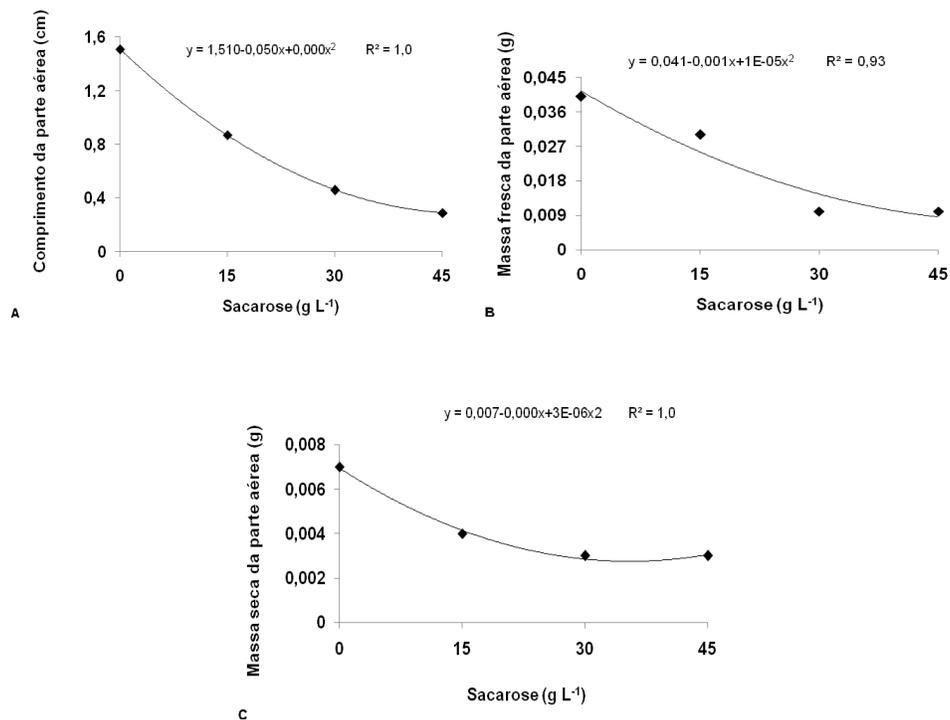
As concentrações mais apropriadas de sacarose adicionadas ao meio de cultivo variam de acordo com a espécie, com o ambiente nos quais serão mantidos os frascos, com o estágio da micropropagação e com a possibilidade de fornecerem-se outras fontes de carbono aos explantes (PEREIRA *et al.*, 2007). Observa-se na figura 15, a germinação e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de camu-camu, cultivadas em meio MS, aos 70 dias após a inoculação.

### **Experimento 6: Cultivo *in vitro* de sementes de camu-camu sob diferentes concentrações do meio Ms e de sacarose**

Não houve interação significativa entre os fatores testados. Apenas o fator de sacarose apresentou efeito significativo para todas as variáveis estudadas.

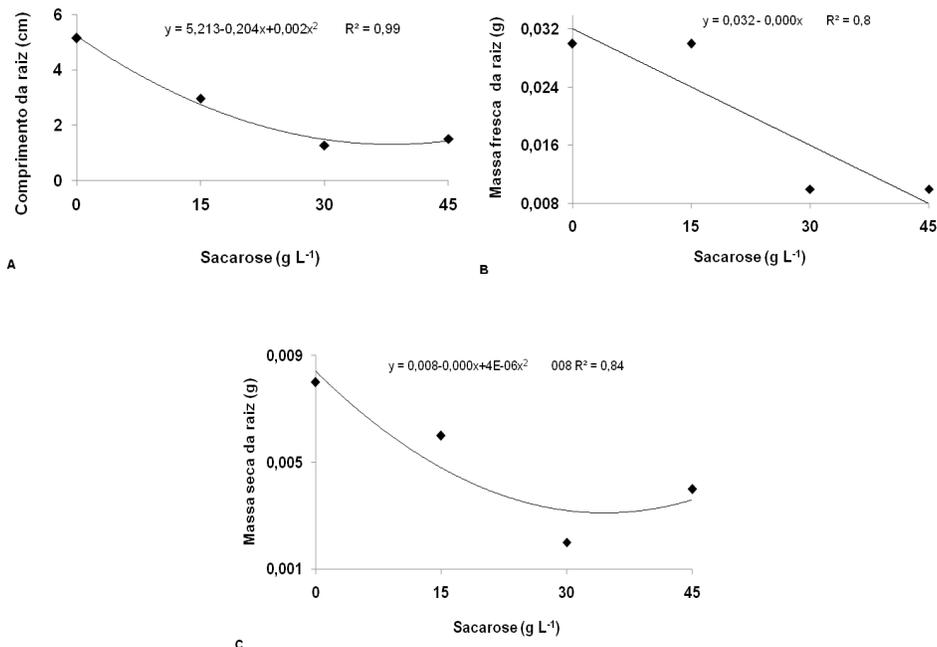
Conforme podemos observar na Figura 14, houve uma diminuição de todas as variáveis estudadas com o aumento da concentração de sacarose. Maior comprimento de parte aérea (1,5 cm) foi obtido na ausência de sacarose (Figura 16A). Comportamento semelhante também foi observado para massa fresca (Figura 16B) e massa seca da parte aérea (Figura 16C) de plântulas, os quais apresentaram 0,041 g e 0,007 g de massas fresca e seca da parte aérea, respectivamente.

O acréscimo nas concentrações de sacarose no meio de cultivo reduziu o comprimento, a quantidade de massa fresca e seca da parte aérea, devido ao aumento do potencial osmótico da semente, dificultando dessa maneira a absorção de sais e de água. Segundo Kozai e Nguyen (2003), a presença de fontes externas de carbono para o explante desfavorece o desenvolvimento de autotrofia das plântulas, diminuindo o crescimento e podendo levar as plântulas à morte pela falta de fotossíntese.



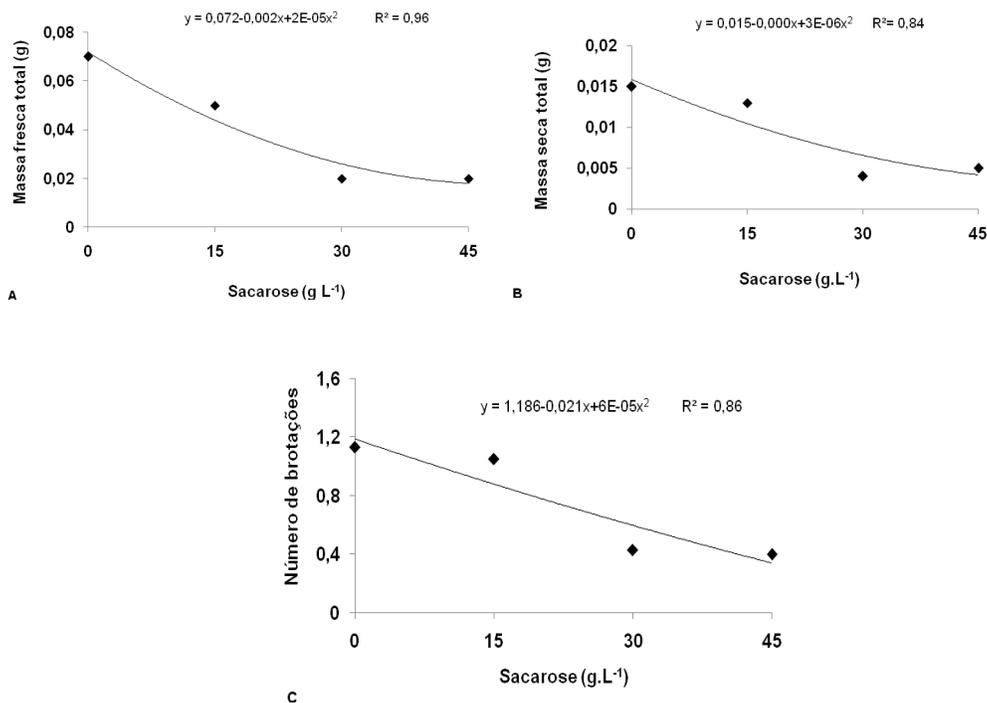
**Figura 16** – Comprimento da parte aérea 16A, Massa fresca da parte aérea 16B, Massa seca da parte aérea 16C de plântulas de camu-camu cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio MS e sob diferentes concentrações de sacarose, no período de 70 dias após a inoculação. UFRR, Boa Vista, RR 2012.

Em relação ao comprimento (Figura 17A), massa fresca (Figura 17B) e massa seca de raiz (Figura 17C), notou-se que os melhores resultados foram obtidos na ausência de sacarose. Para essas variáveis verificou-se que houve um decréscimo à medida que se elevou a concentração de sacarose no meio de cultura, assim como também foi observado na figura 16.



**Figura 17-** Comprimento da raiz 17A, Massa fresca da raiz 17B, Massa seca da raiz 17C de plântulas de camu-camu cultivadas *in vitro* em meio MS, WPM e BOXUS sob diferentes concentrações de sacarose. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Comportamento semelhante foi observado para as variáveis, massa fresca total (Figura 18A), massa seca total (Figura 18B) e número de brotações (Figura 18C), em que os melhores resultados foram obtidos na ausência de sacarose, os quais apresentaram 0,072 g, 0,015 g e 1,2 de massa fresca total, massa seca total e número de brotações respectivamente. Para essas variáveis também houve um decréscimo à medida que se elevou a concentração de sacarose.



**Figura 19** - Massa fresca total 19A, Massa seca total 19B, Número de brotações 19C de plântulas de camu-camu cultivadas *in vitro* em meio MS, WPM e BOXUS sob diferentes concentrações de sacarose. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Os resultados obtidos no presente experimento estão de acordo com Nunes *et al.* (2008), em que o processo de germinação de sementes *in vitro*, ocorre em razão das reservas nutricionais dos cotilédones. Segundo esses autores, o desenvolvimento das sementes e embriões ocorre independente do fornecimento de sacarose.

## 6 CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais, e com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- A utilização de fungicida combinado com formol e hipoclorito foi eficiente na desinfestação de sementes de camu-camu, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando as sementes foram imersas por 3 horas em fungicida + 3 horas em formol + 25 minutos no hipoclorito.
- O uso de fungicida por 6 horas seguidas de imersão em hipoclorito por 25 minutos, sem adição de formol, pode ser utilizado na assepsia das sementes de camu-camu.
- A utilização de hipoclorito de sódio para desinfestação de sementes de camu-camu na concentração de 0,5 a 1% de cloro ativo por 20 e 60 minutos mostraram-se eficiente.
- Os produtos utilizados na desinfestação das sementes não foram prejudiciais à germinação das sementes.
- Não houve acréscimo das variáveis analisadas no crescimento de camu-camu *in vitro* com a adição de sacarose nos meios de cultura MS, WPM e BOXUS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIGUE, M. L.; MADRUGA, M. S.; FIOREZE, R.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. **Aspecto da ciência e tecnologia de alimentos**. Ed. UFPB, v.1, João Pessoa, 198p. 2002.

ALFENAS, A. C.; DEMUNER, N. L.; SILVA, A. R. Resistência de *Cylindrocladium scoparium*, agente etiológico de podridão de estacas de *Eucalyptus* a benomyl. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, n.158. 1987.

ALVES, R. E.; BORGES, M. F.; MOURA, C. F. H. Camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H.B.K) McVaugh). In: ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. A. C.; **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal: FUNEP, p. 23-26, 2000.

ANDRADE, S. R. M.; OLIVEIRA, W. C. O.; CHARCHAL, M. J. D'A.; LOPES, J. D.; FALEIRO, F. G.; ANJOS, J. R. N.; PEIXOTO. **Micropropagação de gemas laterais de mangueira: Controle do crescimento de fungos**. In: II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, 2008.

BARG, R.; UMIEL, N. Effects of sugar concentrations on growth, greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of tobacco. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.81, p.161-166, 1977.

BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.2, p.177-179, 2003.

CARDOSO, J. N. O. **CONVERSÃO IN VITRO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE HÍBRIDOS DE DENDEZEIRO (ELAIS GUINEENSIS X E.OLEIFERA) EM PLÂNTULAS**. 2010. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; LEITE, J. C. A.; SILVA, F. L. H. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2 - 2º Semestre 2004.

CHÁVEZ FLORES, W. B. A importância do camu-camu. **Toda fruta**, v.3, n.27, p.37-7, 1988.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

COSTA DA SILVA, F. W. **Efeito de fitorreguladores e de substratos na propagação vegetativa de camu-camu, por meio de estacas**. 50p. 2009, Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A.; SILVA, O. F.; PENA, R. C. M.; MAGALHÃES, F. H. L. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por semente. **Revista Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 552-555, 2000.

DEC CETI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade federal de Lavras, Lavras, 2000.

DONINI, L. P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J.A. DE; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 5.1** - Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, Porto Velho, v.2, n.2, p.37-44, 2009.

FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Armazenamento de sementes de camu-camu (*Myrciaria dúbia*) com diferentes graus de umidade e temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.440-442, 2003.

FIOR, C. S.; PRESTES, C. G.; RODRIGUES, L. R. Desinfestação com paraformaldeído no cultivo *in vitro* de *Limonium platyphyllum* Lincz. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, MG, v. 1, n. 1, p. 24-30, 2005.

FLÔRES, A. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini).** 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.

FREITAS, C. A. S; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C; FIGUEIREDO, R. W; SOUSA, P. H. M. Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n.4, p.395-400, 2006.

FREITAS, D. V. Ç.; CONTIM, L. A. S. Ç.; DIAS, D. P. Ç.; FERREIRA, W. C. Ç.; SANTOS, R. C. ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke): EFEITO DO BENOMYL COMO REGULADOR DE CRESCIMENTO. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v.7, n.13, p.489-496, 2011.

GAO, J., HOFSTRA, G.; FLETCHER, R. A. Anatomical changes induced by triazoles in wheat seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v.66; n.1178, p.1185, 1988.

GARCÍA, J.L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.95-100, 2002.

GAUTHERET, R. J. Culture du tissue cambial. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie**, v. 198, p.2195-2196, 1934.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: F. P. Gomes, 477 p, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres AC & Caldas LS (Ed.) **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, EMBRAPA/CNPH, p.99- 169, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L. S. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA- CNPH, 183-260p,1998.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, R.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles e practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002, p.880.

HISIÃO, A. I.; WORSHAM, A. D.; MORELAND, D. E. Effects of sodium hypochlorite and certain plant growth regulators on germination of witchweed (*Striga asiatica*) seeds. **Weed Science**, Champaing, v.29, n.1, p. 98-100, 1981.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: Jain SM & Ishii K (Eds.) Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht, **Kluwer Academic**. p.757-78, 2003.

KUMAR, A.; BENDER, L.; NEUMANN, K. H. Growth regulation, plastid differentiation and the development of a photosynthetic system in cultured carrot root explants as influenced by exogenous sucrose and various phytohormones. **Plant Cell, Tissue and Organ Tissue Culture**, v.4, p.11-28, 1984.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento "*in vitro*" do porta - enxerto de pereira ohxf 97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, 2000.

LEROUX, P. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. **Comptes Rendus Biologies**, v.326, p.9-21, 2003.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (musa aaa cv. caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, n.3, p.181-186, 2006.

LIRA JUNIOR, J. S.; BESERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F. **Pitangueira**. Recife: Empresa pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, 2007. 87p.

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**, Carlisle, v. 30, p. 421-427, 1980.

MAEDA, R. N.; ANDRADE, J. S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. **Acta Amazônica**, V.33, n. 3, p.489-498, 2003.

MAGUIRRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison. v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36. n. 4. 1201- 1206 p, 2006.

MCVAUGH, R. Botany of the Guyana highland. Party VIII. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v.18, n.2, p.55-286, 1969.

MELO, N. F.; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n.1, p. 102-107, 1999.

MENDOZA, O.; PICÓN, C.; GONZÁLES T. J.; CÁRDANAS M. R.; PADILLA T. C.; MEDIÁVILLA G. M.; LLERAS, E.; DELGADO F. F. Informe de la expedición de recolección de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia*) en la amazonía peruana. **Informe Técnico nº11**. Programa de Investigación en Cultivos Tropicales. INIA. Lima. p.19. 1989.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.2, p.39-44, 2007.

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

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 33. 109-120 p. 2004.

NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. G. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.1, p.9-14, 2008.

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

OZAIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.: evidence for somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v.110, p.95-105, 1982.

PASQUAL, M. **Introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 97p, 2001.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; FINOTTI, D. R.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'poncã': concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, v.49, n.282, 2002.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Acaiá Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31,;p.32-336, 2007.

PEREIRA, B.G. **Produção de mudas de camu-camu por estaquia utilizando ramos provenientes de diferentes tipos e posição da planta**. 53f. 2002. Monografia (Ciências Agrárias) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2002.

PEREIRA, R. C. A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex roemer & Schultes Dc e *Uncaria guianensis* ( Aublet) Gmelin ( Unha de Gato)**. 186 p. 2004. Tese ( Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

PETERS, C.M.; VASQUEZ, A. Estudios ecológicos de camu camu (*Myrciaria dubia*). I. Producción de frutos en poblaciones naturales. **Acta Amazonica**, Manaus, v.16/17. n. único. 161-174p, 1987.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. **Scientia Agraria**, v.8, n.1, p. 19-23, 2007.

PICÓN BAOS, C.; DELGADO DE LA FLOR, F.; PADILHA TRUEBA, C. Descriptores de camu-camu. Lima: INIA, **Programa Nacional de Cultivos Tropicales**. 55p. (INIA. Informe Técnico, 8). 1997.

PINEDO, A. R. **Manutenção dos atributos de qualidade do camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H.B.K) McVaugh) desidratado, durante armazenamento**. Universidade Estadual de campinas. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), 2002.

PINEDO, M.; LINARES, C.; MENDOZA, H.; ANGUIZ, R. **Plan de mejoramiento genético de camu camu**. Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP, 54p, 2004.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS DE *Aspidosperma polyneuron*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 115-122, 2002.

RIBEIRO, S. I.; MOTA, M. G.; PADINHA, M. L. Recomendações para o cultivo do Camucamuzeiro (*Myrciaria dúbia* H. B. K.) Mc Vaugh no Estado do Pará. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. **Circular Técnica**, v.31, p.9. 2002. <http://www.cpatu.embrapa.br/online/circular/Circ.tec.31.pdf>

ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 74f. 2005. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RODRIGUES, R. B.; MARX, F. Camu camu [*Myrciaria dúbia* (H. B. K.) Mc Vaugh]: a promising fruit from the Amazon Basin. **Nutrition**, v. 30, n. 9, p. 376-381, 2006.

RODRIGUES, R. B.; MENEZES, H. C.; CABRAL, L. M. C.; DORNIER, M.; RIOS, G. M.; REYNES, M. Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu-camu juice (*Myrciaria dúbia*). **Journal of Food Engineering**, 63, p.97 – 102, 2003.

SALGADO, S. M. L.; CUNHA, R. L.; NIELLA, G. R.; TEIXEIRA, H.; PASQUAL, M. Efeito da utilização de TDZ e benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 274-280, 2001.

SANTANA, S. C. **Propagação vegetativa, por meio de estaquia e enxertia com diferentes porta-enxertos de Myrtaceae, para camu-camu (*Murciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh)**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual da Amazônia/INPA.1998.

SANTOS DA ROSA, J. **Desenvolvimento de método rápido para análise de vitamina C por Cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de troca iônica**. 2005. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Rio de Janeiro. 2005.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: Propagação de plantas frutíferas. 1ª ed.. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológicas**. 155-173p, 2005.

SILVA, A. L.; FRANCO, E. T. H.; BISOGNIN, D. A.; DORNELLES, E. B.; WALTER, J.M. Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n.3, p.369-371, 2005b.

SILVA, F.V.C., CASTRO, A. M., CHAGAS, E. A., PESSONI, L. A. Propagação vegetativa de camu-camu por estaquia: efeito de fitorregulador e substratos. **Agro@ambiente On-line**, v.3, n.2, p.92-98, 2009.

SILVA, L. V.; FUMAGALI, E.; SOUTO, E. R.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B. Utilização de fungicidas sistêmicos para descontaminação de sementes de *Aspidosperma ramiflorum* para germinação *in vitro*. **Arq Mudi**. V.11(Supl 3); P.94-95, 2007.

SILVA, P. C.; DIAS, J. M. M.; NEVES, J. C. L.; SALOMÃO, L. C. S.; COUCEIRO, M. A. **Protocolo para desinfestação de sementes de tangerineira Cleópatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan.)**. Disponível em <[http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais\\_xvii\\_cbf/fitotecnia/317.htm/](http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/317.htm/)> . Acesso em mar. 2005a.

SILVA, V. X.; DURIGAN, M. F. B.; FUGITA, E.; CHAGAS, E. A.; NEVES, L. C. **Determinação da formulação e caracterização da polpa e do picolé de camu-camu (*Myrciaria dúbia* mc vaugh)**. SLACA: Simpósio Latino Americanos de ciências de alimentos, Campinas, São Paulo, Brasil, 2011a.

SILVA, V. X.; DURIGAN, M. F. B.; RIBEIRO, M. I. G.; LIMA, C. G. B.; PORTO, W. S.; CHAGAS, E. A. **Aceitação de 5 diferentes formulações de picolé de camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H.B.K) Mc VAugh)**. SLACA: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, Campinas, São Paulo, Brasil, 2011b.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. E. Sacarose e período de cultivo in vitro na aclimatização ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.34, p.1471-1477, 2004.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JÚNIOR. G. M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SUGUINO, E. **Propagação vegetativa do camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh) por meio da garfagem em diferentes porta-enxertos da família *Myrtaceae***. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.

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

TEIXEIRA, A. S.; CHAVES, L. S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de Camucamu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). **Acta Amazonica**, v. 34, n.1, p. 89 – 96, 2004.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília, DF: Embrapa: CENARGEN, [20--?]. Disponível em: <[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/simposios/S06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-0Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-0Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira.pdf)> Acesso em: 01 out. 2008.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 182 p, 2005.

UTIA Y PINEDO. **Propagación del Arazá y camu camu**. Tesis presentada para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Iquitos-Perú, 1979.

VIERA, V. B. RODRIGUES, J. B.; BRASIL, C. C. B.; ROSA, C. S. Produção, caracterização e aceitabilidade de licor de camu-camu (*Myrciaria dúbia* (h.b.k.) mcvaugh). **Alimento Nutricional**, Araraquara , V. 21, n. 4, p. 519-522, 2010.

VILLACHICA L. H. *El cultivo Del camu camu (Myrciaria dubia H.B.K. McVaugh) em La Amazonia Peruana*. Inquitos: **Tratado de Cooperación Amazonica**, v. 21. 36-80p, 1996.

WHITE, P. R. Metastatic (graft) tumors of bacteria-free crown-galls on *Vinca rosea*. **American Journal of Botany**, v.32, p.237-241, 1945.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: principios e técnicas. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 272 p, 2009.

YUYAMA, K. Livro de resultados dos Projetos de Pesquisa Dirigida (PPDs). Domesticação de germoplasma de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). Manaus: **Instituto de Pesquisa da Amazônia**, p.149-153, 2002.

YUYAMA, K.; MENDES, N. B.; VALENTE, J. P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 2, p. 601-607, 2011.

YUYAMA, K.; YAYAMA, L. K. O.; VALENTE, J. P.; SILVA, A. C.; AGUIAR, J. P.L.; FLORES, W. B. C.; LIMA, C. G. B. C. **Camu-camu**. Jaboticabal: FUNEP, 50p. 2010.

ZANATTA, C. F. **Determinação da composição de carotenóides e antocianinas de camu-camu (*Myrciaria dubia*)**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de CAMPINAS, 2004.

## ANEXOS

**ANEXO A** - Sementes de camu-camu germinadas *in vitro* em meio MS.



Fonte: Silva e Chagas, 2012

**ANEXO B** - Plântula de camu-camu germinada *in vitro* após 70 dias de cultivo em meio MS.

