



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

MARIA DA CONCEIÇÃO DA ROCHA ARAÚJO

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *in vitro* DE
SEGMENTOS CAULINARES DE CAMU-CAMUZEIRO**

**BOA VISTA
RORAIMA – BRASIL
2012**

MARIA DA CONCEIÇÃO DA ROCHA ARAÚJO

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *in vitro* DE
SEGMENTOS CAULINARES DE CAMU-CAMUZEIRO**

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: Prof. Dr. Alberto Moura de Castro

BOA VISTA, RR
2012

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

A663d Araújo, Maria da Conceição da Rocha
Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos
caulinares de Camu-Camuzeiro. -- Boa Vista, 2012.
55 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Moura de Castro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Roraima, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1 – *Myrciaria dubia*. 2 – Assepsia. 3 – Cloro ativo. 4 –
Antibióticos. 5 - Micropropagação. I - Título. II – Castro,
Alberto Moura de (orientador).

CDU 634.42(811)

MARIA DA CONCEIÇÃO DA ROCHA ARAÚJO

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *in vitro* DE SEGMENTOS
CAULINARES DE CAMU-CAMUZEIRO**

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

Professor Dr. Alberto Moura de Castro
Orientador - UFRR

Pesquisador Dr. Edvan Alves Chagas
Coorientador – Embrapa Roraima

Professor Dr. Marcio Akira Couceiro
EAGRO/UFRR

Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt
Embrapa Roraima

Aos meus pais, Antonio Araújo e Santana da Rocha Araújo,
pelo apoio, amor incondicional,
e pelo incentivo sempre

OFEREÇO

Ao meu esposo Edivan, pela compreensão,
amor e carinho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me proporcionado o dom da vida. Obrigada Senhor, por me dar tanta força durante toda a minha caminhada, por ter-me concedido os dons necessários para que, neste momento muito particular da minha vida, eu pudesse conquistar mais um sonho;

À Antonio Araújo, meu pai, e Santana da Rocha Araújo, minha mãe, agradeço pela dedicação, o amor e a educação que me deram. Vocês são meu grande orgulho e eu quero que tudo que eu faça em toda minha vida, seja prova de que o pouco que vocês acham que fizeram por mim, na verdade foi muito mais do que qualquer pessoa no mundo poderia querer. Vocês me deram simplesmente tudo e vão estar eternamente em tudo que eu fizer. Obrigada por sempre torcerem por mim e pela compreensão dos momentos de ausência;

Ao meu esposo Edivan, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio, incentivo e companheirismo ao longo desta caminhada, e por se fazer presente, nos momentos mais difíceis;

Às minhas irmãs, NILDA, BRANCA, e TILA, pelo apoio de sempre, pela confiança, por estarem sempre presentes na minha vida e por não me deixarem desistir em nenhum momento. Muito obrigado mesmo!

Aos meus amados sobrinhos Mirian Nicolý, João Pedro, Alicia Louise e Otávio Miguel, que são minha fonte de energia, por fazerem minha vida mais feliz a cada sorriso demonstrado, por cada carinho recebido, por serem a razão da minha felicidade, o melhor presente de Deus para nossa família;

Ao meu Orientador Dr. Alberto Moura, pela orientação, apoio, dedicação, e sugestões oferecidas que me permitiram a busca do conhecimento;

Ao meu Coorientador Dr. Edvan Alves Chagas, pela orientação, amizade e ensinamentos transmitidos com objetiva clareza, incentivo constante durante o trabalho, por ter disponibilizado seu tempo para ajudar no desenvolvimento da pesquisa e desenvolvimento deste trabalho e agradeço, principalmente por sempre acreditar em mim;

A minha amiga Marcela Liege, pelo apoio constante, tanto nas disciplinas quanto na realização e condução dos experimentos, pela amizade, pelo companheirismo durante os muitos dias e noites em que ficamos na biofábrica, pela

convivência agradável, pela oportunidade de estarmos dando mais um passo na nossa vida profissional, juntas, o que nos permitira mais alguns anos de companheirismo e amizade. Obrigada!

À Dra. Patrícia Silva Flores e Dra Verônica Andrade, pelos ensinamentos, carinho, paciência, e amizade durante a realização deste trabalho, pela oportunidade de crescimento, sua contribuição foi fundamental;

A toda minha família (tios, avós, cunhados, primos etc..) e amigos de convívio por estarem sempre ao meu lado, por estarem sempre torcendo por mim e pela compreensão nos momentos de ausência;

Ao Samuel da Silva e Leidiane, pela ajuda na instalação e condução dos experimentos, pela disponibilidade sempre, e pela convivência agradável;

Aos meus colegas da equipe de Fruticultura, sob orientação do Dr. Edvan Chagas: Isabel, Jaqueline, Olisson, Bruna, Ariel, Jhon (Bill), Luiza, Christinny, Ricardo, e ao Juca e Pedro Paulo, que não fazem parte da equipe, mas colaboraram na realização dos experimentos, muito obrigada a todos, pela convivência agradável, pelo companheirismo, carinho, apoio, e pelos momentos de descontração;

A equipe da Biofábrica, em Especial, Dr. Marcio Akira, Dra. Flavia Antunes e Iolete Maciel, pela acolhida e apoio durante todo período de realização dos experimentos;

Aos colegas do Mestrado: Hilton, Clemilton, Ruy, Daniel, Izaias Nayrah, Manoel e Diego, pelo companheirismo, pela ajuda no decorrer do curso e das disciplinas, e principalmente pela convivência agradável, em especial a minha amiga Danielle, pela ajuda na elaboração da dissertação, pela companheira de todos os momentos, e sempre torcendo por minhas vitórias;

À Universidade Federal de Roraima, Centro Ciências Agrárias (CCA), em especial ao POSAGRO, pela oportunidade concedida;

À Embrapa Roraima e Biofábrica pela oportunidade de realização deste trabalho;

Aos Professores do Mestrado, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos no decorrer das disciplinas;

A CAPES, pela bolsa concedida, e ao CNPq, CAPES/FINEP e FEMARH pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora;

Enfim, a todos que colaboraram com a realização desta dissertação.

Araújo, Maria da Conceição da Rocha. **Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro**. 2012. 55p. Dissertação de Mestrado / Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, ano 2012.

RESUMO

O camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh) é uma espécie frutífera pertencente à família Myrtaceae, de ocorrência espontânea nas margens de rios e lagos da Amazônia. Apresenta potencial econômico, uma vez que o fruto é considerado a maior fonte natural de vitamina C, chegando a atingir 6112 mg de ácido ascórbico por 100 g de polpa, despertando interesse comercial por parte dos produtores e consumidores. Apesar da importância econômica, pouco se sabe sobre os aspectos da multiplicação *in vitro* desta espécie, o que poderia elevar significativamente a sua produtividade. Neste sentido, objetivou-se com o presente trabalho testar diferentes concentrações de produtos para desinfestação e estabelecimento de uma cultura asséptica, utilizando explantes de segmentos caulinares de camu-camu provenientes de plantas mães, mantidas em ambiente *ex vitro*. O trabalho foi dividido em quatro experimentos: 1) Avaliação do efeito do hipoclorito de sódio na assepsia dos explantes de segmentos caulinares de camu-camu *in vitro*; 2) Avaliação de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio na desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu; 3) Determinação da melhor concentração e tempo de imersão de dióxido de cloro na desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu; 4) Uso de antibióticos para o controle da contaminação bacteriana em culturas *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu. Após 30 dias, avaliou-se o percentual de contaminação e a porcentagem de explantes estabelecidos. A utilização de hipoclorito de sódio a 1,5 % de cloro ativo, por 12 minutos, proporcionou maiores porcentagens de descontaminação (98%), o que resultou na obtenção de bons índices de estabelecimento (87,9%). O cloreto de mercúrio mostrou-se tóxicos aos explantes, mesmo nas menores concentrações. Com a utilização do dióxido de cloro na concentração de 50%, em exposição no tempo de 30 minutos, obteve-se 60% dos explantes desinfestados e 60% estabelecidos. Quanto aos antibióticos, menores índices de contaminação e maiores de estabelecimento (0% e 50% respectivamente) foram obtidos quando utilizou ampicilina na concentração de 100 mg.L⁻¹. Portanto, para desinfestação *in vitro* de camu-camuzeiro, via segmentos caulinares, deve-se utilizar hipoclorito de sódio a 1,5 % por 12 minutos, com adição no meio de cultura de 100 mg.L⁻¹ de antibiótico ampicilina.

Palavras – chave: *Myrciaria dubia*, assepsia, cloro ativo, antibióticos, micropropagação.

Araújo, Maria da Conceição da Rocha. **Disinfestation and in vitro establishment of stem segments of camu-camu tree**. 2012. 55p. Master Dissertation/ master Dissertation in Agronomy- Federal University of Roraima (Universidade Federal de Roraima), Boa Vista, year 2012.

ABSTRACT

The camu-camu tree (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) is a fruit-bearing species belonging to the family Myrtaceae of spontaneous occurrence on the banks of rivers and lakes of Amazonia. It presents economic potential, since its fruits are thought the greatest natural source of vitamin C, bordering 6,112g of ascorbic acid per 100 g of pulp, arising commercial interest on the part of the farmers and consumers. In spite of the economic importance, little is known about the aspects of the in vitro multiplication of this species, which could raise significantly its yield. In this sense, it was aimed through this work to test different concentrations of products for disinfestation and establishment of an aseptic culture by utilizing explants of stem segments of camu-camu coming from mother plants kept in ex vitro environment. The work was divided into four experiments: 1) evaluation of the effect of sodium hypochlorite upon the asepsis of the explants of stem segments of camu-camu in vitro; 2) to evaluate different concentrations of mercury chlorite in the in vitro disinfestation of camu-camu stem segments; 3) to determine the best concentration and immersion time of chlorine dioxide in the in vitro disinfestations of camum-camu stem segments; 4) Use of antibiotics for the control of bacterial contamination in in vitro cultures of camu-camu stem segments. After 30 days' time, the percent of contamination and the percentage of established explants were evaluated. The use of sodium hypochlorite at 1.5% of active chlorine for 12 minutes provided highest percentages of decontamination (98%), which resulted into the obtaining of good establishment indices (87.9%). Mercury chlorite proved toxic to the explants even at the lowest concentrations. Through the use of chlorine dioxide at the concentration of 50% under exposition in the 30 minutes' time, 60% of the disinfected explants and 50% of the established ones were obtained. As to the antibiotics, decreased contamination indices and increased establishment indices (0% and 50%, respectively) were reached when ampicillin at the concentration of 100 mg/ L was utilized. Therefore, for in vitro disinfection of camu-camu tree via stem segments, one should utilize 1.5% sodium hypochlorite for 12 minutes, with addition in the culture medium of 100 mg/ L of antibiotic ampicillin.

Key words: *Myrciaria dubia*, asepsis, active chlorine, antibiotics, micropropagation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Aspectos botânicos e distribuição	14
3.2 Importância econômica.....	15
3.3 Propagação do camu-camu.....	16
3.4 Cultivo <i>in vitro</i>	18
3.5 Desinfestação dos explantes.....	20
3.5.1 Etanol.....	22
3.5.2 Hipoclorito de sódio.....	22
3.5.3 Cloreto de mercúrio.....	24
3.5.4 Dióxido de cloro.....	25
3.5.5 Antibióticos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Hipoclorito de sódio na assepsia dos explantes de segmentos caulinares de camu-camu <i>in vitro</i>	28
4.2. Cloreto de mercúrio na desinfestação <i>in vitro</i> de segmentos caulinares de camu-camu.....	28
4.3. Dióxido de cloro na desinfestação <i>in vitro</i> de segmentos caulinares de camu-camu	28
4.4. Uso de antibióticos para o controle da contaminação bacteriana em culturas de segmentos caulinares de camu-camu <i>in vitro</i>	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÕES.....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

No Norte do Brasil existe uma grande diversidade de frutíferas nativas, dentre as quais se destaca o camu-camuzeiro. O seu fruto possui alto valor nutritivo e grande potencial econômico devido ao alto teor de ácido ascórbico (6112 mg /100 g de polpa). Este valor é três vezes superior à acerola que era considerada uma das frutas mais ricas em ácido ascórbico no Brasil (YUYAMA; AGUIAR; YUYAMA, 2002).

O camu-camu, caçari, ou araçá-d'água (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVough) é um arbusto pertencente à família Myrtaceae, e encontra-se distribuído em toda Bacia Amazônica, desde a parte leste do Pará, passando pelo médio e alto Rio Amazonas e parte oriental da Cordilheira dos Andes (Bacia Amazônica) no Peru. Ao norte, ocorre em países como Colômbia, Venezuela e Guiana Inglesa. Ao sul, ocorre nas margens de todos os rios que deságuam no rio Amazonas, desde o sul do Peru, norte da Bolívia, passando pelos Estados de Rondônia, Mato grosso e Tocantins (YUYAMA *et al.*, 2010).

A propagação do camu-camu, embora possa ser conduzida por métodos de propagação vegetativa (FERREIRA; GENTIL, 1997), é realizada basicamente por via sexuada. Contudo, verifica-se que este método resulta na desuniformidade entre as mudas obtidas, devido à variabilidade genética. Do ponto de vista comercial, é interessante que cultivares de importância agrônômica sejam propagadas assexuadamente, pois esse tipo de propagação resulta em plantas uniformes quanto ao seu fenótipo (crescimento, floração, frutificação). Isso decorre do fato dessas plantas serem selecionadas para características desejadas (alta produção, resistência a doenças) (CID; TEIXEIRA, 2010).

Com relação ao camu-camu, verifica-se uma carência de informações técnicas sobre o seu melhor sistema de propagação. A falta de informações dificulta a produção e formação de mudas de qualidade, o que vem prejudicando a sua exploração de forma sustentável e econômica.

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. Com esta técnica é possível obter muitas vantagens que vão desde a multiplicação de germoplasma de alto valor agrônômico ou daqueles que são portadores de genes raros e que correm risco de extinção (GATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos tem-se a micropropagação que permite a produção de mudas em larga escala, em curto espaço de tempo e com características fitossanitárias superiores em relação ao material obtido por técnicas convencionais como estaquia e mergulhia de cepa (GATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Assim, por meio de técnicas como a micropropagação, tem-se obtido bons resultados para as mais diversas culturas da família Myrtaceae tais como: Goiabeira serrana (SOUZA, *et al.*, 2006b); Pitangueira (SOARES *et al.*, 2005; LATTUADA, 2010); Jaboticabeira (SASSO, 2009), possibilitando além do controle sobre a produção de mudas, um grande número de indivíduos de elevada qualidade fitossanitária.

No entanto, para o início do processo de micropropagação, torna-se necessário a elaboração de um protocolo específico para cada cultura, que venha a suprir suas necessidades e exigências no cultivo *in vitro*. No desenvolvimento de um protocolo de micropropagação o principal entrave a ser vencido é o estabelecimento da cultura *in vitro*.

No estabelecimento de explantes em condições *in vitro*, a contaminação é bastante frequente, por eles estarem expostos às condições naturais, que são fontes de microrganismos. Apesar de a maioria desses microrganismos não ser patogênica, o seu crescimento é acelerado no meio de cultura, a ponto de competirem por nutrientes com os explantes, prejudicando o desenvolvimento destes (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

Em espécies lenhosas, onde se enquadra o camu-camu, frequentemente, são encontradas dificuldades como oxidação fenólica, excesso e contaminação por microrganismos, entre outras. Estas variáveis podem sofrer alterações, conforme a intensidade luminosa, tipos de explantes e genótipos utilizados. Para contornar estes eventos, adequações ao meio de cultivo, como composição de nutrientes ou utilização de compostos antioxidantes podem ser utilizados (TEIXEIRA, 2001).

Portanto, a micropropagação torna-se uma técnica promissora na propagação vegetativa do camu-camuzeiro, pois permite a obtenção mudas de qualidade superior e em grande escala, mantendo as características desejáveis da planta mãe.

1. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um procedimento para a desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro

1.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro;
- Avaliar o efeito de cloreto de mercúrio na desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro;
- Determinar a concentração e tempo de imersão do dióxido de cloro para desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro;
- Avaliar o efeito de diferentes bactericidas no controle da contaminação *in vitro* de explantes de camu-camu.

3. REVISÃO DA BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS E DISTRIBUIÇÃO

O camu-camuzeiro é classificado botanicamente como uma planta da divisão Fanerógama, sub-divisão Angiospermae, classe Dicotiledônea, subclasse Eleuteropetala, secção: Calciflora, ordem Myrtiflorinea, família Myrtaceae, Gênero *Myrciaria* (TAKHATAJAN, 1980).

O camu-camuzeiro, caçari, araçá-d'água ou azedinho (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc.Vaugh) é um arbusto de pequeno porte pertencente à família Myrtaceae, disperso desde a região central do Estado do Pará até a Amazônia peruana, sendo normalmente encontrado, em seu estado natural, à beira dos igarapés e rios ou em regiões permanentemente alagadas (ZANATTA, 2004). Em condições naturais, frutifica entre os meses de novembro a março, e quando cultivado em terra firme na cidade de Manaus, produz flores e frutos durante o ano inteiro, mas como menores produções nos meses de julho e agosto (RIBEIRO; MOTA; PADILHA, 2002).

O camu-camuzeiro encontra-se distribuído em toda Bacia Amazônica, desde a parte leste do Pará, passando pelo médio e alto Rio Amazonas até a parte oriental da Cordilheira dos Andes (Bacia Amazônica) no Peru. Ao norte, ocorre nos países como Colômbia, Venezuela e Guiana Inglesa, bem como o estado de Roraima no Brasil, e ao sul, nas margens de todos os rios que deságuam no rio Amazonas, desde o sul do Peru, norte da Bolívia, passando pelos estados de Rondônia, estados do Mato grosso e Tocantins (YUYAMA *et al.*, 2010).

O camu-camuzeiro é um arbusto que alcança uma altura de 3 a 8 metros, podendo apresentar várias ramificações. A planta pode assumir diversas formas como o tipo taça com um caule principal e muitos ramos secundários, a mais apropriada para produção de frutos, ou vários caules com muitos ramos secundários. O caule apresenta consistência dura, porém flexível, sendo necessário o tutoramento das plantas quando estas estão carregadas de frutos, a fim de se evitar a quebra dos ramos por excesso de peso dos frutos. As folhas são simples e opostas, de forma ovalada, elípticas ou lanceoladas, com comprimento que varia de 4 a 11 cm e largura entre 2 a 4 cm. As flores podem apresentar-se individualmente ou em forma de inflorescência, e são encontradas nas axilas das folhas, em toda

extensão dos ramos superiores. A inflorescência é formada por flores hermafroditas, com pétalas brancas (YUYAMA *et al.*, 2010).

O fruto é globoso, de superfície lisa e brilhante, de cor vermelho-escura atingindo negro-púrpura ao amadurecer, podendo ter de 1,2 a 3,8 cm de diâmetro, e possuir de uma a quatro sementes. O peso médio é de 8,5 g por fruto, variando 2 a 18 g. As sementes são reniformes, achatadas, com 8 a 11 mm de comprimento e 5,5 a 11,0 mm de largura. O embrião fica na parte dorsal da semente. O fruto do camu-camuzeiro não é climatérico (YUYAMA *et al.*, 2010).

3.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO CAMU-CAMU

A grande importância do camu-camu deve-se ao seu elevado teor de vitamina C, podendo alcançar 6.112 mg /100 g de polpa. Esta concentração de ácido ascórbico é superior àquela encontrada na maioria das frutíferas cultivadas. De modo geral, a quantidade de ácido ascórbico presente no camu-camu é 3 vezes maior que a da acerola (1.790 mg /100 g de polpa) e 65 vezes maior que a do limão (44,2 mg/100 g de polpa) (SEBRAE, 1996; YUYAMA; AGUIAR; YUYAMA, 2002).

A vitamina C, presente nos frutos de camu-camu, combate os radicais livres causadores de envelhecimento e auxilia no fortalecimento do sistema imunológico. Os frutos possuem também antioxidantes como as antocianinas, e teor elevado de potássio, sugerindo sua indicação para hipertensos, pois proporciona um melhor equilíbrio de sais no organismo, principalmente em relação ao cloreto de sódio (MENEZES, 2001).

De acordo com Santana (1998), o alto conteúdo de ácido ascórbico confere ao camu-camu importância para a agroindústria e indústria farmacêutica. No Peru, parte das populações naturais e das plantas cultivadas, está orientada para a exportação da polpa, para países como França e Japão.

O fruto, em virtude da elevada acidez da polpa, dificilmente é consumido ao natural na alimentação humana, muito embora possa ser apreciado dessa forma como tira-gosto (VILLACHICA, 1996). O comum é processá-lo visando à elaboração de sucos, mas as características de elevada succulência, sabor ácido acentuado, coloração intensa e odor pronunciado possibilitam seu emprego na obtenção de produtos agroindustriais, como polpa congelada, suco concentrado, suco liofilizado e néctar (OLIVEIRA; ANDRADE; SILVEIRA, 2005; SILVA *et al.*, 2011a), Ademais, o

suco desta fruta é considerado uma excelente alternativa na combinação com outras substâncias, resultando, assim, no aumento do teor de vitamina C dos produtos derivados como néctares, doces, sorvete, picolé, iogurtes, bebidas isotônicas, geléia, licor e até xarope concentrado (RODRIGUES *et al.*, 2003, MARQUES; ANDRADE; SOUZA, 2005, SILVA *et al.*, 2011b). De acordo com Peuckert *et al.* (2010), o camu-camu mostrou-se um ingrediente de ótima qualidade para enriquecimento de barras de cereal, tornando o produto elaborado um diferencial em relação ao produto comumente comercializado. Adicionalmente, o elevado teor de ácido ascórbico gera interesse na indústria farmacêutica para a produção de concentrado de vitamina C.

A comercialização do camu-camu é realizada em pequena escala em feiras, na região produtora, porém a grande parte é feita na forma de polpa congelada. O fruto é muito pouco conhecido no Brasil, mas é muito procurado pelos japoneses, americanos e europeus, sendo exportados em contêineres refrigerados. No Japão, a polpa é transformada em bebidas gaseificadas, vinagre, recheio de pão, aperitivo, sorvetes, balas e comprimidos. No Brasil, a empresa de cosméticos Semprebella produz xampu, modelador, desembaraçante e condicionador, e a empresa Tucuxi, em Manaus, o xarope (YUYAMA, 2011).

O interesse de diversos setores industriais (fármacos, cosméticos, conservantes naturais, bebidas etc.) nos frutos de camu-camu, tem aumentado a demanda por pesquisas em busca de maiores informações a respeito da planta, pois pouco se sabe sobre as condições ideais de cultivo e os teores de elementos minerais necessários ao bom desenvolvimento de frutos (ESASHIKA, OLIVEIRA E MOREIRA, 2011).

3.3. PROPAGAÇÃO CAMU-CAMU

Normalmente, o camu-camu é propagado por semente. No fruto encontram-se de uma a quatro sementes e estas tem viabilidade germinativa, quando despulpadas e logo semeadas, maior que 90%. Porém, apresenta variabilidade genética em diferentes características de interesse agrônômico (PINEDO *et al.*, 2004; YUYAMA, *et al.*, 2010). O período de semeadura, todavia, está restrito a um período bem curto após a colheita dos frutos (até 6 meses), em decorrência da pequena longevidade das sementes. Quando tratadas com hipoclorito de sódio e armazenadas em ambiente adequado, as sementes são viáveis por quatro a seis meses. Sendo,

portanto, caracterizada como recalcitrante (FERREIRA E GENTIL, 2003; YUYAMA; MENDES; VALENTE, 2011).

A propagação por semente é o método mais utilizado, 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, e colheita (LIRA JUNIOR *et al.*, 2007).

Para tentar diminuir o efeito da segregação e principalmente para reprodução de material selecionado de alta produção, vem-se tentando a multiplicação vegetativa do camu-camuzeiro, visando maior produtividade, uniformidade de produção, precocidade na frutificação, e fixação das características desejáveis da planta-mãe (YUYAMA, *et al.*, 2010).

Dentre as várias técnicas de propagação vegetativa, destaca-se 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 (PASQUAL *et al.*, 2001). Em função dos problemas relacionados com a propagação por sementes, a propagação por estaquia tem sido o método mais utilizado quando se objetiva a obtenção de uniformidade e maior produção de frutos por área, diminuição do porte da planta, redução do período para início de floração e frutificação, manutenção das características genéticas das plantas matrizes, uniformidade, porte reduzido e precocidade de produção (HARTMANN *et al.*, 2002).

Diversos são os trabalhos realizados visando à propagação de camu-camu via estaquia. A utilização de ramos lenhosos e a aplicação de fitorreguladores, como as auxinas, têm sido utilizadas com estacas preparadas com comprimentos de 20 a 25 cm, e diâmetro que variam de 0,8 a 2 cm (SANTANA, 1998; AZEVEDO, 1999; PEREIRA, 2002; ARÉVALO, 2003; OLIVA, 2005; SILVA, 2009). Os resultados desses trabalhos demonstram comportamento variável na capacidade de formação de raízes adventícias, variando entre 20 a 90% de enraizamento das estacas.

Outro método de propagação vegetativa utilizado em fruteiras é a enxertia, no qual ocorre a combinação de características desejáveis de dois genótipos, o porta-enxerto e o enxerto (HARTMANN *et al.*, 2002). Suguino; Glória e Araújo (2003) em estudos com porta-enxerto da família Myrtaceae adaptados à terra firme, selecionou mudas de camu-camu, goiabeira (*Psidium guajava* L.) e pitangueira

(*Eugenia uniflora* L.), e observou que apenas o porta-enxerto de camu-camu se mostrou compatível para a propagação vegetativa desta espécie. Dentre os métodos de enxertia utilizados, os autores observaram que a garfagem em fenda lateral é a que se apresenta como o mais eficiente para multiplicação assexuada do camu-camu.

Moreira Filho e Ferreira (2009) avaliando a eficiência de diferentes métodos de enxertia e a compatibilidade interespecífica entre camu-camu arbustivo e camu-camu arbóreo na fase de formação de mudas de *Myrciaria dubia* observaram que o camu-camu arbustivo, como porta-enxerto, apresentou melhor percentual de pegamento (78,4%).

3.4. CULTIVO IN VITRO

A cultura de tecidos compreende um conjunto de técnicas no qual um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia em um meio nutritivo artificial. Esta técnica tem como princípio básico a totipotencialidade, onde qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética e capacidade de regeneração de uma planta completa (PASQUAL, 2001).

Dentre as diversas técnicas da cultura de tecidos, tem-se destaque a micropropagação. A micropropagação vem sendo aplicada com plantas nativas e/ou exóticas, herbáceas e lenhosas, visando o estabelecimento de protocolos simples e diretos para propagação. Estudos de micropropagação podem ser realizados com sementes, embriões, meristemas apicais, gemas axilares, entre outros órgãos e tecidos da planta. Pesquisa-se também os tipos e meios de cultura, as concentrações e tipos de reguladores vegetais que devem ser usados nas diferentes fases do processo de micropropagação para cada espécie (SOUZA, 2006a).

A micropropagação possibilita a multiplicação por via assexuada, resultando em um grande número de descendentes. Genótipos superiores podem ser multiplicados sem modificação genética, fato importante para manutenção de características agrônômicas. A técnica ainda pode proporcionar maior precocidade na produção e abreviar o tempo necessário à liberação de uma nova cultivar (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2006). Neste contexto, a micropropagação é uma eficiente ferramenta para clonar plantas em escala comercial.

Os explantes são cultivados assepticamente em meio de cultura, permitindo uma interação controlada entre fatores abióticos e bióticos, que pode dar origem a plantas geneticamente superiores multiplicadas massivamente. Diversos explantes podem ser utilizados para o início de propagação de uma planta *in vitro*. Entretanto, procura-se selecionar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar totipotência, tais como gemas apicais, gemas axilares e pontas de raízes (TORRES *et al.*, 2000; ANDRADE, 2002).

Para Teixeira (2001), a primeira etapa na elaboração de um protocolo de micropropagação é a desinfestação dos explantes primários. A desinfestação em espécies lenhosas pode ser feita com sucesso utilizando álcool etílico comercial na concentração de 50 a 70%, por um período de 1 a 3 minutos, seguido de um tratamento com hipoclorito de sódio ou cálcio a 0,5 a 2%, por 5 a 20 minutos, acompanhada de 3 a 5 lavagens com água destilada estéril por um período mínimo de 5 minutos por lavagem. Com este procedimento se obtém a descontaminação de 90% dos explantes.

A composição do meio de cultura, principalmente a presença de sacarose como fonte de carbono, favorece o crescimento de microrganismos, sendo um dos grandes problemas deste método de propagação. A contaminação na cultura de tecidos é provocada pela entrada dos contaminantes biológicos no meio de cultura, os quais são provenientes do explante ou do ambiente, no processo de manuseio de materiais tanto vegetal quanto de instrumentos usados. Para evitar ou ao menos reduzir a perda de materiais em função da contaminação, diversos métodos de esterilização são empregados, assim como cuidados na assepsia dos ambientes de manuseio e de incubação dos cultivos (BERTONCELLI; HASSE; OLIVEIRA, 2009).

Para Grattapaglia e Machado (1998), a micropropagação se inicia com a seleção dos explantes mais adequados e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adaptada às condições *ex vitro*. A condição da planta-matriz, a descontaminação e o manejo dos explantes iniciais são aspectos relevantes a serem considerados.

Para Xavier, Wendling e Silva (2009), a micropropagação pode ser enquadrada como uma técnica de propagação vegetativa *in vitro*. Comparada a outras técnicas, têm sido considerada aquela que mais se difundiu nos últimos anos, com aplicações comprovadas em diversas espécies de plantas. Portanto, a micropropagação, é um

método viável para propagação de diversas espécies frutíferas da família Myrtaceae (Tabela 1).

Tabela 1. Trabalhos de micropropagação desenvolvidos com espécies frutíferas da família Myrtaceae

Espécie	Objetivo do estudo	Autoria
Araçazeiro (<i>Psidium</i> spp.)	Micropropagação	SOUZA <i>et al.</i> (2006b) RIBEIRO <i>et al.</i>, (2008)
Pitanga (<i>Eugenia</i> <i>uniflora</i> L)	Estabelecimento, micropropagação	SOUZA <i>et al.</i>, 2007, SOARES <i>et al.</i>, 2005, LATTUADA, 2010,
Cerejeira (<i>Eugenia involucrata</i> DC)	Micropropagação	RIBEIRO <i>et al.</i>, 2008 FRANZON; RASEIRA, 2006
Goiabeira serrana (<i>Acca sellowiana</i>)	Multiplicação, micropropagação	OLTRAMARI, <i>et al.</i>, 2000, SOUZA, <i>et al.</i>, 2006b
Jaboticaba (<i>Myrciaria spp</i>	Estabelecimento, micropropagação	SASSO, 2009 PICOLOTTO, <i>et al.</i>, 2007
Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	Estabelecimento <i>in vitro</i>	<i>in</i> NUNES <i>et al.</i> (2002), GUTIÉRREZ-ROSATI (2006),

3.5 DESINFESTAÇÃO *IN VITRO* DE EXPLANTES

A dificuldade maior na desinfestação de explantes reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte. Para Ribas *et al.* (2003), a contaminação

por microrganismos continua sendo um dos principais problemas para a aplicação da micropropagação, podendo chegar inclusive a ser um fator limitante para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de certas espécies.

Na maioria dos casos, a presença de fungos e bactérias ocorre poucos dias após a inoculação. Em alguns casos, a presença de bactérias e fungos nas plantas é detectada após algum tempo de cultivo, geralmente quando um grande número de plantas já está em produção. Além disso, por serem de difícil visualização, são facilmente transmitidas de um material para outro durante a manipulação dos explantes para a inoculação *in vitro*. Quando as condições do meio de cultura (nutrição, pH) tornam-se favoráveis ao seu desenvolvimento, os fitopatógenos passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento dos explantes (Montarroyos, 2000), podendo levá-los rapidamente à morte. Esta deterioração dos explantes está relacionada com a produção de metabólitos fitotóxicos pelos fitopatógenos, tais como os ácidos láctico e acético e cianeto (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003).

Para se obter propágulos sadios, torna-se indispensável tomar algumas medidas que começam antes mesmo da coleta do material no campo. A condição fitossanitária da planta matriz é importante à medida que irá determinar a facilidade em se descontaminar o explante durante o isolamento (PASQUAL, 2001). São determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta matriz para o sucesso dessa etapa do trabalho, principalmente no que se refere aos microrganismos endógenos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O material coletado, principalmente se for proveniente do campo, pode ser mantido em água corrente por algumas horas para uma lavagem superficial de partículas de poeira e outras fontes de contaminação superficial. Em seguida, são retirados o excesso de folhas e o caule das brotações (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Várias substâncias com ação germicidas são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como hipoclorito de sódio e de cálcio. Além destes, vários agentes desinfestantes podem ser utilizados como água oxigenada, nitrato de prata e cloreto de mercúrio, sendo que o sucesso da desinfestação vai depender de tipo e idade do explante, concentração do agente desinfestante e do tempo de exposição (DONINI *et al.*, 2005). Considerando a consistência do tecido a ser desinfestado, determina-

se a concentração da solução e tempo de exposição de maneira inversamente proporcional, a fim de se obter sucesso na desinfestação dos explantes.

O processo de desinfestação deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, utilizando vidraria previamente esterilizada. Após a desinfestação, segue-se a lavagem com água destilada autoclavada. A lavagem é feita com diversos enxágues sucessivos, geralmente em número de 3 a 5. A permanência de resíduos de cloro pode ser prejudicial aos tecidos e comprometer o seu desenvolvimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Diversos estudos de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de fruteiras nativas da família Myrtaceae são relatados para goiabeira serrana, pitangueira, araçazeiro, uvaia, camu-camu, cerejeira e jabuticabeira (SOUZA *et al.*, 2006b; SOUZA; SCHUCH; SILVA, 2006; PICOLOTTO *et al.*, 2007, NASCIMENTO *et al.*, 2008, NUNES, *et al.*, 2002, RIBEIRO, *et al.*, 2008).

3.5.1. Etanol

O etanol é geralmente utilizado pela sua ação germicida, surfactante e de dissolução das gorduras. Portanto, aplicado inicialmente, pode auxiliar a ação dos outros produtos. O etanol a 70% e 80% geralmente é utilizado por alguns segundos um vez que acima destas concentrações é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos (PASQUAL, 2001).

3.5.2. Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio é um efetivo agente antimicrobiano. É utilizado para desinfestação de microorganismos existentes em superfícies inertes. Por isso, é utilizado na limpeza e manutenção da qualidade em todo o material exposto à contaminação.

Segundo Hirata e Mancini Filho (2002), a faixa ideal de pH para a solução de hipoclorito de sódio a ser utilizada como desinfestante fica entre 5 e 8, pois o aumento de pH propicia o desenvolvimento de mecanismos de defesa das bactérias, permitindo que se desenvolvam mesmo em concentrações altas de cloro ativo, dificultando, assim, a ação do produto. Para Donini *et al.* (2005) quanto maior a concentração de cloro ativo maior será o aumento do pH na solução desinfestante, o que levará à diminuição da ação biocida pelo aumento da formação de íons. O aumento da concentração de cloro livre na solução resultará no correspondente

aumento da atividade biocida, sendo que o aumento de quatro vezes na concentração de cloro reduz pela metade o tempo de exposição dos explantes.

O hipoclorito de sódio tem sua ação bactericida devido ao ácido hipocloroso (HOCl). A sua atividade está relacionada à capacidade oxidante (GEORGE, 1993). Além disso, esse produto tem a vantagem de ser facilmente encontrado no comércio.

A persistente contaminação dos tecidos por bactérias é problemática em cultura de tecidos, considerando que tratamentos sucessivos com hipoclorito de sódio ou outro desinfestante são mais prejudiciais ao tecido do que a bactéria (PASQUAL, 2001). Portanto, deve-se determinar por meios de testes experimentais qual melhor concentração e tempo de imersão de acordo com cada cultura e explante a ser estabelecido *in vitro*, visando a desinfestação dos tecidos sem causar toxicidade ou oxidação dos explantes.

O cloro, principal componente do hipoclorito, quando liberado em meio aquoso atua na inibição enzimática via desnaturação protéica e inativação de ácidos nucléicos, e que por inativar enzimas e agir como oxidante, tem ação bactericida, porém, apresentando baixa eficiência contra esporos (PASQUAL, 2001).

Algumas gotas de detergente são comumente adicionadas às soluções a base de cloro para melhorar o contato destas com os tecidos. O Tween 20 é o mais utilizado em concentrações de 0,01 a 0,05% (v/v), porém, detergentes normais de cozinha são bons substitutos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O Tween 20 tem a função de aumentar a penetração da solução no tecido. O uso de vácuo à solução aumenta a dilatação dos poros do propágulo, facilitando a penetração da solução desinfestante (PASQUAL, 2001).

Picolloto *et al.* (2007), avaliando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação de semente de jaboricabeira (*Myrciaria spp*), obtiveram melhores resultados quando tratadas a 5% de cloro ativo por 10 minutos.

Garcia *et al.* (2008) em trabalho realizado com uvaia *Eugenia pyriformis* Cambess. var. uvalha (Cambess.), concluíram que a desinfestação por 15 minutos em hipoclorito de sódio na concentração de 2,5% de cloro ativo, é mais eficiente no controle da contaminação fúngica e bacteriana e não interfere no desenvolvimento das folhas, gemas e brotações, além de apresentar menor oxidação.

Souza *et al.* (2006b) observaram que explantes caulinares de goiabeira serrana e pitangueira podem ser desinfestados usando a menor concentração de

hipoclorito de sódio (1,5% a 2,5%) e no menor tempo de exposição ao produto (10 minutos).

Sasso (2009), avaliando o efeito do hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes de jabuticaba, observaram que a desinfestação de explantes caulinares de jabuticabeira é possível usando álcool 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio 1,25% no menor tempo de exposição (5 minutos), obtendo-se 93,8% de descontaminação dos explantes.

De acordo com Erig e Schuch (2005) a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente elimina os microorganismos e não causa danos ou morte aos tecidos.

3.5.3. Cloreto de Mercúrio

Alguns trabalhos têm sido realizados utilizando cloreto de mercúrio, embora mais raro, devido a sua toxidez. O cloreto de mercúrio pode dar bons resultados, numa concentração de 0,05 a 0,2% (p/v), por um período de 5 a 20 minutos, seguido de 3 a 5 lavagens com água destilada estéril.

Alguns dos autores utilizam cloreto de mercúrio como forma de desinfestação dos explantes de teca (*Tectona grandis*) para introdução *in vitro* (SHIRIN; RANA; MANDOL, 2003; TIWARI; TIWARI; SIRIL, 2002; BAGHEL; TIWARE; TRIPATHI, 2008). Ribas *et al.* (2003), testando diferentes concentrações de cloreto de mercúrio em explantes de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*), obtiveram melhores resultados quando utilizaram HgCl₂ a 0,05% por 10 minutos (84,10% de sobrevivência). Shirin e Rana (2007) obtiveram a regeneração *in vitro* de bambu (*Bambusa galucescens*) desinfestando explantes nodais com a imersão destas estruturas em solução de bicloreto de mercúrio a 1% por 10 minutos; já em *Holarrhena antidysenterica*, uma espécie arbórea com propriedades medicinais, empregaram-se também HgCl₂, porém, em uma concentração mais reduzida (0,1%), ficando em contato com os explantes por apenas 2 minutos, obtendo-se assim, até 70% de desinfestação (MALLIKARJUNA; RAJENDRUDU, 2007).

3.5.4. Dióxido de cloro

O dióxido de cloro apresenta vantagens quando utilizado como agente desinfestante por ser efetivo em pH neutro, mais solúvel que o cloro ativo e não formar compostos halometanos. O dióxido de cloro é um efetivo agente antimicrobiano, bactericida, fungicida, algicida, com propriedades desodorizantes e descorantes (DEGANI, 1975).

O dióxido de cloro age, na maioria das vezes, por meio de um mecanismo de transferência de elétrons, penetrando e desidratando a membrana celular e, por último, oxidando os componentes intracelulares de microrganismos gram-negativos e gram-positivos, porém sem os efeitos negativos de fitotoxicidade que os demais compostos clorados, como os hipocloritos apresentam. A natureza apolar do dióxido de cloro auxilia na ação sanitizante e esporicida, em razão da maior solubilidade em moléculas orgânicas complexas como as presentes na maioria dos vírus e bactérias (SREBERNICH, 2007).

3.5.5. Antibióticos

Os antibióticos são utilizados para controlar contaminações bacterianas endógenas. Depois de eliminados os microorganismos superficiais, os explantes podem ser transferidos para meio de cultura contendo antibiótico. Vários antibióticos são utilizados em cultura de tecidos, a exemplo de: cefatoxima, ampicilina, estreptomicina, rifampicina, kasugamicina, carbenicilina, cefalosporinas, neomicina, canamicina, cloranfenicol, tetraciclinas, dentre outros. Dentre estes, alguns são mais e outros menos tóxicos aos tecidos vegetais (WENDLING; DUTRA; ROSSI, 2006).

Os contaminantes, especialmente as bactérias endógenas, impõem consideráveis limitações mesmo na fase de introdução *in vitro*. Quando a contaminação é endógena, as consequências podem ser limitantes, podendo haver perda de tempo, de recursos financeiros e de material genético (SOUZA *et al.*, 2006a). Daí, o controle da contaminação microbiana é imprescindível para obtenção de resultados positivos na micropropagação.

Diversas pesquisas têm sido realizadas para a prevenção ou eliminação dos contaminantes do cultivo *in vitro* de plantas, desde o desenvolvimento de protocolos de assepsia, cuidados com as plantas-matrizes, até o uso de produtos antimicrobianos, adicionados ao meio de cultura (PEREIRA *et al.*, 2009). Muitos tipos de antibióticos são utilizados na cultura de tecidos de plantas. Estes compostos

são preferidos por prevenir ou eliminar bactérias na cultura de tecidos, e em alguns casos, auxiliar no desenvolvimento do tecido vegetal (HOLFORD; NEWBURY, 1992; MAMIDALA; NANNA, 2009). Entretanto, tais substâncias possuem algumas desvantagens, podendo prejudicar as plantas submetidas à cultura de tecidos com efeitos fitotóxicos, bem como não serem economicamente viáveis (TERESCO *et al.*, 2006).

Vários autores relataram a importância da adição de antibiótico ao meio de cultura visando ao controle de microrganismos contaminantes. Naue, Benitz; Medeiro (2007) verificaram que a adição de descontaminantes ao meio de cultura foi necessária no controle de contaminação em *Nicotiana tabacum*, e relataram que a adição do antibiótico agrimicina ao meio de cultura na concentração de $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ fez anular a contaminação bacteriana.

Os resultados dos trabalhos por meio dos quais se utilizaram antibióticos na descontaminação de cultivo *in vitro*, são por vezes divergentes. Visando diminuir a contaminação dos explantes, Rosa *et al.* (2009), avaliaram o efeito dos antibiótico oxitetraciclina e sulfato de estreptomicina a 0,3% , no estabelecimento *in vitro* de mirtilo. Esses autores verificaram que não houve influência do uso do antibiótico na descontaminação no meio de cultura. Pereira; Matos e Fortes (2003) observaram que a adição dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina, em concentrações que variaram entre 32 a 256 mg.L^{-1} , inibiram o crescimento de bactérias contaminantes na cultura de tecidos da batata (*Solanum tuberosum* L.).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condução dos experimentos

Os experimentos foram realizados no período de abril de 2011 a janeiro de 2012, no laboratório de cultura de tecidos da Biofábrica, localizado no Centro de Ciências Agrárias, no Campus do Cauamé, da Universidade Federal de Roraima, em Boa Vista, Roraima.

4.2 Material Vegetal

As mudas utilizadas na obtenção dos explantes foram oriundas de sementes de plantas, selecionadas de uma população natural, coletada no lago da Morena, no Município do Cantá-RR. As sementes selecionadas foram extraídas 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. Após, foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 2,0%, por 15 minutos. Posteriormente, as sementes foram secas à sombra, sobre papel jornal, em ambiente ventilado, por um período de 24 horas. Em seguida foram semeadas em canteiros contendo serragem como substrato, no setor de Fruticultura da Embrapa Roraima.

Após emergência e crescimento, as plantas permaneceram em condições de telado por 120 dias.

Para a instalação dos experimentos, utilizou-se segmentos caulinares de aproximadamente 2 cm, contendo duas gemas. Antes da retirada do material vegetal, as plantas foram submetidas à pulverização em dias alternados com solução fúngica constituída da mistura de Derosal® + Cerconil®, na concentração de 2 g.L⁻¹, durante sete dias. Após a retirada dos ramos das plantas, os mesmos foram levados à Biofábrica, onde permaneceram por mais duas horas na mesma solução fúngica utilizada para o pré-condicionamento das plantas em condições de telado. Foram obtidos explantes, constituídos de segmentos caulinares com aproximadamente 2 cm de comprimento. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram submetidos a tríplex lavagem e, posteriormente, a solução com álcool 70%, por 1 minuto, para posteriormente serem submetidos aos diferentes tratamentos de acordo com os experimentos conduzidos.

4.3 Experimentos conduzidos

Experimento 1: Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu em diferentes concentrações e tempos de exposição ao hipoclorito de sódio.

Os tratamentos consistiram do uso de soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de cloro ativo, e imersos em diferentes tempos (5, 10, 15, e 20 minutos).

O tratamento sem agente desinfestante (testemunha) foi realizado nos explantes em testes preliminares e resultou em 100% de contaminação bacteriana e fúngica, indicando, com isso, a necessidade da desinfestação dos segmentos caulinares.

Experimento 2: Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu em diferentes concentrações e tempos de exposição ao cloreto de mercúrio

Os tratamentos consistiram no uso de solução de cloreto de mercúrio nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%, combinados com diferentes tempos de exposição ao produto (5, 10, 15, e 20 minutos) de imersão dos explantes.

O tratamento sem solução de cloreto de mercúrio foi realizado em testes preliminares e resultou em 100% de contaminação.

Experimento 3: Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu em diferentes concentrações e tempos de exposição ao dióxido de cloro

Os tratamentos consistiram do uso de solução de dióxido de cloro nas concentrações de 25; 50; 75 e 100% do veromax® 80 (8%), combinados com diferentes tempos (0, 10, 20 e 30 minutos) de imersão dos explantes na solução desinfestante.

O tratamento testemunha foi realizado por meio de testes preliminares, observou-se 100% de contaminação.

Experimento 4: Uso de antibióticos para o controle da contaminação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu

Foram testados três antibióticos (eritromicina, ampicilina e cloranfenicol), em diferentes dosagens (100, 200, 300 e 600 mg.L⁻¹) adicionados ao meio de cultura WPM.

O tratamento sem adição de antibiótico foi realizado em experimentos preliminares, onde se observou total contaminação bacteriana.

Após a autoclavagem, o meio de cultura foi resfriado à temperatura de 40 °C. Em câmara de fluxo, os antibióticos ampicilina e eritromicina foram pesados em balança eletrônica e adicionados ao meio de cultura. O cloranfenicol, por estar na forma líquida, foi adicionado ao meio com auxílio de micropipeta, utilizando-se ponteiras autoclavadas. Os meios contendo os bactericidas foram agitados durante um minuto para a completa homogeneização e após, vertidos em tubos de ensaio previamente autoclavados. Os meios de cultura foram armazenados por sete dias em ambiente à 25 °C ± 2 °C para verificação de ocorrência de contaminação ocasionada por manipulação durante seu preparo.

4.4 Condições de Cultivo

Para todos os experimentos, após serem submetidos aos diferentes tratamentos, os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 3 mg.L⁻¹ de carvão ativado, 7 g.L⁻¹ de ágar. O meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Os tubos de ensaio com os diferentes tratamentos foram mantidos no escuro a 25 °C ± 2 °C, por um período de sete dias, visando diminuir a oxidação fenólica. Posteriormente, os tubos de ensaios contendo os diferentes tratamentos, de acordo com cada experimento, foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância.

4.5 Delineamento experimental e características avaliadas

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4, excetuando-se o experimento 4 que foi de 3 x 4, com seis repetições, sendo cada repetição composta por cinco tubos de ensaio, contendo um explante cada,

totalizando 480 explantes por experimento, excetando-se o experimento 4, o qual totalizou 360 explantes.

Foram avaliadas a contaminação e a porcentagem de sobrevivência dos explantes aos 7, 14, 21 e 30 dias após a introdução dos explantes no meio de cultura. A sobrevivência dos explantes foi determinada pela análise visual da cor dos segmentos caulinares e das gemas axilares. Os explantes apresentando gemas esverdeadas e caule não enegrecido foram considerados sobreviventes. Os dados de contaminação e estabelecimento dos explantes foram expressos em porcentagem.

Os dados obtidos foram transformados em arco seno de raiz quadrada de $(X+0,5)$ submetidos à análise de variância, e as médias 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).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu em diferentes concentrações e tempos de exposição ao hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio tem sido utilizado rotineiramente na desinfestação de explantes. Dentre as mirtáceas destacam-se os trabalhos realizados na desinfestação de goiabeira serrana e pitangueira (SOUZA *et al.*, 2006b).

No presente trabalho, observou-se a eficiência do hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes de camu-camu. Houve interação significativa entre os fatores concentrações de hipoclorito de sódio e os tempos de imersão nos quais os explantes foram submetidos à ação do agente desinfestante.

Maior porcentagem de desinfestação (100%) foi obtida quando os explantes foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,0 % de cloro ativo, por 20 minutos, porém, foi observado que quanto maior o tempo de exposição dos explantes na solução desinfestante, maiores foram as porcentagem de oxidação. Quando foram utilizados 0,5% e 1,0% de cloro ativo, observou-se comportamento semelhante entre as concentrações testadas, houve uma redução na porcentagem de contaminação à medida que se aumentou o tempo de exposição do explante (Figura 1). O fato indica que menores tempos de exposição para estas concentrações, não são eficientes na descontaminação *in vitro* dos explantes. Já para a concentração de 1,5%, verificou-se um aumento na porcentagem de explantes desinfestados até o tempo de 12 minutos (98%), a partir do qual ocorreu uma redução na porcentagem de explantes desinfestados *in vitro*. Este fato deveu-se à ação germicida do hipoclorito de sódio, que apresenta maior eficiência na desinfestação *in vitro* de camu-camu em maiores concentrações de cloro ativo.

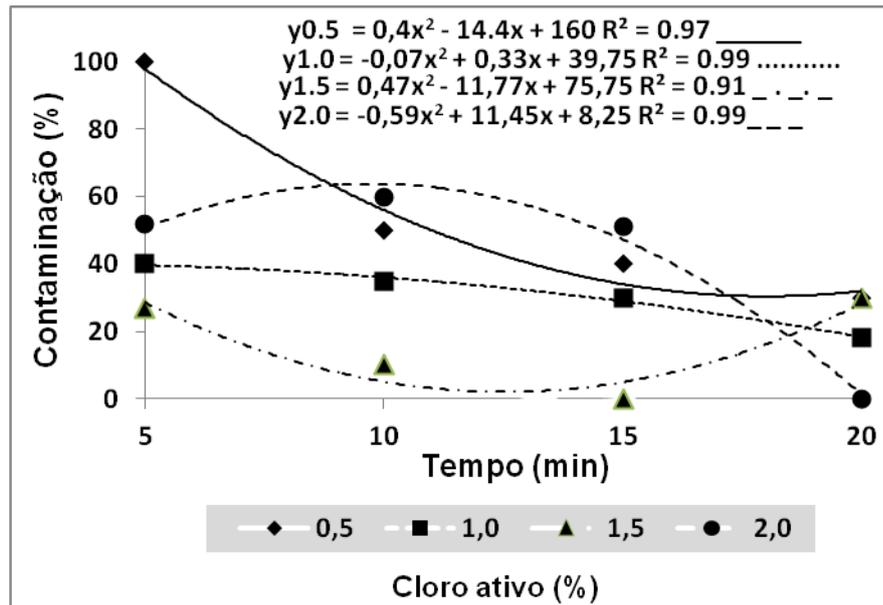


Figura 1 - Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu quando submetidos a diferentes concentrações e tempos de imersão em hipoclorito de sódio, após 30 dias de cultivo em meio WPM. UFRR, Boa Vista, RR, 2012

Resultados semelhantes foram observados por Bianchi *et al.* (2003), em experimentos com a imersão de meristemas de marmeleiro em hipoclorito de sódio, onde o menor percentual de contaminação e as maiores taxas de sobrevivência deram-se na concentração 1,5% de cloro ativo por 10 minutos de imersão. Souza *et al.* (2006b) também observaram que explantes caulinares de goiabeira serrana e de pitangueira podem ser desinfestados usando a concentração de hipoclorito de sódio entre 1,5% a 2,5%, por 10 minutos de exposição no agente desinfestante.

Em relação à variável porcentagem de estabelecimento dos explantes, houve interação significativa entre os fatores testados. Verificou-se que as maiores porcentagens de estabelecimento foram obtidas quando os explantes foram submetidos aos menores tempos de imersão para as concentrações 1,5% e 2,0% de cloro ativo (Figura 2). Observou-se maior porcentagem de estabelecimento quando se utilizou a solução de 1,5% de cloro ativo por 12 minutos com 87,9% de explantes vivos. Nesta concentração, a medida que se aumentou o tempo de imersão ocorreu um decréscimo na porcentagem de explantes estabelecidos. Comportamento semelhante foi observado quando os explantes foram tratados com a concentração de 2,0% de cloro ativo, ou seja, quando houve um aumento do tempo de imersão, reduziu-se a porcentagem de explantes estabelecidos. Tais respostas foram

decorrentes das altas concentrações de cloro ativo e dos maiores tempos de imersão que causaram oxidação dos explantes, ocasionando menores porcentagens de explantes estabelecidos.

Para as concentrações de 0,5 e 1,0 de cloro ativo, à medida que se aumentou o tempo de imersão dos explantes, maiores foram as porcentagem de explantes estabelecidos (Figura 2). Baixas concentrações de hipoclorito de sódio proporcionaram menores taxas de descontaminação, reduzindo-se desta forma a quantidade de explantes estabelecidos.

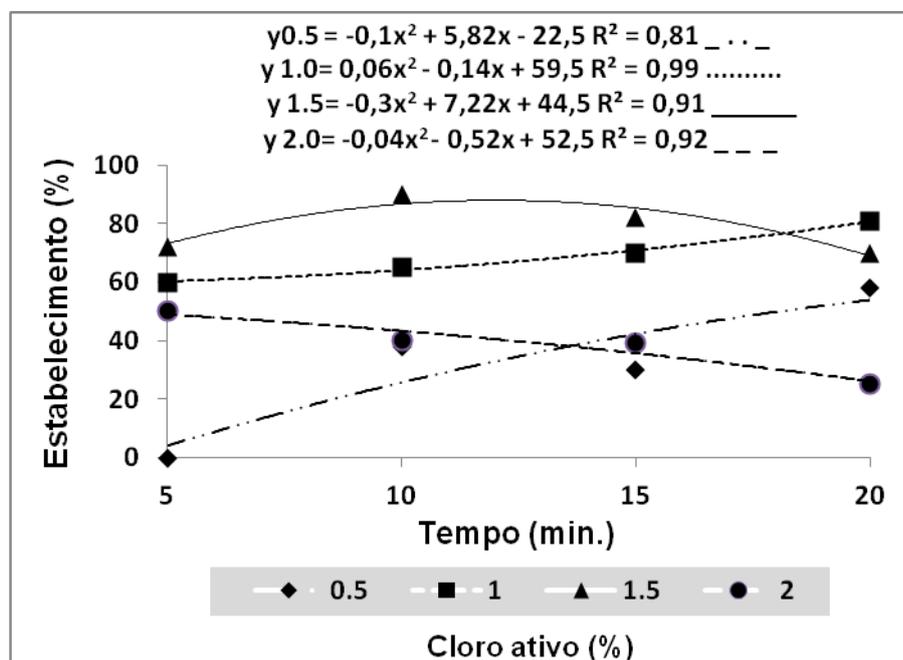
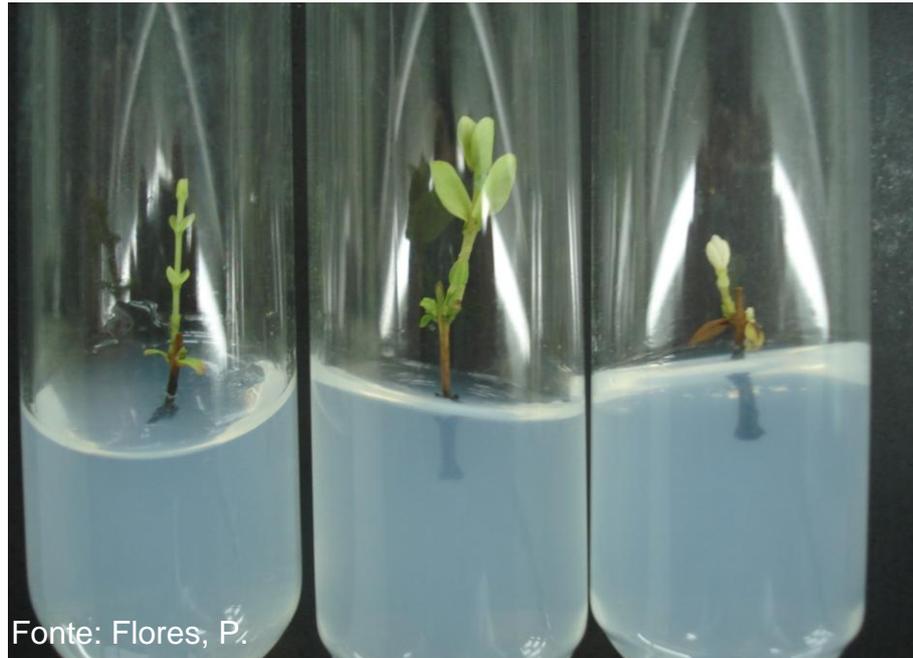


Figura 2 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu quando submetidos a diferentes concentrações e tempos de imersão em hipoclorito de sódio, após 30 dias de cultivo em meio WPM. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Foi observado desenvolvimento de brotações nos explantes de camu-camuzeiro 30 dias após desinfestação, com hipoclorito de sódio a 1,5% por 15 minutos, cultivado em meio de cultura WPM (Figura 3).



Fonte: Flores, P.

Figura 3 – Estabelecimento *in vitro* de camu-camu, desinfestado com hipoclorito de sódio (UFRR). Boa Vista-RR, 2010

Oliveira e Nino (2009) utilizaram o hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos na desinfestação *in vitro* de quatro cultivares de framboeseira, e observaram que na fase de estabelecimento *in vitro*, as cultivares Autumn Bliss e Heritage apresentaram as maiores porcentagens de explantes vivos, respectivamente de 97% e 84%.

A eficiência do hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes *in vitro* foi confirmada por Chaves, Schuch e Bianch (2004) quando utilizado, nas concentrações de 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0%, em explantes de *Prunus*. Os autores observaram que o hipoclorito de sódio proporcionou maiores porcentagens de sobrevivência (96,25%). Entretanto, somente (67,25%) dos explantes se estabeleceram no meio de cultura.

Experimento 2: Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu em diferentes concentrações e tempos de exposição ao cloreto de mercúrio.

Alguns trabalhos foram realizados testando, com sucesso, o cloreto de mercúrio na desinfestação de explantes para cultivo *in vitro*. Ribas *et al.*, (2003)

observaram que o cloreto de mercúrio foi mais eficiente do que o hipoclorito de sódio na desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*).

A utilização de cloreto de mercúrio para a desinfestação de segmentos caulinares resultou em altos percentuais de explantes assépticos (90%). Na ausência deste agente desinfestante houve 100% de contaminação, mostrando a necessidade de se realizar assepsia dos explantes antes da inoculação em meio de cultura.

Melhor resultado de descontaminação foi observado quando se utilizou a concentração de 2,0% por 20 minutos, obtendo-se 90% de desinfestação (Figura 4). Quando se utilizou solução contendo 2,0% de cloreto de mercúrio ocorreu redução na porcentagem de descontaminação até o tempo de 10 minutos, a partir do qual quanto maior tempo de exposição, menores foram as taxas de contaminação. Para concentração de 1,0% houve comportamento semelhante, na qual se observou diminuição na porcentagem de descontaminação até o tempo de 10 minutos. Porém, à medida que se aumentou o tempo de exposição dos explantes na solução desinfestante, foi identificada redução na porcentagem de contaminação. Este comportamento pode ter sido influenciado pelo número de repetições adotado neste experimento.

Já na concentração de 0,5% mantiveram-se praticamente os mesmos índices para todos os tempos testados (60%), havendo uma diminuição na descontaminação dos explantes para o tempo de 20 minutos (50%). A utilização da concentração de 1,5% de cloreto de mercúrio fez reduzir a contaminação dos explantes até a exposição por 15 minutos.

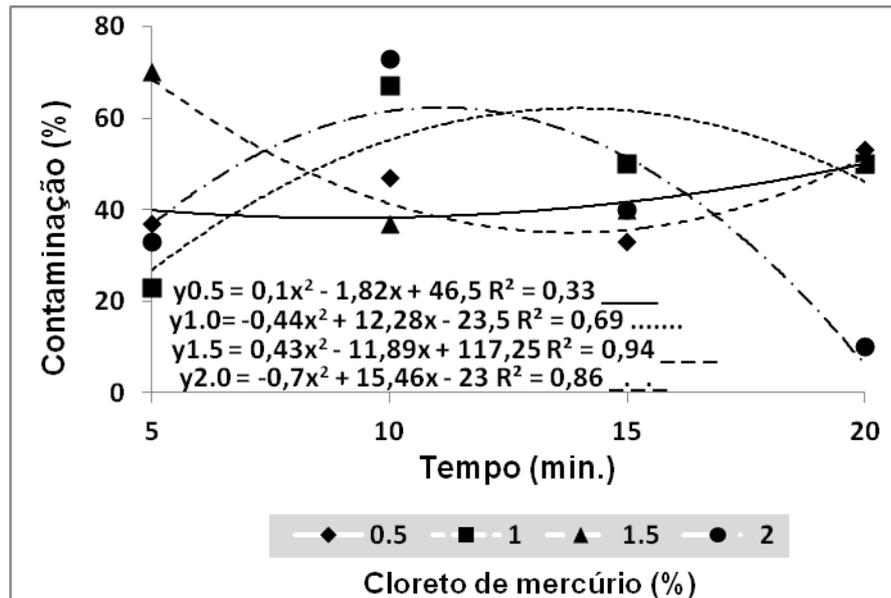


Figura 4 - Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu quando submetidos a diferentes concentrações e tempos de imersão em solução de cloreto de mercúrio, após 30 dias de cultivo em meio WPM. UFRR, Boa Vista, RR, 2012

Porém, apesar dos altos índices de desinfestação (90%), o cloreto de mercúrio mostrou-se altamente tóxicos aos explantes, em todas as concentrações e tempos testados, resultando na oxidação de todos os explantes. Portanto, concentrações mais baixas devem ser testadas a fim de se identificar qual a melhor concentração para desinfestação, sem causar a morte dos explantes.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram observados por Dutra, Hansel e Wendling (2008), quando avaliaram a eficiência de diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (0,01 a 0,5%). Os autores observaram que o aumento da concentração de $HgCl_2$ na solução fez aumentar a oxidação dos explantes.

Fermino Júnior, Nagao e Pereira (2009) observaram 73.4% de descontaminação de segmentos nodais apicais de plantas adultas de *T. grandis*, quando se empregou solução de cloreto de mercúrio na concentração de 0,1% por 15 minutos. Entretanto, nos tratamentos com mais de 15 minutos de exposição ao cloreto de mercúrio, os autores também observaram as maiores porcentagens de oxidação e as menores taxas de sobrevivência. Trabalho realizado com *Aspidosperma polyneuron*, utilizando a concentração de 0,05% de cloreto de

mercúrio, na imersão por 10 minutos, mostrou-se eficiente para desinfestação dos explantes (RIBAS *et al.*, 2005).

Experimento 3: Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu em diferentes concentrações e tempos de exposição ao dióxido de cloro

Outros agentes desinfestantes estão sendo utilizados na desinfestação de explantes para estabelecimento *in vitro*, dentre eles o dióxido de cloro. O uso deste produto apresenta vantagens como agente desinfestante por ser efetivo em pH neutro, e ser mais solúvel que o cloro ativo (DEGANI, 1975). Porém, por ser um produto recentemente usado como agente desinfestante, existem poucos trabalhos relatando as respostas do dióxido de cloro para desinfestação de explantes.

Por meio da análise de variância, verificou-se que houve interação significativa entre as concentrações de dióxido de cloro e o tempo de exposição dos explantes ao produto. O maior índice de desinfestação (60%) foi obtido quando os explantes foram tratados com dióxido de cloro 50%, por 30 minutos. Observou-se que quanto maior o tempo de exposição, maiores foram as porcentagens de desinfestação (Figura 5). Para as concentrações de 75% e 100%, o comportamento foi semelhante, ou seja, quanto maior o tempo de imersão, maiores foram os índices de desinfestação dos explantes. Já para a concentração de 25%, observou-se aumento na descontaminação até o tempo de 20 minutos, a partir do qual se reduziu a porcentagem de descontaminação dos explantes.

Os resultados deste experimento devem-se ao efeito antimicrobiano do agente desinfestante, resultando em 60% dos explantes desinfestados

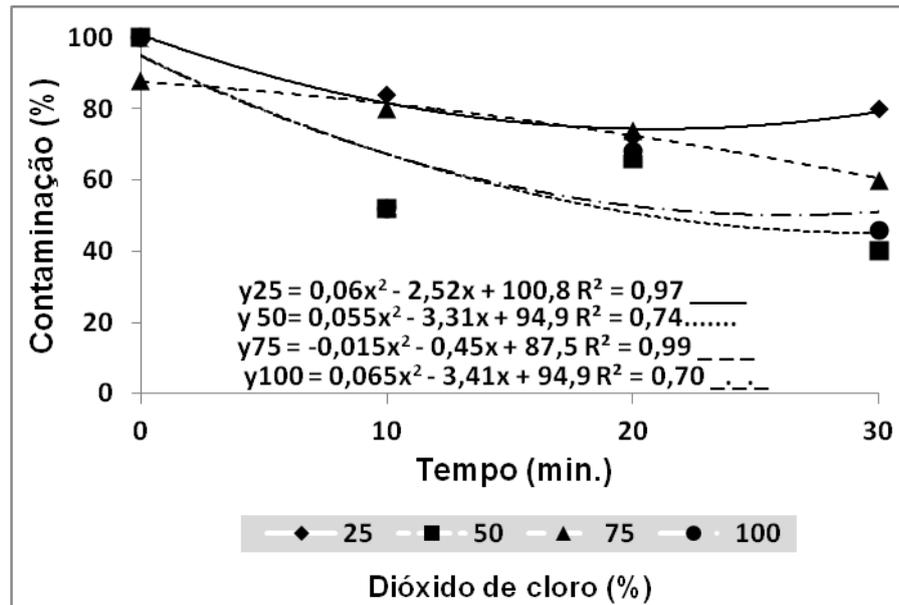


Figura 5 - Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu submetidos a diferentes concentrações e tempos de imersão em dióxido de cloro, após 30 dias de cultivo em meio WPM. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Cardoso (2009), avaliou o efeito da adição de dois agentes desinfestantes ao meio de cultura, o dióxido de cloro e o do ácido peracético, nas concentrações de 0,005 e 0,010%, visando a esterilização química do meio de cultura para o desenvolvimento de mudas de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cultivadas *in vitro*. O autor verificou que o dióxido de cloro apresentou eficiência de 100% na descontaminação, sem causar fitotoxicidade às mudas.

Chone, Almeida e Stancato (2011), testando diferentes concentrações de dióxido de cloro na desinfestação de explantes foliares de *Coffea arabica*, observaram que o uso associado do ClO_2 com o hipoclorito de sódio permitiu a redução de 10% na taxa de contaminação e preservou a integridade dos tecidos de explantes cultivados *in vitro*.

No estudo sobre o estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu submetidos a concentrações de dióxido de cloro, em diferentes tempo de imersão (Figura 6), observou-se que houve interação significativa entre os fatores testados. A maior porcentagem de explantes estabelecidos (60%) foi obtida quando os segmentos caulinares foram tratados com dióxido de cloro a 50% por 30 minutos. Para as concentrações 25% e 75%, notou-se que quanto maior a concentração e

mais longo o tempo de exposição, maiores foram as porcentagens de estabelecimentos. Estes resultados foram decorrentes da ação desinfestante do dióxido de cloro, que induziu, maiores porcentagem de explantes estabelecidos. Na concentração de 100% do produto, observou-se um aumento (45%) na porcentagens de explantes estabelecidos.

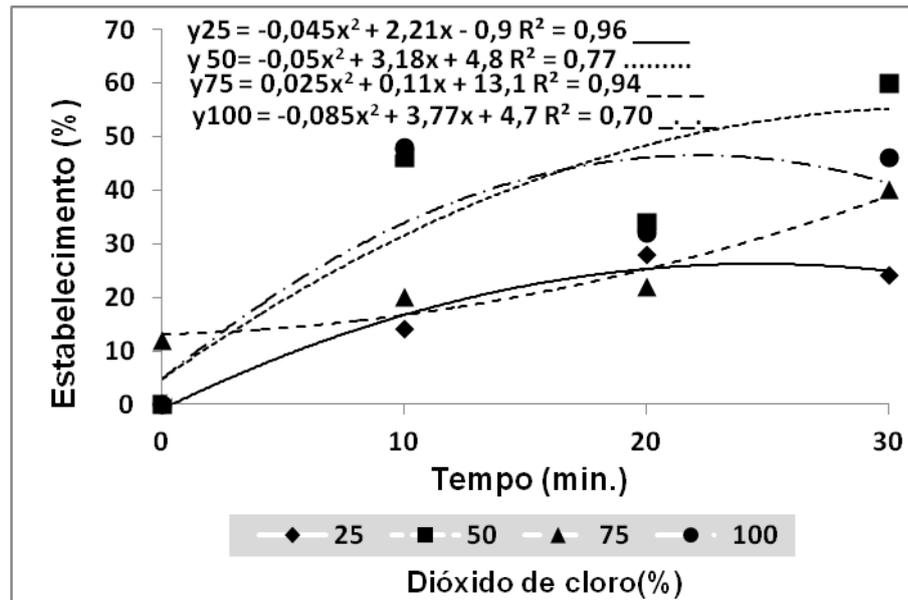


Figura 6: Estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu, submetidos a diferentes concentrações e tempos de imersão em dióxido de cloro, após 30 dias de cultivo em meio WPM. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Segundo Cardoso (2009), a esterilização do meio de cultura com adição de dióxido de cloro, não resultou em efeitos fitotóxicos no desenvolvimento da parte aérea de mudas de antúrio. Chone, Almeida e Stancato (2011), utilizando dióxido de cloro a 0,245% na desinfestação de explantes de *Coffea arábica*, observaram 80% de estabelecimento *in vitro*.

Experimento 4: Uso de antibióticos para o controle da contaminação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu

Os contaminantes, especialmente as bactérias endógenas, impõem consideráveis limitações mesmo na fase de introdução *in vitro*. Diversas pesquisas

têm sido realizadas para a prevenção ou eliminação dos contaminantes do cultivo *in vitro* de plantas, desde os cuidados com as plantas-matrizes, até o uso de produtos antimicrobianos, adicionados ao meio de cultura para o desenvolvimento de protocolo de assepsia (PEREIRA *et al.*, 2009).

As diferentes doses de antibióticos adicionados ao meio de cultura apresentaram efeito significativo no controle da contaminação fúngica dos explantes de camu-camu. Melhores resultados foram obtidos com a adição do antibiótico cloranfenicol ao meio de cultura, onde se observou uma redução na porcentagem de contaminação fúngica até a concentração de 383 mg.L⁻¹, obtendo-se média de 83,2% de desinfestação dos explantes (Figura 7). Para o antibiótico ampicilina, mantiveram-se praticamente os mesmos índices no controle da contaminação, sendo que a partir da dose 300 mg.L⁻¹, observou-se uma tênue redução da contaminação. Já a eritromicina, não se mostrou efetiva no controle da contaminação, sendo observada altas porcentagens de contaminação (70%), até mesmo na dose mais elevada 600 mg.L⁻¹. Mesmo com a adição de antibióticos ao meio de cultura e tratamentos com hipoclorito de sódio conforme descrito no experimento 1, deve-se testar outros produtos, para um melhor controle fúngico.

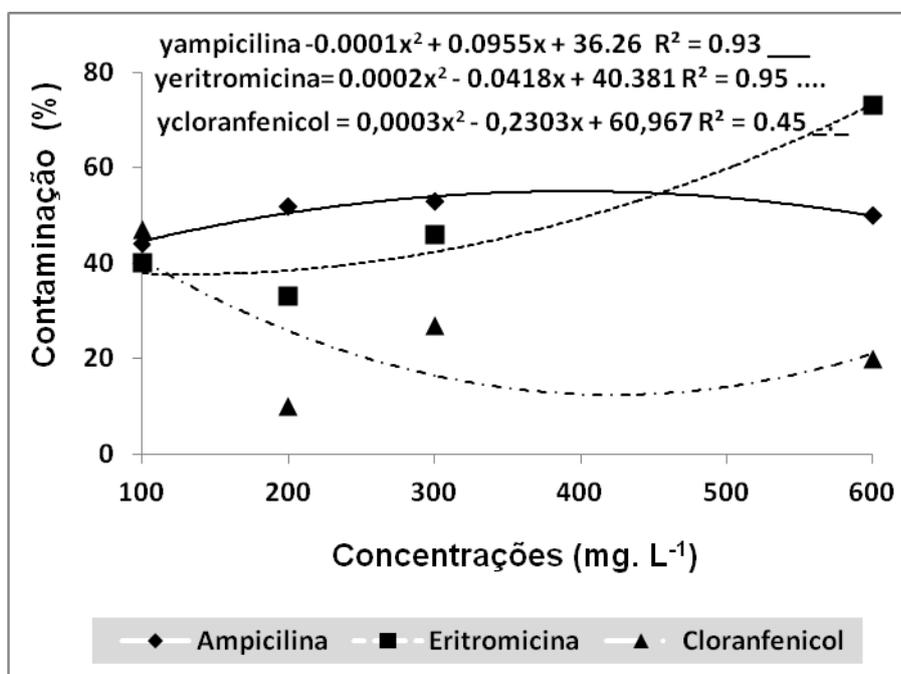


Figura 7: Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu quando submetidos a diferentes doses de

antibióticos, após 30 dias de cultivo em meio WPM. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Apesar de ter ocorrido uma desinfestação prévia com hipoclorito de sódio, ainda houve 70% de contaminação fúngica (Figura 7). Portanto, torna-se necessário realizar novos testes envolvendo pulverizações por períodos mais prolongados com fungicidas nas plântulas mantidas em viveiro, utilizando fungicidas mais eficientes (sistêmicos) que visem diminuir a porcentagem de explantes com contaminação fúngica. Cid e Zimmermann (2006) relatam que o uso de compostos químicos, como hipoclorito de sódio, etanol e fungicidas nas doses e tempos adequados para cada explante, pode ser eficiente no controle da contaminação fúngica em cultivos *in vitro*.

As altas taxas de contaminação bacteriana observadas nos experimentos preliminares tornaram necessário o uso de antibióticos no estabelecimento *in vitro* de camu-camu. Provavelmente havia presença de bactérias endógenas nas plantas, pois, em muitos casos, a contaminação bacteriana só foi detectada após semanas de cultivo *in vitro*.

A escolha dos antibióticos foi feita por serem rotineiramente utilizados na cultura de tecidos e, não terem efeito fitotóxico às culturas. Além disso, estes antibióticos apresentam amplo espectro de ação, inibindo o crescimento de bactérias gram positivas e bactérias gram negativas.

De acordo com Santos (2003), mesmo com a utilização de antibióticos adicionados no meio de cultura, a eliminação completa de certas bactérias se torna difícil, uma vez que os produtos mais usados na cultura de tecidos possuem ação bacteriostática e não bactericida.

De acordo com a análise de variância, observou-se que houve interação significativa entre os fatores testados para controle da contaminação bacteriana. Melhores resultados foram obtidos com a adição do antibiótico cloranfenicol no meio de cultura (Figura 8), que fez reduzir a contaminação até a dose de 200 mg.L⁻¹, a partir da qual todas as doses resultaram no controle total da contaminação. O antibiótico ampicilina também se mostrou efetivo no controle de bactérias, onde todas as doses testadas apresentaram bons resultados no controle da contaminação. Na concentração de 600 mg. L⁻¹ observou-se controle total da contaminação. Avaliando os custos e o controle da contaminação, recomenda-se utilizar a dose mais baixa 100 mg. L⁻¹, que resultou em 98% de descontaminação.

Para o antibiótico eritromicina foi observado redução significativa na porcentagem da contaminação à medida que se aumentou a dosagem do antibiótico no meio de cultura. Dentre os três antibióticos testados a eritromicina apresentou-se menos efetiva no controle da contaminação bacteriana presente nos explantes de camu-camu.

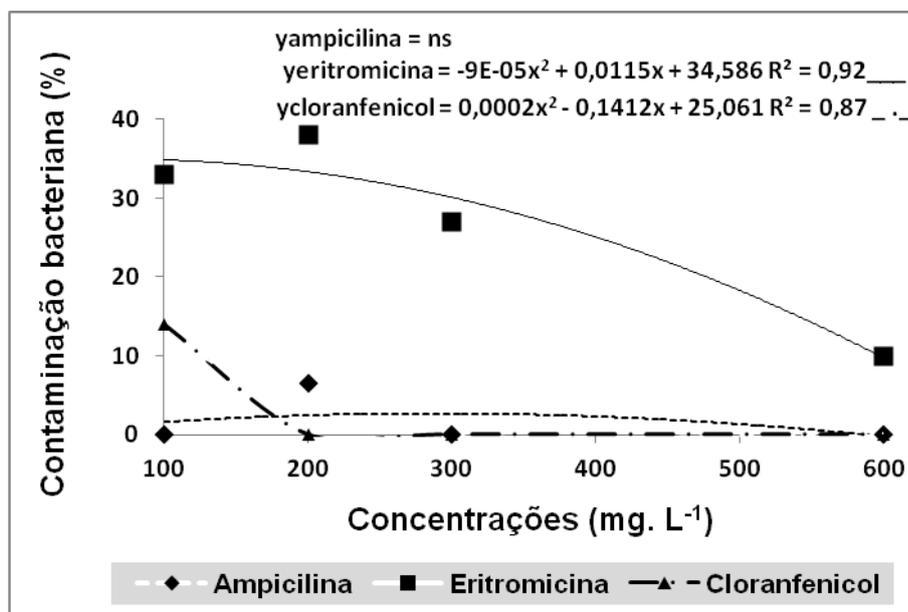


Figura 8 - Desinfestação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu quando submetidos a diferentes doses de antibióticos, após 30 dias de cultivo em meio WPM. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Resultados semelhantes foram observados por Palú *et al.* (2011), quando avaliaram a eficiência de alguns antibióticos em meio de cultura para o controle de bactérias endógenas em gemas apicais de figueira. Os autores obtiveram 0,60% de contaminação bacteriana quando utilizaram o antibiótico ampicilina na concentração de 250 mg.L⁻¹.

Pereira *et al.* (2003), estudaram bactérias endofíticas contaminantes da cultura *in vitro* da batata (*Solanun tuberosum*) e observaram que entre doze antibióticos testados, seis apresentaram algum tipo de controle e, destes, os melhores resultados foram proporcionados pelo uso da ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina. Estes resultados corroboram com os obtidos no presente experimento, onde a ampicilina e o cloranfenicol, mostram-se mais efetivos no controle da contaminação bacteriana *in vitro*.

A contaminação bacteriana pode ser um fator limitante no processo de estabelecimento da cultura *in vitro*. Normalmente, são utilizadas substâncias antibióticas que são incorporadas ao meio de cultura, uma vez que as bactérias competem diretamente com explante no meio de cultura, e impedem o bom desenvolvimento dos explantes.

De acordo com a análise de variância, observou-se que houve interação significativa entre os fatores testados. Maiores porcentagens de estabelecimento foram obtidas quando adicionou-se no meio de cultura o antibiótico ampicilina na dosagem de 600 mg.L^{-1} , obtendo-se 50% de estabelecimento (Figura 9). O antibiótico eritromicina também mostrou-se eficiente no estabelecimento dos explantes de camu-camu, quando utilizado até a dose de 300 mg.L^{-1} , a partir da qual, quanto maiores as dosagens, menores as porcentagens de estabelecimento. Para o antibiótico cloranfenicol, houve uma redução na porcentagem de explantes estabelecidos a medida que se aumentou a dose no meio de cultura. Observou-se que as concentrações a partir de 200 mg.L^{-1} mostraram-se fitotóxica aos explantes, ocasionando 0% de estabelecimento.

O efeito fitotóxico do cloranfenicol foi atribuído a sua ação inibidora na síntese protéica em plantas, podendo, em alguns casos, interferir no desenvolvimento de cloroplastos e mitocôndrias (LEIFERT *et al.*, 1991). De maneira geral, o antibiótico ampicilina, mostrou-se mais efetivo, quando relacionado com a porcentagem de desinfestação e estabelecimento, quando comparado aos demais antibióticos.

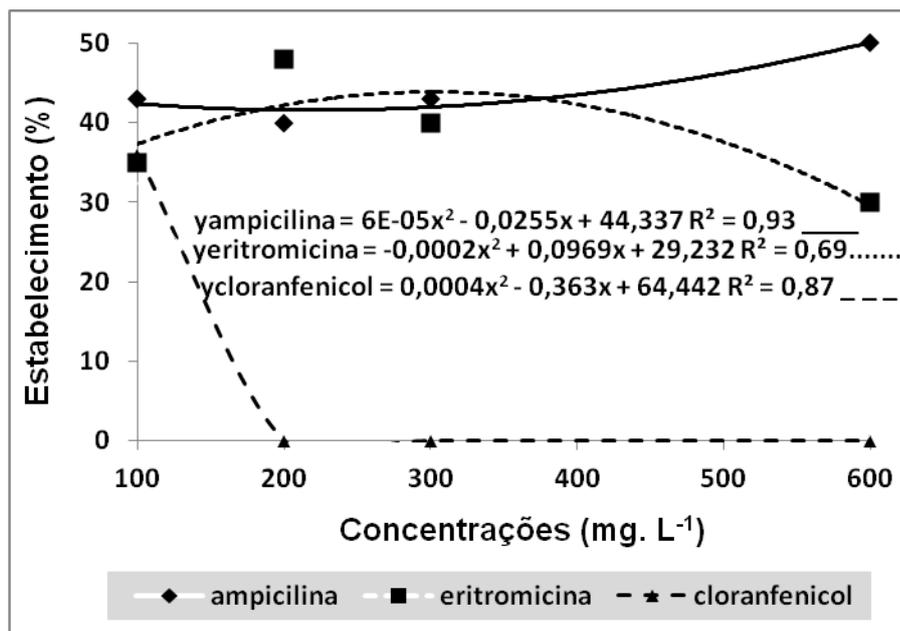


Figura 9: Estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camu quando submetidos a diferentes doses de antibióticos, após 30 dias de cultivo em meio WPM. UFRR, Boa Vista, RR, 2012.

Pereira e Fortes (2003) testando diferentes antibióticos no cultivo *in vitro* de batata-doce, obtiveram resultados semelhantes aos do presente experimento. A ampicilina foi o único antibiótico que não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes de batata, mesmo na mais alta concentração (1.024 mg.L⁻¹). Houve cerca de 100% de sobrevivência dos explantes, indicando não ter havido efeito fitotóxico deste antibiótico sobre a cultura. Por outro lado, o aumento das concentrações de cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina no meio de cultura resultou em efeitos fitotóxicos severos sobre o crescimento e taxa de multiplicação do material vegetal.

Resultados satisfatórios com o antibiótico ampicilina também foram observados por Palú *et al.* (2011), que obtiveram 90,69% de explantes de figueira estabelecidos, quando estes foram cultivados em meio de cultura adicionado com 250 mg.L⁻¹ de ampicilina.

6. CONCLUSÕES

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

- O hipoclorito de sódio a 1,5 % de cloro ativo, por 12 minutos foi eficaz na desinfestação de segmentos caulinares de camu-camuzeiro, obtendo-se 98% de desinfestação.
- O cloreto de mercúrio nas concentrações utilizadas mostrou-se tóxicos aos explantes.
- A utilização do dióxido de cloro na concentração de 50% por 30 minutos resultou em 60% de desinfestação dos segmentos caulinares de camu-camuzeiro.
- É possível controlar a contaminação bacteriana no cultivo *in vitro* de camu-camuzeiro, adicionando-se ao meio de cultura 100 mg.L⁻¹ do antibiótico ampicilina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais**. Documentos. Embrapa Cerrados 58: 1-14, 2002.

ARÉVALO L. **Evaluación de métodos de clonación de camu-camu (*Myrciaria dubia*), mediante estacas**. 2003. 75f. Monografía (Trabalho Graduação em Agronomia) - Facultad de ciencias agronómicas, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, 2003.

AZEVEDO, D.M. **Efeito do ácido indolbutírico (AIB) e substratos sobre o enraizamento de estacas de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh)**. 1999. 40f. Monografía (Trabalho de Graduação em Agronomia) - Faculdade de ciências Agrônômicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1999.

BAGHEL, R. S.; TIWARI, S.; TRIPATHI, M.K. Compararison of morphogenic and plant regeneration ability of some explants of teak (*Tectonas grandis* Linn. F). **Journal of Agriculturae Technology**, Tahran, Iron, v. 4 n. 2, p. 125-136, 2008.

BERTONCELLI, D. J., HASSE, I., OLIVEIRA, M. C. Desinfestação e Estabelecimento *in vitro* de Explantes de *Jacaranda mimosaeifolia* D. DON. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2009.

BIANCHI, V.J.; CHAVES, A. da 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, RS, v. 9, n. 2, p. 177-179, 2003.

BUENO, L.C. de S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 319p.

CARDOSO, J. C. Esterilização química de meio de cultura no cultivo *in vitro* de antúrio. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.7, p.785-788, jul. 2009

CHAVES A. da C.; SCHUCH, M. W. ; BIANCHI, V. J. Desinfestação de explantes de *prunus* cv. mr. s. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista brasileira Agrociência**, v.10, n. 2, p. 249-250, abr-jun, 2004.

CHONE, R. M. S.; ALMEIDA, J. A. S. DE; STANCATO, G. C. Ação do dióxido de cloro na desinfestação de explantes foliares de *Coffea arábica*. In CONGRESSO

BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 18., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 5., 2011, Joinville, SC. Itajaí, SC: ABCTP / SBFP, 2011

CID, P. B. L., TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. **In Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa Informação tecnológica. 303p. 2010.

CID, L.P.B.; ZIMMERMANN, M.J. **A contaminação *in vitro* de Plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Boletim de Pesquisa, 122).

DEGANI. Divisão Química. Anthium dioxide. Porto Alegre, 1975. (Boletim, D30).

DONINI, L. P., SOUZA, J. A., MOURA, I. F., GUISSO, A. P., VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de Aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**. , v.72, p.517 - 522, 2005.

DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A.; WENDLING, I. Introdução ao cultivo *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) [**recurso eletrônico**] / - **Dados eletrônicos**. -Colombo : Embrapa Florestas, 2008.

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

ESASHIKA, T.; OLIVEIRA, L. A. DE; MOREIRA, F. W. Teores foliares de nutrientes em plantas de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) submetidas a adubações orgânica, mineral e foliar. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár.**, Recife, v.6, n.3, p.391-400, 2011

FERMINO JUNIOR, P. C. P., NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Revista Sci. For.**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009

FERREIRA, S. A.N.; GENTIL, D. F. O. Propagação assexuada do camu-camu (*Myrciaria dubia*) através de enxertia do tipo garfagem. **Acta Amazônica**. V. 27. p. 163-168, 1997.

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.

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

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC. **Rev. Bras. Fruticultura.**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 18-20, Abril 2006

GARCIA, M. M.; FIGUEIREDO, G. S.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de uvaia: tempo de desinfestação, desinfestante e meio de cultura. In: XII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2008.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba: USP/ESALQ, 2000. 477p.

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

GUTIÉRREZ-ROSATI, A.; ROJAS, E.I.; MICKY, M.; RODRIGUEZ, M. Avances en la introducción de genotipos de camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh). **Folia Amazônica**, p.57-60, 2006.

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. 880p.

HIRATA, M.H. & MANCINI FILHO, J. **Manual de biossegurança**. Barueri: Ed. Manole, 2002. 496p.

HOLFORD, P.Ç NEWBURY, H.J. The effects of antibiotics and their breakdown products on the *in vitro* growth of *Anturrhinum manjus*. **Plant cell report**, Berlun, v11, p. 93-96, 1992.

LATTUADA, D. **Micropropagação e Miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. 75f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S.M.; WAITES, B.; CHEYNE, V.A.; WAITES, W. M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

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. **Int. Plant Prop. Soc. Proceedings**, n. 30, p. 421-427, 1980.

MALLIKARJUNA, K.; RAJENDRUDU, G. High frequency in vitro propagation of *Holarrhena antidysenterica* from nodal buds of mature tree. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 51, n. 3, p. 525 - 529, September 2007.

MAMIDALA, P.; NANNA, R. S. Efficient *in vitro* plant regeneration, flowering and fruiting dwarf tomato c.v. micro-msk. **Plant omics journal lindfield**, v.2, p. 98-102, 2009.

MARQUES, M.P.; ANDRADE, J.S.; SOUZA, R.S. Processamento de frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) para xarope concentrado. In: **REUNIÃO REGIONAL DA SBPC**, 2005, Manaus. Resumos. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2005.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.

MENEZES, H.C.de. Saudável Camu-camu. **Pesquisa Revista Fapesp**. São Paulo, p. 64-65. 2001.

MOREIRA FILHO, M.; FERREIRA, S. A. N. Clonagem do camu-camu arbustivo em porta-enxertos de camu-camu arbustivo e arbóreo. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 4, p. 1202-1205, Dezembro 2009.

NASCIMENTO, A. C., RENATO, P., NOGUEIRA, R.C., PORTOD, J. M. P., NOGUEIRA, G. F., SOARES, F. P.. BAP E AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223-228, abr./jun. 2008

NAUE, C.R; BENITIZ, L.B; MEDEIROS, C. V. Eliminação de contaminantes microbianos da cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum* L. In: **CONGRESSO INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 16., 2007. Pelotas, RS. Resumos... Pelotas, RS: Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2007. p. 1-5.

NUNES, H.C.B.; MOTA, M.G.C.; KIKUCHI, T.Y.P.; VIEIRA, I.M.S.; RIBEIRO, S.I. Germinação *in vitro* de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh). **Revista Ciência. Agrária**. n. 38, p.107-118, 2002.

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, 2005. v. 14. n. 2. 85-89p.

OLIVEIRA, A.S.N; ANDRADE, J.S.; SILVEIRA, J.S. Elaboração de néctar de cubiu (*Solanum sessiflorum* Dunal) e camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh). In: **Reunião Regional da SBPC**, 2005, Manaus. Resumos. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2005

OLIVEIRA, R. P. DE; NINO, A. F. P. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de framboeseira. **Rev. Bras. Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 280-284, Março 2009.

OLTRAMARI, A.C., VESCO, D. L. L., PEDROTTI, E. L., DUCROQUET, J-P. H. J., NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000.

PALÚ, E. G.; CORRÊA, L. DE S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Rev. Bras. Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 2, p. 587-592, Junho 2011.

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

PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.R.L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata

micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. DE L. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol.38 no.11 Brasília Nov. 2003.

PEREIRA, G.A.; RIBEIRO, B.V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M.B. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

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

PEUCKERT, Y. P.; VIERA, V. B.; HECKTHEUER, L. H. R.; MARQUES, C. T.; ROSA, C. S. da. Caracterização e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de proteína texturizada de soja e camu - camu (*Myrciaria dúbia*). **Alim. Nutr., Araraquara** v.21, n.1, p. 147-152, jan./mar. 2010

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jaboticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, 2007. v.8. n.1. 1-5p.

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

RIBAS, L. L., ZANETTE, F., KULCHETSCKI, L., GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 517 – 524, 2005

RIBAS, L. L., ZANETTE, F., KULCHETSCKI, L., GERRA, M. P. Estabelecimento de Culturas Assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 115-122, 2003.

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**, 31. p.9. 2002.

RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; DONINI, L P; SOARES, G. C.; SCHUCH, M. W. Desinfestação de explantes de cerejeira-do-rio-grande (*Eugenia involucrata* dc.) visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. In **XV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, VII Encontro de Pós-Graduação**, 2008.

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.

ROSA, LU. P. P. da; ETCHEVERRIA, C.; DÁVILA, E. da S.; MARTINS, C. R. Efeito de antibiótico e do período de escuro no estabelecimento *in vitro* de mirtilo *vacciniun* spp. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.16, n.2, p. 265-277. 2009

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

SANTOS, E. K. **Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais**. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (orgs.). Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: UFRGS, p. 415-444, 2003.

SASSO, S. A.Z. **Propagação vegetativa de Jaboticabeira**. 64f. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus dois vizinhos, 2009.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS PEQUENAS EMPRESAS. **Produtos potenciais da Amazônia**. Brasília. p87, 1996.

SREBERNICH, S.M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, p.787-792, 2007.

SILVA, F. W. C. **Efeito de fitoreguladores e de substratos na propagação vegetativa de camu-camu, por meio de estacas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Roraima/UFRR. 2009.

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* McVaugh). In **9 SLACA**: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO 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.) McVaugh). In **9 SLACA**: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, Campinas, São Paulo – Brasil, 2011b.

SOARES, G. C.; FERRI, J.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; SCHUCH, M. W. MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE FEIJOA (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) E PITANGUEIRA (*Eugenia uniflora* L.). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFP, 14, Pelotas, 2005. **Anais...** Pelotas, 2005.

SOUZA, Joseane. Propagação *in vitro* de fruteiras nativas: araçá (*Psidium Cattleianum* Sabine), feijoa (*Acca selowiana* (Berg) Burret) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.). 2007. 125f. **Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado)**- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C.; FERRI. J.; SOARES, G. C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, jan-mar, 2007.

SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; SILVEIRA, D.G.; SOUZA, F.V.D.; FARIA, G.A.; NETO, H.P.S.; SANTOS SEREJO, J.S.; SILVA, K.M.; COSTA, M.A.P.C.; SOARES, T.L.; JUNGHANS, T.G; ALMEIDA, W.B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006a. 152p.

SOUZA, J.A. SCHUCH, M. W. ; SILVA, L. C. da ; SOARES, G. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Científica Rural**, Bagé, v.11, n.1, p.39-44, 2006b.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta-matriz no estabelecimento *in vitro* do araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1920-1922, 2006.

SHIRIN, F.; RANA, P.K. *In vitro* plantlet regeneration from nodal explants of field-grown callus in *Bambusa glaucescens* Willd. **Plant Biotechnology Reports**, Tokyo, v. 1, n. 3, p. 141 - 147, August 2007.

SHIRIN, F.; RANA, P.K.; MANDOL, A. K.; *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* Through axillary bud proliferation. **Current Biology united kingdom**, n.13, p. 837-842, 2003.

SUGUINO, E.; GLÓRIA, B. A.; ARAÚJO, P. S. R.; SIMÃO, S. Propagação vegetativa de camu-camu por meio de enxertia intergenérica na família Myrtaceae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasileira, v.38, n.12, p.1477-1482, 2003.

TAKHATAJAN, A.L. Outline of the classification of the flowering plants (Magnoliophyta). **The Botanical Review**, New York, 16(3): 226-359, 1980.

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

TERESCO, S.; MIGUEL, C.; MAROCO, J.; OLIVEIRA, M.M. Susceptibility of embryogenic and organogenic tissues of maritime pine (*Pinus pinaster*) to antibiotics used in agrobacterium – mediated genetic transformation. **Plant cell Tissue and organ Culture**. Gordrecht, n. 87, p. 33-40, 2006.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M. & ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2000

TIWARI, S. K.; TIWARE, K. P. SIRIL, E. A.; An improved micropropagation protocol for-teak. **Plant cell Tissue and organ Culture**. Gordrecht, n. 71, p. 1-6, 2002.

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

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**.-Dados eletrônicos. – Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

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

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.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J. P.L; YAYAMA, L. K. O. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e camu-camu (*Myrciaria dubia* .(H.B.K.) McVaugh) possuem ação antianêmica? **Acta Amazonica**, Manaus, v. 32, n.4, p. 625-633, 2002.

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

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