

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEGMENTOS APICAIS E FORMAÇÃO DE
PLÂNTULAS DE *Libidibia ferrea* (MART. EX TUL.) L. P. QUEIROZ**

MANAUS – AM

2019

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOÃO ANTÔNIO DOS SANTOS MONTEIRO

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEGMENTOS APICAIS E FORMAÇÃO DE
PLÂNTULAS DE *Libidibia ferrea* (UL.) L. P. QUEIROZ**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do curso
Ciências Biológicas da Universidade do
Estado do Amazonas para obtenção do título
de licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Maria Astrid Rocha Liberato

Coorientador: Prof.^o Dr. Daniel Silva

MANAUS – AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

M775e	<p>Monteiro, João Antônio dos Santos Estabelecimento in vitro de segmentos apicais e formação de plântulas de <i>Libidibia ferrea</i> (MART. EX TUL.) L. P. Queiroz / João Antônio dos Santos Monteiro. Manaus: [s.n], 2019. 56 f.: color.; 30 cm.</p> <p>TCC - Graduação em Ciências Biológicas-Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019. Inclui bibliografia Orientador: Liberato, Maria Astrid Rocha Coorientador: Silva, Daniel</p> <p>1. Jucá. 2. Descontaminação de explantes. 3. estaquia. I. Liberato, Maria Astrid Rocha (Orient.). II.Silva, Daniel (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. ESTABELECIMENTO IN VITRO DE SEGMENTOS APICAIS E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE <i>LIBIDIBIA FERREA</i> (MART.EX TUL.) L. P. Queiroz</p>
-------	--



AMAZONAS

GOVERNO DO ESTADO

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA

ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS

CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA AP1)

ALUNO: João Antonio dos Santos Monteiro

TÍTULO DO TCC:

Estabelecimento in vitro de segmentos apicais e formação de plântulas de *biobidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L.P. Queiroz

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador: <u>Daniel da Silva</u>	<u>10,0</u>
b) 1º avaliador(a): <u>M^a da Glória G. de Melo</u>	<u>10,0</u>
c) 2º avaliador(a): <u>Jeda Stotencio Batista</u>	<u>10,0</u>
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	<u>10,0</u>

MÉDIA DA NOTA: 10,0

Manaus, 02 de agosto de 2019

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

Daniel

Orientador(a)

[Signature]

1º Avaliador(a)

Jeda Stotencio Batista

2º Avaliador(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos espíritos da luz por alcançar esta etapa importante na minha vida. Agradeço por guiar meu caminho com esperança, alegria, sabedoria, força de vontade e confortar meu coração nos momentos difíceis.

A minha mãe Goreth Abreu por todo amor, carinho, suporte financeiro, os conselhos, a paciência, a amizade e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao meu pai Edy Monteiro pela amizade, apoio e por trazer eu e minha irmã todas as segundas de madrugada do sitio para chegar na cidade antes das 7 horas para não perder a aula na faculdade pela manhã ao longo desses cinco anos.

As minhas irmãs Maria Fernanda, Maria Eduarda e minha vó Maria de Lourdes por toda ajuda, amizade, carinho e cumplicidade.

A minha orientadora, Dra. Maria Astrid Rocha Liberato pela oportunidade, orientação e por todos conhecimentos transmitidos ao longo de todo o curso.

Ao meu coorientador, Dr. Daniel Silva pela orientação e por me apresentar vários ensinamentos sobre essa área tão fascinante que é a Cultura de Tecidos Vegetais.

Aos colegas de laboratório que encontrei durante a realização dos experimentos: Kamylla Rosas, Matheus Uchôa, Rayssa Gomes e especialmente Alcineia Dantas por toda parceria e cumplicidade nesse período de experimentos.

As minhas colegas Cila Silva e Zélia Muniz, pela amizade, conversas infinitas na praça, os convites para tomar sorvete e acima de tudo pelas palavras de motivação.

As minhas amigas desde do início da faculdade Joyce Kelly e Leynna Santos pela parceria ao longo desses cinco anos de graduação nas provas, seminários, aulas de campo e companhia no famoso “palácio do consumo”.

Aos amigos da turma de Ciências Biológicas UEA que eu fiz Ana Kézia Pimentel, Antônio Luiz, Emily, Guimi (Ingrid Alencar), Ícaro Lima, Klaiane Silva, João Paulo Queiroz, Laynah Pimenta, Marcilene Silva, Miqueias Printes, Mayara Batista, Meirijane Carvalho, Michele Oliveira, Rayssa de Souza, Sabrina Lima, Silvana Barbosa, Tais Neves, Thais Benchimol pelas parcerias nas aulas de campo e seminários, as boas conversas na praça da ENS e pelo convívio harmonioso ao longo desses anos.

A todos os professores do curso de Biologia da UEA pelos conhecimentos e experiências compartilhadas que contribuíram na minha formação profissional.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

Fazer sem saber completamente o que se faz é dar-se uma chance de descobrir, no que se faz, algo que não se sabia.

Pierre Bourdieu

RESUMO

Libidibia ferrea conhecida como jucá pertence à família Fabaceae nativa do Brasil, distribuída no Norte e Nordeste. É uma espécie medicinal com propriedades terapêuticas e antimicrobianas com compostos de importância farmacêutica. No entanto, apresenta dormência tegumentar com dificuldades na produção de sementes o que prejudica sua propagação. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo verificar a eficácia de métodos de desinfestação para segmentos nodais, e a influência do ácido indolbutírico para o estabelecimento *ex vitro* de segmentos apicais de *L. ferrea*. O estudo foi desenvolvido, em dois experimentos, no laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais LASTED. Para o experimento I, os segmentos nodais foram obtidos de plantas matrizes do Campus III, INPA. Os explantes foram submetidos em diferentes soluções de hipoclorito de sódio (0,10, 0,50 e 1%); álcool 70%, fungicida sistêmico (25, 50, 75 e 100%), bem como a combinação destes agentes desinfetantes. Os resultados indicam que 100% de explantes apresentaram contaminação microbiana e oxidação sendo que nenhum tratamento foi eficiente para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais. O experimento II foi desenvolvido no viveiro do LASTED. O material vegetal foi obtido de plântulas juvenis de *L. ferrea* cultivadas no INPA. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3, com um tipo estaca: apical; três substratos: solo orgânico, vermiculita e solo orgânico + vermiculita; e três concentrações de ácido indolbutírico 0, 1000 e 3000 (mg L⁻¹). As estacas foram conduzidas em três tipos de substratos em bandejas de plástico. Após 90 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência (%), enraizamento (%), número de brotações, comprimento da estaca (cm), comprimento da raiz (cm) e número de folhas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados mostraram que as estacas de jucá apresentaram facilidade de sobrevivência, enraizamento e crescimento uniforme em todos os tratamentos testados. A combinação de estaca apical com o substrato solo orgânico + vermiculita na concentração 1000 (mg L⁻¹) de AIB promoveu maior desenvolvimento das estacas.

Palavras chaves: jucá, descontaminação de explantes, estaquia.

ABSTRACT

Libidibia ferrea known as jucá, belongs to the Fabaceae a native family of Brazil, it is distributed in the North and Northeast. It is a medicinal species with therapeutic and antimicrobial properties with compounds of pharmaceutical importance. However, it has cutaneous numbness with difficulties in seed production, which impairs its propagation. So, the objective of this paper was to verify the efficacy of disinfection methods for nodal segments, and the influence of indolbutyric acid for the *ex vitro* establishment of *L. ferrea* apical segments. The study was conducted in two experiments at the LASTED Forestry and Digital Technologies laboratory. For experiment I, nodal segments were obtained from matrix plants of Campus III, INPA. The explants were submitted to different sodium hypochlorite solutions (0.10, 0.50 and 1%); 70% alcohol, systemic fungicide (25, 50, 75 and 100%), as well as the combination of these disinfectant agents. The results indicate that 100% of explants presented microbial contamination and oxidation and no treatment was efficient for *in vitro* establishment of nodal segments. Experiment II was developed in the LASTED nursery. Plant material was obtained from juvenile *L. ferrea* seedlings grown at INPA. The design used was completely randomized in a 3 x 3 factorial scheme, with a stake type: apical; three substrates: organic soil, vermiculite and organic soil + vermiculite; and three indolbutyric acid concentrations 0, 1000 and 3000 (mg L⁻¹). The cuttings were conducted on three types of substrates in plastic trays. After 90 days the following variables were evaluated: survival (%), rooting (%), number of shoots, cut length (cm), root length (cm) and number of leaves. The results were submitted to variance analysis and the means were compared by Tukey test at 5% probability. The results showed that the jucá cuttings showed easy survival, rooting and uniform growth in all tested treatments. The combination of apical cuttings with organic soil + vermiculite substrate at IBA concentration 1000 (mg L⁻¹) promoted a higher cuttings development.

Keywords: juca, explant decontamination, cutting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Aspectos gerais da espécie <i>Libidibia ferrea</i>	17
Figura 2 Princípio geral da cultura de células e tecidos vegetais.	19
Figura 3 Procedimentos do cultivo <i>in vitro</i> de segmentos apicais de <i>Libidibia ferrea</i>	28
Figura 4 Substratos utilizados na instalação do experimento de estaquia de <i>Libidibia ferrea</i>	29
Figura 5 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> contaminados por microrganismos após serem tratadas com solução desinfestante à base de hipoclorito de sódio.....	32
Figura 6 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> contaminados por microrganismos após serem tratadas com álcool 70%..	34
Figura 7 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> contaminados por microrganismos após serem tratadas com fungicida em diferentes concentrações.....	35
Figura 8 Explantes de <i>Libidibia ferrea</i> contaminados por microrganismos após serem tratadas com agentes químicos combinados.	37
Figura 9 Valores médios de porcentagem de sobrevivência e enraizamento das estacas de <i>Libidibia ferrea</i> nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico + vermiculita e vermiculita..	41
Figura 10 Estacas apicais de <i>Libidibia ferrea</i> aos 70 dias de propagação, ilustrando a sobrevivência, enraizamento e crescimento.....	42
Figura 11 Valores médios de porcentagem de número de brotações das estacas de <i>Libidibia ferrea</i> nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico + vermiculita e vermiculita..	44
Figura 12 Valores médios de porcentagem de comprimentos das estacas de <i>Libidibia ferrea</i> nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico + vermiculita e vermiculita..	45
Figura 13 Valores médios de porcentagem de comprimentos da maior raiz de <i>Libidibia ferrea</i> nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico+vermiculita e vermiculita..	46
Figura 14 Estacas apicais de <i>Libidibia ferrea</i> aos 90 dias de propagação, ilustrando o desenvolvimento radicular e parte aérea.....	47
Figura 15 Valores médios de porcentagem de números de folhas de <i>Libidibia ferrea</i> nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico+vermiculita e vermiculita..	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação taxonômica da espécie <i>Libidibia ferrea</i>	15
Tabela 2 Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos apicais de <i>Libidibia ferrea</i> em diferentes concentrações de NaClO.....	31
Tabela 3 Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos apicais de <i>Libidibia</i> de Álcool 70% em diferentes tempos.	33
Tabela 4 Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos apicais de <i>Libidibia ferrea</i> em diferentes concentrações e tempo de fungicida CabrioTop®.....	35
Tabela 5 Estabelecimento <i>in vitro</i> de segmentos apicais de <i>Libidibia ferrea</i> com 2% fungicida, hipoclorito de sódio e Álcool 70% em diferentes concentrações de tempo.	36
Tabela 6 Análise de variância para sobrevivência (SOB), porcentagem de enraizamento (ENR), número de brotações (NB), comprimento da estaca(CME), comprimento da maior raiz (CMR) e número de folhas (NF), em relação aos três tipos de substratos combinados com estacas de <i>Libidibia ferrea</i>	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Classificação botânica da espécie <i>Libidibia ferrea</i>	15
2.2	Aspectos gerais da espécie vegetal	15
2.3	Princípios químicos e atividade biológica <i>Libidibia ferrea</i>	17
2.4	Cultura de tecidos vegetais	18
2.5	Propagação vegetativa	19
2.6	Fatores que afetam a cultura de tecidos	21
2.7	Desinfestação e estabelecimento <i>in vitro</i> dos explantes	22
3	JUSTIFICATIVA	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo geral	25
4.2	Objetivos específicos	25
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	Experimento I	26
5.1.1	Local do estudo	26
5.1.2	Obtenção do material vegetal e condições de cultivo	26
5.1.3	Ensaio I	26
5.1.4	Ensaio II	26
5.1.5	Ensaio III	27
5.1.6	Ensaio IV	27
5.1.7	Análise estatística	27
5.2	Experimento II	28
5.2.1	Localização do experimento	28
5.2.2	Preparo dos substratos	28

5.2.3 Obtenção do material vegetal e condições do experimento.....	29
5.2.4 Análise estatística.....	30
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1 Experimento I.....	31
6.2 Experimento II.....	41
6.2.1 Sobrevivência e Enraizamento	41
6.2.2 Número de brotações	44
6.2.3 Comprimento da estaca	45
6.2.4 Comprimento da maior raiz.....	46
6.2.5 Número de folhas.....	47
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é um importante centro da diversidade com espécies com potencial para serem utilizadas com fins ornamentais, na perfumaria e farmacêutica, entretanto, uma infinidade de espécies permanece negligenciada e são sub-exploradas (CLEMENT et al., 2009). Neste contexto, encontra-se a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz (Leguminosae) conhecida popularmente como jucá pertencente à família Fabaceae nativa do Brasil, distribuída no Norte e Nordeste (LORENZI, 1992).

Estudos comprovam que o jucá possui propriedades terapêuticas como: analgésica, antimicrobiana, anti-inflamatória, imunoestimulante, cicatrizante e hipoglicemiante as quais indicam a presença de substâncias de interesse farmacológico (XIMENES, 2004).

Apesar do seu intenso uso, esta espécie apresenta uma dormência tegumentar aliado a predação por pássaros, insetos e roedores que limita a recomposição das populações naturais das matas e de plantios *ex situ*, fazendo da técnica de regeneração de plantas *in vitro*, uma alternativa, para produção de mudas da espécie (MAIA, 2004).

Benedito et al. (2012) relata que as técnicas de propagação sexuada e assexuada do jucá justificam-se devido à necessidade da obtenção de mudas para o cultivo comercial e o melhoramento genético. Como alternativa, destaca-se a Cultura de Tecidos Vegetais que utiliza qualquer célula do organismo vegetal que contém a informação genética para regeneração de uma planta completa (RIBEIRO; BASTOS, 2008).

A propagação de plantas através da cultura de tecidos vegetais possibilita a multiplicação de organismos vegetais que por muitas vezes possuem disponibilidade limitada. Além disso, essa tecnologia possibilita a obtenção de indivíduos selecionados como também de substâncias ativas. Contudo, o estabelecimento de uma cultura vegetal deve levar em consideração as características da espécie, e para isso um protocolo de assepsia específico deve ser empregado (ESPINOSA et al., 2018)

As plantas lenhosas apresentam grandes dificuldades para estabelecimento *in vitro* devido às contaminações dos tecidos por microrganismos, que podem ser minimizadas ou evitadas com a manutenção da matriz doadora de

explantes em casa de vegetação, com a aplicação prévia e a ação de fungicidas e bactericidas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Sobre a micropropagação de plantas Lima et al. (2007) comenta que é uma alternativa para a propagação comercial de espécies vegetais de interesse econômico e farmacológico. Embora esta técnica tenha como desvantagem o custo elevado, a crescente demanda por plantas indexadas, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários.

Em relação à regeneração de plantas *in vitro*, a micropropagação, que vem assumindo um papel importante na propagação em larga escala de espécies de interesse medicinal e biotecnológico. Especificamente, para espécies vegetais que apresentam um longo período de maturação, baixa viabilidade de sementes, e de difícil propagação através dos métodos convencionais.

Neste contexto, considerando a importância medicinal e as dificuldades de propagação desta espécie esse trabalho teve como objetivo verificar eficácia de diferentes métodos de desinfestação para segmentos nodais, e a influência do ácido indolbutírico para o estabelecimento *ex vitro* de segmentos apicais de *Libidibia ferrea*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação botânica da espécie *Libidibia ferrea*.

A espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea* tem como a sinonímia de *Caesalpinia ferrea* (Mart. ex Tul.) é conhecida popularmente como pau-ferro, jucá, pau ferro-verdadeiro e jucaína. Pertence à família Fabaceae, distribuída em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (DI STASI, 1996). A classificação taxonômica dessa espécie encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação taxonômica da espécie *Libidibia ferrea*.

Nome completo	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. <i>ferrea</i>
Sinonímia	<i>Caesalpinia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz
Reino	Planta
Filo	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
Subclasse	Rosidae
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Subfamília	Libidibiaceae (Caesalpinioideae, Leguminosae)
Espécie	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. <i>ferrea</i>

Fonte: QUEIROZ et al., 2009.

2.2 Aspectos gerais da espécie vegetal

Libidibia ferrea é nativa do Brasil onde apresenta pelo menos três variedades típicas: *L. leiostachya*, *L. parvifolia* e *L. ferrea*. As variedades *L. leiostachya* e *L. parvifolia* são comuns no centro oeste e sudeste brasileiro, ocorrendo naturalmente na Mata Atlântica e no Cerrado, onde são reconhecidas popularmente por pau-ferro, havendo diferenças entre as variedades no que se refere ao crescimento da espécie (QUEIROZ, 2009).

Em relação a variedade *L. leiostachya* Nogueira (1977) afirma que esse grupo apresenta árvores que podem atingir o dossel superior da floresta, com 20-30 m de altura, e diâmetro do tronco de até 1 m, retilíneo, cilíndrico, alto e robusto, com casca lisa e com grandes manchas brancas sobre fundo escuro, de belo efeito decorativo.

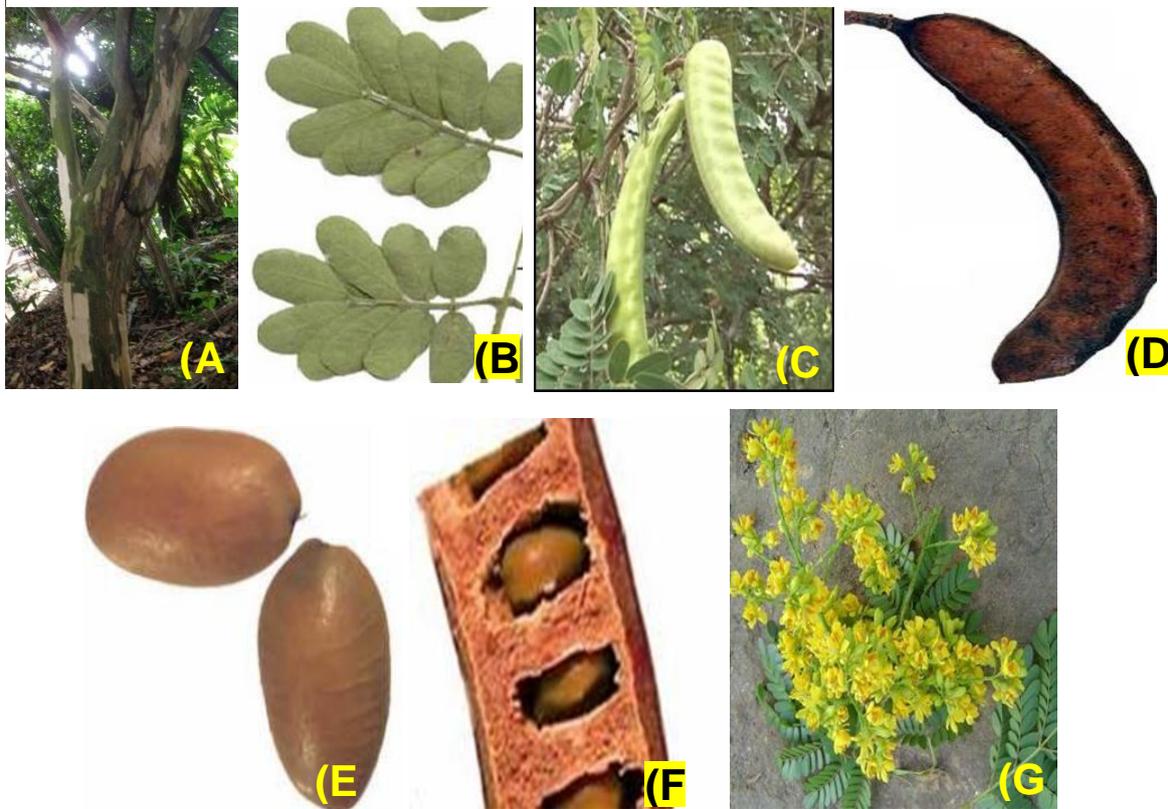
Esta variedade foi introduzida na Amazônia por imigrantes nordestinos, possivelmente nos dois principais ciclos de migração caracterizados como a “época da borracha”, e hoje em estados como o Acre é uma planta presente nos quintais, sendo aproveitada como árvore de sombra e para produção de frutos com fins medicinais (PRANCE e SILVA, 1975).

Esta espécie vegetal, pode alcançar 10-15 m de altura, com um diâmetro do tronco de 40 a 60 cm. Suas folhas de árvore adulta podem medir cerca de 7-20 cm de comprimento e são cobertas com pelos amarelados e curtos. Suas flores são pequenas e amarelas com características aglomeradas. Sua floração ocorre entre abril e maio e a frutificação entre maio e agosto (GALDINO et. al.,2007).

Os frutos são denominados de vagens, cujas dimensões médias são de 8,3 x 1,8 x 0,8 cm e tem a cor verde quando imaturo, tornando-se marrom quando maduros (Figura 1). Eles são indeiscentes, com um lado oblongo, ligeiramente achatado e sinuoso com sutura ventral saliente, base arredondada a curvada e ápice arredondado (GALDINO et al., 2007).

As sementes são de forma discóide ou ovoide, com uma base achatada e ápice arredondado e o tamanho médio das sementes é 0,9 x 0,5 x 0,5 cm e suas cores variam de verde claro a amarelado. As sementes são opacas, firmes em consistência, e são separados em cavidades individuais distintamente visíveis e apresentam disposição unisseriada e transversal. As flores são amarelas, pequenas e em cachos (LORENZI e MATOS, 2002).

Figura 1 - Aspectos gerais da espécie *Libidibia ferrea*. (A) árvore de *L. ferrea*; (B) folhas; (C) fruto imaturo; (D) fruto maduro; (E) detalhe da semente; (F) detalhe das sementes dentro da vagem e (G) flores de *L. ferrea*.



Fonte: COSTA, 2012.

A floração do jucá ocorre na estação seca até início da estação chuvosa, e a frutificação ocorre no final da estação seca e se prolonga pela estação chuvosa. Tem anualmente uma alta produção de frutos. As sementes apresentam germinação numa amplitude térmica de 15 a 40°C, e podem ser armazenadas por pelo menos oito meses (GALDINO et al., 2007).

O jucá é cultivado em diferentes partes do mundo para o uso de reflorestamentos de cidades, parques e ruas. Além disso, essa espécie pode ser utilizada para o paisagismo, proporcionando boa sombra em ruas e avenidas. Também é indicada para recomposição de Áreas de Preservação Permanente (APP) que foram degradadas (LORENZI, 1992). Além disso é empregada na indústria madeireira, na forma de vigas, esteios, caibros, escadas (MAIA, 2004).

2.3 Princípios químicos e atividade biológica *Libidibia ferrea*

Estudos químicos com *Libidibia ferrea* têm demonstrado que a presença de compostos fenólicos com possíveis aplicações farmacológicas, como chalconas e

polifenóis (NAKAMURA et al., 2002). Desse modo, a espécie é uma das 71 plantas da lista de plantas medicinais de interesse para o Sistema de Saúde Brasileiro (RENISUS) e foi incluída no Formulário Nacional de Ervas Medicinais (BRASIL, 2011).

Em relação as substâncias isoladas da *L. ferrea* Nozaki et al. (2007) está o composto denominado Pau ferrol A, que foi isolado a partir do caule de jucá. Este novo trímico chalcona mostrou potencial atividade inibidora contra a topoisomerase II humana induzindo apoptose em células leucêmicas, assim, comprovando as propriedades terapêuticas da planta.

Além disso, é bastante utilizada na medicina popular e são atribuídas à sua casca propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, a entrecasca é utilizada para o tratamento de feridas, contusões, asma e tosse crônica. Os seus frutos são utilizados como antidiarréicos, anticatarrais e cicatrizantes, enquanto suas raízes são antitérmicas (MAIA, 2004).

2.4 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos de planta compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial (PASQUAL, 1997). A técnica está baseada na totipotencialidade da célula vegetal, ou seja, na sua capacidade de originar uma nova planta (PINTO e LAMEIRA, 2001).

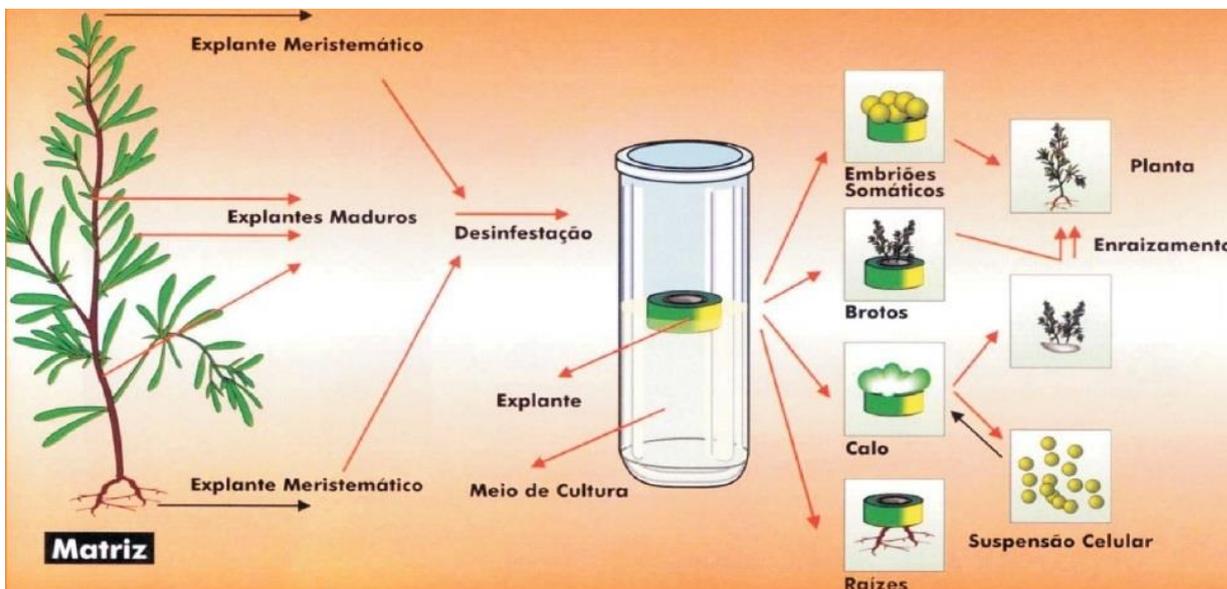
De acordo com Pasqual et al. (1997), o sucesso da cultura de células, órgãos ou tecidos *in vitro* depende, em geral, da seleção do explante, das condições de temperatura e luminosidade em que a cultura é mantida e do uso de meio de cultura apropriado para o estabelecimento da espécie vegetal.

Sobre a variabilidade na resposta morfogênica *in vitro* Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que existe diferença não apenas entre espécies mas dentro de cada genótipo, levando à elaboração de protocolos específicos. O meio de cultura e sua concentração são essenciais no cultivo *in vitro*, pois a quantidade de nutrientes e reguladores de crescimento afetam o desenvolvimento dos explantes (NAVES, 2001).

Além disso, a cultura de tecidos vegetais possibilita fornecer mudas de qualidade genética e quantidade para suprir a necessidade do mercado em curto

espaço de tempo (BHOJWANI e DANTU, 2013). Desse modo, as principais técnicas de cultura de tecidos vegetais, são: a micropropagação, a embriogênese somática, a calogênese, a cultura de embriões e a suspensão celular visando à produção de metabólitos secundários (MORAIS et al., 2012), como mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Princípio geral da cultura de células e tecidos vegetais.



Fonte: KERBAUY (1997).

2.5 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa ou assexuada tem como finalidade principal reproduzir plantas descendentes do genótipo de uma única planta fonte que possua características desejáveis. O processo biológico é descrito como clonagem e o indivíduo resultante desta planta é chamado de clone (HARTMANN et al., 2011).

Sendo assim esta técnica caracteriza-se em produzir partes das plantas sejam elas estacas da parte aérea ou radicular, gemas ou outras estruturas especializadas, ou ainda de meristemas, ápices caulinares, calos e embriões. Contudo, um vegetal é regenerado a partir de células somáticas sem alterar o genótipo, devido à multiplicação mitótica (CANHOTO, 2010).

Em relação as vantagens da propagação vegetativa Fachinello et al. (2005) destaca: a preservação das características genéticas da planta matriz; especialmente na multiplicação de espécies que não produzem sementes; a manutenção do valor agrônômico e/ou características desejáveis de uma cultivar; a redução da fase juvenil; a formação de áreas uniformes de produção; a combinação de material vegetal quando se utiliza enxertia.

Entretanto, as principais desvantagens provocadas por essa técnica são: possibilita a transmissão de doenças especificamente causadas por vírus e microrganismos; ausência de variabilidade genética; mutação das gemas, gerando clones diferenciados e de menor qualidade que a planta-matriz (FACHINELLO et al., 2005).

Sobre os efeitos positivos da propagação vegetativa Wendling (2003) enfatiza que esse método de propagação permite a formação de um clone ou grupo de plantas provenientes de uma matriz em comum, ou seja, com carga genética uniforme e com idênticas necessidades climáticas, edáficas, nutricionais e de manejo.

Dentre as técnicas existentes destaca-se a estaquia que é um método de propagação que consiste na retirada de segmentos da planta-mãe que, sob condições adequadas, emitem raízes, formando nova planta idêntica àquela que lhe deu origem (HARTMANN et al., 2011).

A estaquia é uma técnica amplamente utilizada, pois permite em um espaço de tempo aumentar a produção de mudas, possibilitando também que apenas uma única planta-matriz possa gerar vários indivíduos idênticos (clones), possuindo baixo custo e fácil execução, além de produzir uniformidade nos plantios e viabilizar uma seleção mais eficiente em relação à reprodução sexuada (FACHINELLO et al., 2005).

Uma das estratégias para auxiliar no processo de propagação vegetativa é a utilização de reguladores de crescimento, como o ácido indolbutírico (AIB) que estimula a divisão celular e o processo de indução do enraizamento (HARTMANN et al., 2011). A relação que ocorre entre auxinas e citocininas é o que favorece a formação de raízes e brotações em plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009).

As mudas originadas a partir das plantas matrizes são caracterizadas por manter a mesma constituição genética do clone durante as próximas gerações (FERNANDES et al., 2004). Segundo Lopes et al. (1997), esse processo acontece pelo fato de não ocorrer a fusão de gametas e, conseqüentemente, não ocorre a recombinação genética, permitindo a reprodução fiel da planta-mãe

A formação de raízes adventícias se inicia após o corte na base da estaca através de uma reação histológica de cicatrização das células exteriores, formando uma placa necrosada, sendo selada com um material de cortiça (suberina). Esta

placa evita a dessecação e a entrada de microrganismos na estaca (HARTMANN et al., 2011).

Sendo assim as células vivas que estão por de trás desta placa começam a se dividir, e uma camada de células do parênquima forma uma massa irregular chamada de “calo” (HARTMANN et al., 2011). Contudo, este tecido é pouco diferenciado, sendo originado do câmbio vascular, do córtex ou da medula, cuja formação representa o início do processo de regeneração (FACHINELLO et al., 2005).

2.6 Fatores que afetam a cultura de tecidos

As técnicas de micropropagação permite a produção de indivíduos com características genéticas desejáveis, alto padrão de sanidade das mudas, em ambiente asséptico e controlado (PAIVA; GOMES, 2005). Configura-se como técnica na silvicultura moderna, pois auxilia a regeneração de plantas com um pequeno número de explante, essas com genótipo idêntico à planta matriz (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Uma das particularidades da micropropagação é o controle das diferentes fases do crescimento dos explantes *in vitro*. Isso não ocorreria sem a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, compostos orgânicos dos quais em baixas concentrações, promovem, inibem ou modificam o crescimento do vegetal quando cultivados *in vitro* (HARTMANN et al., 2011).

Sobre o sucesso de um protocolo de micropropagação Quisen et al. (2008) depende de vários fatores durante as etapas como: estado fisiológico da planta matriz, coleta de explantes, esterilização dos meios de cultura, condições de incubação, manipulação de subculturas e uso de reguladores de crescimento, e o meio de cultura.

Dentro da cultura de tecidos, explante é qualquer tecido oriundo de uma planta capaz de iniciar uma cultura *in vitro*, podendo ser ele, um ápice caulinar ou radicular, uma gema axilar, um segmento nodal, um fragmento foliar, uma antera, um ovário ou embrião, e outros (CID, 2002).

Sendo assim, qualquer parte do tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Porém, na seleção deste, deve-se levar em consideração, àquele que

possui maior proporção de tecido meristemático, ou que tenha maior capacidade de expressar a totipotência celular (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

2.7 Desinfestação e estabelecimento *in vitro* dos explantes

Uma das principais dificuldades dentro da cultura de tecidos é a descontaminação dos explantes. Desse modo, tratamentos assépticos aplicados nas plantas matrizes são determinantes para seu sucesso, principalmente, quando se trabalha com espécies possuidoras de microrganismos endógenos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Assim, os tecidos de plantas excessivamente contaminados devem ser lavados em solução fraca de detergente e enxaguadas várias vezes em água destilada antes da esterilização. Os agentes desinfetadores mais utilizados em tratamentos de assepsia é o hipoclorito de sódio (NaOCl) em concentrações a partir de 0,25%, álcool 70%, fungicidas e bactericidas (LEBOWITZ, 1995).

Sobre a desinfestação dos explante Grattapaglia e Machado (1998) abordam que muitas substancias são empregadas, dentre elas, o etanol e o cloro em geral é usado na forma de hipoclorito de sódio. Geralmente, nos tratamentos de assepsia as concentrações variam de 0,5 a 2,0% e dura cerca de 40 minutos.

O meio de cultura é um meio nutritivo que deve suprir tecidos vegetais cultivados *in vitro*, com nutrientes para o desenvolvimento dos explantes utilizados. Assim, sua composição deve fornecer macro e micronutrientes, uma fonte de carboidrato que geralmente é a sacarose, e, certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, que proporcionam um crescimento maior para as plântulas cultivadas *in vitro* (PASQUAL et al.,1997).

As principais dificuldades no estabelecimento *in vitro*, é a oxidação caracterizada pelo escurecimento dos explantes relacionado a liberação de compostos fenólicos um dos mais frequentes no cultivo *in vitro* (CARVALHO; VIDAL, 2003). Estes compostos podem ser liberados por zonas do explante que sofreram cortes, o que dificulta a adaptação e o crescimento da planta.

Tal problema se agrava quando se trabalha com espécies lenhosas, que são ricas nesses compostos, muito pela produção de lignina (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para controle da oxidação é comum a adição de compostos

antioxidantes ao meio de cultivo, como o carvão ativado, a polivinilpirrolidona (PVP) e o ácido ascórbico (GALDIANO JUNIOR et al, 2012).

O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é largamente empregado, com algumas alterações, obtendo resultados satisfatórios para várias espécies. Altas concentrações de sais no meio MS podem inibir o desenvolvimento da planta *in vitro*, mesmo na presença de auxinas. Contudo, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados na germinação, enraizamento e multiplicação de espécies frutíferas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3 JUSTIFICATIVA

O jucá possui importância econômica para indústria farmacêutica devido a ação do princípio ativo “Pau-ferrol” com atividade inibidora contra células cancerígenas, tendo sido incluída na lista de Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) constituída por plantas com aplicações na saúde pública no Brasil. Entretanto, essa espécie apresenta baixa e irregular produção de sementes, além de dormência tegumentar, o que dificulta sua propagação.

Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de novos métodos de propagação vegetativa que viabilizem a produção de mudas *Libididia ferrea* com a qualidade genética indispensável para a produção de fitoterápicos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar eficácia de diferentes métodos de desinfestação para segmentos nodais, e a influência do ácido indolbutírico para o estabelecimento *ex vitro* de segmentos apicais de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO), de álcool 70%, e de CabrioTop®, na desinfestação dos explantes de segmentos nodais *L. ferrea*.
- Verificar a influência de diferentes concentrações de ácido indolbutírico, e diferentes substratos na propagação de mudas de *L. ferrea* em condições *ex vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimento I

5.1.1. Local do estudo

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LASTED-INPA). Como material vegetal foram utilizados explantes de segmentos nodais de *L. ferrea* provenientes de árvores nativas do Campus III, INPA, Manaus, Brasil. A espécie em questão foi identificada pelo Prof. Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza e a exsiccata encontra-se registrada no herbário do INPA, sob o número 228.022.

5.1.1 Obtenção do material vegetal e condições de cultivo

Os segmentos nodais de *L. ferrea* foram obtidos de plantas matrizes do INPA, campus III. Os explantes foram lavados com detergente e enxaguados com água corrente por 1 minuto. Em câmara de fluxo com um bisturi de 3 cm foram cortados em segmentos de 2 cm (Figura 3). Após essa etapa foram submetidos a tratamentos (ensaios) para desinfestação com agentes químicos.

5.1.2 Ensaio I

Para este experimento foram utilizados 27 segmentos nodais retirados de árvores adultas de *L. ferrea* do INPA *Campus* III, e foram submetidos ao processo de assepsia com NaClO nas concentrações 0,10% 0,50% e 1% por 10, 20 e 30 minutos respectivamente em agitador magnético. Em seguida foram lavadas três vezes com água destilada.

5.1.4 Ensaio II

No experimento II foram utilizados 09 segmentos nodais retirados de árvores adultas de *L. ferrea* do INPA *Campus* III, e foram submetidos ao processo de assepsia com álcool 70% por 01, 05 e 10 minutos respectivamente em agitador magnético. Em seguida foram lavadas três vezes com água destilada.

5.1.3 Ensaio III

No experimento III foram utilizados 36 segmentos nodais retirados de árvores adultas de *L. ferrea* do INPA *Campus* III e foram submetidos ao processo de assepsia com o fungicida sistêmico (CabrioTop®) 25%, 50%, 75% e 100% por 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Em seguida foram lavadas três vezes com água destilada.

5.1.4 Ensaio IV

No experimento IV foram utilizados 30 segmentos nodais retirados de árvores adultas de *L. ferrea* do INPA *Campus* III, e foram submetidos ao processo de assepsia como fungicida sistêmico (CabrioTop®) 2%, álcool 70% e hipoclorito de sódio por 24, 48 e 72 horas respectivamente. Em seguida foram lavadas três vezes com água destilada.

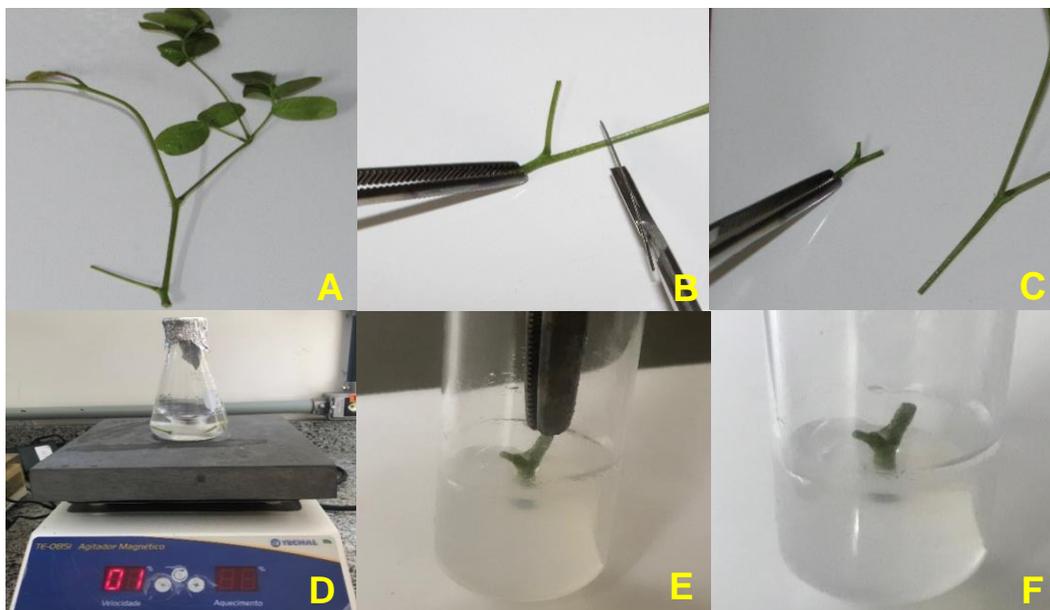
Em seguida, os explantes de *L. ferrea* foram inoculados em câmara de fluxo, individualmente, em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS. A incubação foi mantida com temperatura de 25 ± 2 °C em condição luminosa de $31 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas com acompanhamento diário.

Após 30 dias de crescimento, os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de sobrevivência, enraizamento, número de brotações e comprimento da maior brotação. Para os explantes contaminados foi verificado, as seguintes variáveis: vivo, morto, tipo de contaminação e oxidação.

5.1.5 Análise estatística

Todos os ensaios realizados no experimento I foram submetidos a análise descritiva através do programa Minitab.

Figura 3 - Procedimentos do cultivo *in vitro* de segmentos apicais de *Libidibia ferrea*. A – Segmentos nodais obtidos de árvores adultas provenientes do campo. B – Excisão dos explantes; C – Explante retirado dos segmentos nodais; D – Assepsia dos explantes em agitador magnético; E – inoculação do explante em meio de cultura MS; F – tubo de ensaio pronto para ser mantido em sala de crescimento.



Fonte: Monteiro, 2019.

5.2 Experimento II

5.2.1 Localização do experimento

O presente estudo foi conduzido no viveiro do Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais LASTED-INPA. Foram utilizadas mini estacas provenientes de plântulas germinadas de *Libidibia ferrea*.

5.2.2 Preparo dos substratos

Os substratos utilizados no experimento de propagação foram solo orgânico coletado no campo experimental do INPA-V8, e vermiculita adquirida no comércio local.

Foram estabelecidos três tratamentos (T):

T1 - Cinco (5) segmentos apicais de *L. ferrea* inoculados em solo orgânico;

T2 - Cinco (5) segmentos apicais de *L. ferrea* inoculados em vermiculita;

T3 - Cinco (5) segmentos apicais de *L. ferrea* inoculados em substrato composto por mistura de solo orgânico e vermiculita, na proporção de 1:1.

Cada substrato foi colocado em saco de polietileno de 3L, autoclavado por 60 minutos e acondicionados em bandejas de polietileno para o plantio das estacas (Figura 4).

Figura 4 – Substratos utilizados na instalação do experimento de estaquia de *Libidibia ferrea*. A – Vermiculita; B – Solo orgânico + vermiculita; C – Solo orgânico.



Fonte: Monteiro, 2019.

5.2.3 Obtenção do material vegetal e condições do experimento

O material vegetal utilizado nesse experimento foi obtido de plântulas de *Libidibia ferrea*. Essas plântulas foram provenientes de experimento de germinação de sementes de árvores nativas do Campus III/INPA e submetidas aplicações semanais de fungicida sistêmico antes da instalação do experimento.

As estacas usadas nesse trabalho foram do tipo apicais e foram retiradas através de cortes retos nas plântulas com tamanho de 10 a 12 cm, com a presença de duas folhas inteiras.

Em seguida ocorreu a desinfestação das estacas com solução de hipoclorito de sódio à concentração de 0,5% por 15 minutos e após este processo, foram lavadas com água corrente. Logo após foi realizada a secagem em jornal para retirada do excesso de umidade. As estacas foram submetidas a aplicações de Ácido indolbutírico na forma líquida nas concentrações 0, 1000 e 3000 (mg L^{-1}) por 10 minutos em imersão.

As estacas foram transferidas para bandejas de polietileno expandido de 15 células. A irrigação dos experimentos foi realizada manualmente através de regador diariamente. Durante a realização do experimento foi realizado a limpeza e

controle manual de plantas invasoras no substrato e não foi realizada fertilização do solo.

Após 90 dias foram avaliadas as seguintes características nas estacas: sobrevivência - considerou-se todas estacas que se mantiveram vivas com a emissão ou não de raízes (%); enraizamento – considerou-se estacas enraizadas apenas aquelas que emitirão ao menos uma raiz (%); número de brotações; comprimento da maior brotação (cm); número de folhas; comprimento da maior raiz (cm).

5.2.4 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e foram utilizadas três repetições compostas de 05 explantes por tratamento cada (N = 15). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste "Tukey" com o nível de 5% de significância, utilizando o software MINITAB® versão 18.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimento I

No ensaio I, foram realizados três tratamentos de assepsia testando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para a desinfestação dos segmentos nodais de *Libidibia ferrea*. Esses resultados mostraram que nenhum tratamento foi eficiente para eliminação dos microrganismos, visto que houve 100% de contaminação, nas diferentes proporções testadas, oito dias após a inoculação dos explantes (Tabela 2).

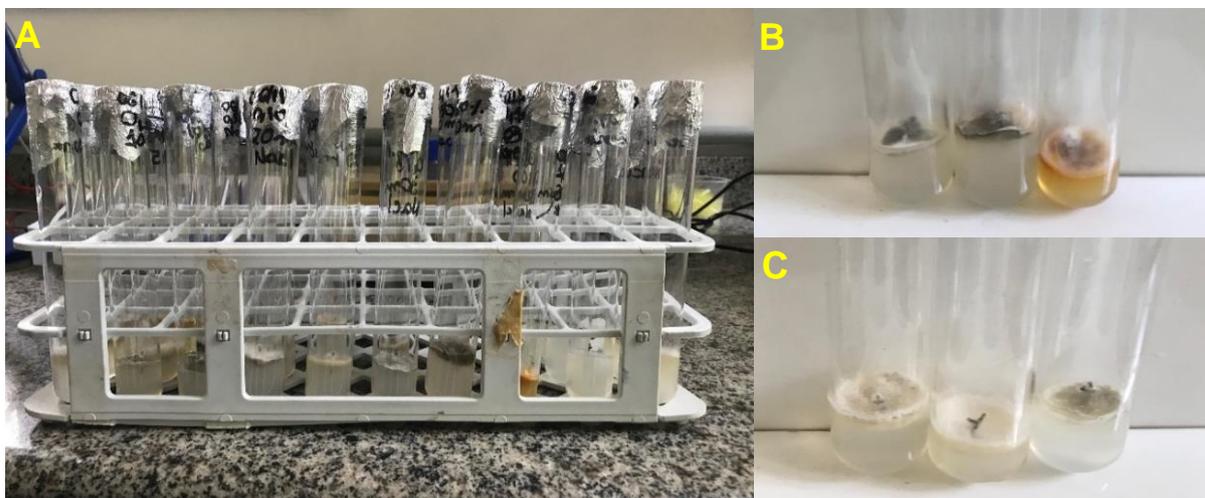
Tabela 2 Estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais de *Libidibia ferrea* em diferentes concentrações de NaClO.

Tratamentos	Tempo minutos	Explantes mortos(%)	Explantes vivos(%)	Contaminação fúngica(%)	Contaminação bacteriana(%)	Oxidação(%)
0,10% NaClO	10	100	0	100	0	0
0,10% NaClO	20	100	0	100	0	0
0,10% NaClO	30	100	0	100	0	0
0,50 % NaClO	10	100	0	100	33	0
0,50 % NaClO	20	100	0	100	33	0
0,50 % NaClO	30	100	0	100	33	0
1 % NaClO	10	100	0	100	66	0
1 % NaClO	20	100	0	100	100	0
1 % NaClO	30	100	0	100	33	0

Fonte: Monteiro, 2019.

Ao observar a Figura 5 podemos visualizar a contaminação fúngica e bacteriana nos explantes submetidos ao processo de assepsia com hipoclorito de sódio. Após cinco dias de inoculação dos explantes houve o surgimento de fungos e bactérias em todas as concentrações e tempos de exposição testados.

Figura 5 Explantes de *Libidibia ferrea* inoculadas em meio MS, contaminados por microrganismos após serem tratadas com solução desinfestante à base de hipoclorito de sódio. A – Tubos de ensaio com explantes submetidos a tratamentos com hipoclorito de sódio; B – Contaminação bacteriana; C – Contaminação fúngica.



Fonte: Monteiro, 2019.

O agente químico hipoclorito de sódio é utilizado para esterilização de superfícies, frutas, hortaliças, água, entre outros. No entanto para esta espécie não apresentou efeito significativo na desinfestação de segmentos nodais. No estudo realizado por Emmanuel et al. (2004) relatam que a utilização em larga escala é devido ao seu vasto espectro de atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus.

No trabalho realizado por Dutra et al. (2008) para a introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Ilex paraguariensis*, foi testado hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes, mas o seu uso isolado não foi satisfatório para o estabelecimento a longo prazo devido à contaminação, principalmente por bactérias.

A maior eficiência do hipoclorito no controle da contaminação bacteriana em comparação à fúngica pode ser explicada pelo fato do cloro, principal componente do hipoclorito, quando liberado em meio aquoso atuar na inibição enzimática via desnaturação proteica e inativação de ácidos nucleicos (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

Resultados distintos com hipoclorito de sódio foram encontrado no trabalho de Freitas (2014) no processo de desinfestação de *Annona squamosa* (L.) no tempo de 10 minutos de exposição apresentaram índices de contaminação fúngica de 85%. Com o aumento do tempo de exposição dos explantes para 20 minutos houve uma redução da contaminação fúngica para 12,5%.

Por outro lado, nos experimentos realizados por Ribas et al. (2005) com a espécie *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa) observaram que o tratamento de desinfestação com a solução NaOCl a 0,25%, durante 10 minutos, foi satisfatório para a desinfestação de brotações apicais, tendo em vista que houve cerca de 70% de sobrevivência.

Além disso, o hipoclorito de sódio é um dos mais eficientes para assepsia e cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Vengadesan et al. (2003) no estudo com segmentos nodais de *Acacia sinuata* com 4 cm de comprimento conseguiram estabelecer *in vitro* ao desinfestarem em solução contendo 5,25% de hipoclorito de sódio durante 10 minutos.

No ensaio II, foi avaliado a eficiência do agente químico álcool na concentração 70% na desinfestação dos explantes de *Libidibia ferrea*. Contudo, sete dias após a inoculação houve o aparecimento de fungos e bactérias nos diferentes tempos testados como observamos na Tabela 3.

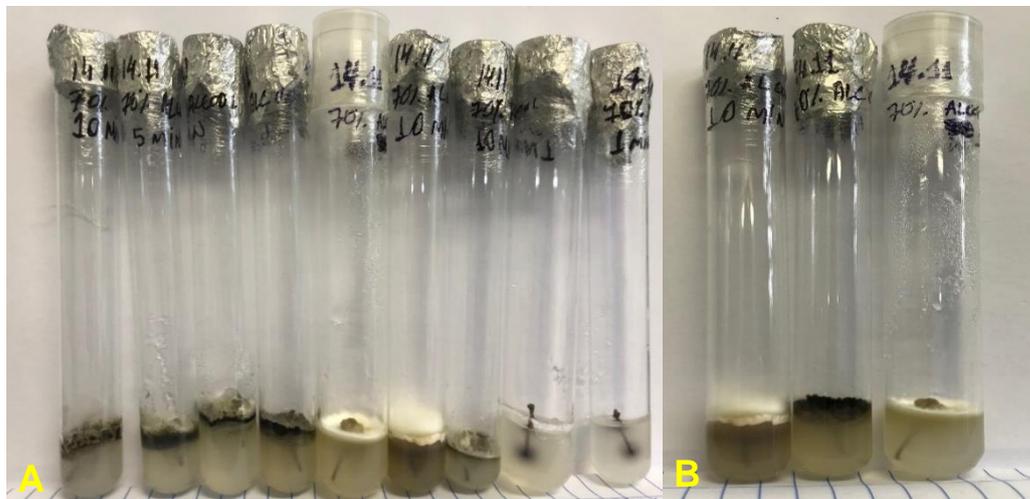
Tabela 3 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais de *Libidibia* de Álcool 70% em diferentes tempos.

Tratamentos	Tempo minutos	Explantes mortos(%)	Explantes vivos(%)	Contaminação fúngica(%)	Contaminação bacteriana(%)	Oxidação(%)
Álcool 70%	1	100	0	100	0	0
Álcool 70%	5	100	0	100	100	0
Álcool 70%	10	100	0	100	66	100

Fonte: Monteiro, 2019.

Três dias após a inoculação dos explantes de *Libidibia ferrea* no desinfestante químico álcool 70 % foi observado o surgimento dos microrganismos em todas as concentrações e tempo de exposição (Figura 6). Após sete dias da instalação do experimento todos os explantes estavam contaminados e oxidados.

Figura 6 - Explantes de *Libidibia ferrea* inoculadas em meio MS, contaminados por microrganismos após serem tratadas com álcool 70%. A – Tubos de ensaio com explantes submetidos ao tratamento; B – Contaminação microbiana.



Fonte: Monteiro, 2019.

O álcool é um dos produtos mais utilizados na desinfestação contra microrganismos, pois desnatura proteína e incrementa a permeabilidade da membrana. Sobre a atividade antimicrobiana dos álcoois, Pelczar et al. (1996) comenta que se deve à sua capacidade de desnaturar proteínas. Além disso, parte de sua eficiência como desinfetante, pois está relacionada à ação detergente na remoção mecânica de microrganismos.

Outra característica constatada é em relação ao tempo de exposição do material vegetal ao agente químico, ou seja, as concentrações de álcool 70% causaram a oxidação dos explantes. Nesse caso, a oxidação acontece em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da lignina, por injúrias nos tecidos ou senescência das espécies nativas, principalmente nas tropicais, que apresentam altas concentrações desses compostos (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Ao analisar o uso do fungicida CabrioTop® em diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100%) e nos diferentes tempos de exposição (24, 48 e 72 horas) constatou-se a presença de contaminação microbiana após dez dias da inoculação do material vegetal no meio de cultura (Tabela 4 e Figura 7).

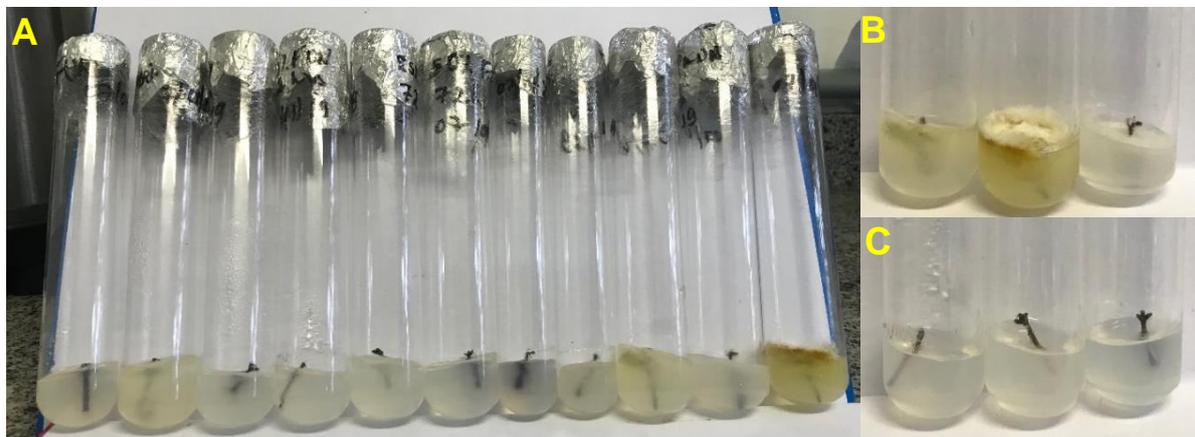
Tabela 4 Estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais de *Libidibia ferrea* em diferentes concentrações e tempo de fungicida CabrioTop®.

Tratamentos	Tempo horas	Explantos mortos(%)	Explantos vivos(%)	Contaminação fúngica(%)	Oxidação(%)
Fungicida 25%	24	100	0	100	0
Fungicida 50%	24	100	0	100	0
Fungicida 75%	24	100	0	100	0
Fungicida 100%	24	100	0	100	0
Fungicida 25%	48	100	0	100	33
Fungicida 50%	48	100	0	100	66
Fungicida 75%	48	100	0	100	66
Fungicida 100%	48	100	0	100	100
Fungicida 25%	72	100	0	100	100
Fungicida 50%	72	100	0	100	100
Fungicida 75%	72	100	0	100	100
Fungicida 100%	72	100	0	100	100

Fonte: Monteiro, 2019.

O aumento das concentrações de fungicida e do tempo na exposição do explante à solução não foi eficiente, pois além da contaminação microbiana houve o aumento da oxidação associada ao aparecimento de fungos e bactérias. Destaca-se que fungicidas sistêmicos são comumente usados no controle asséptico de explantes vegetais dentro da cultura de tecidos. (GOULART; FIALHO, 1999).

Figura 7 - Explantes de *Libidibia ferrea* inoculadas em meio MS, contaminados por microrganismos após serem tratadas com fungicida em diferentes concentrações. A – Tubos de ensaio com explantes submetidos ao tratamento; B – Contaminação microbiana; C – Oxidação.



Fonte: Monteiro, 2019.

A utilização de detergente pode ser indicada para aumentar a superfície de contato entre o fungicida e explante. Todavia, deve-se avaliar com cuidado o emprego de fungicida em concentrações maiores que as recomendadas pelo fabricante para evitar problemas de toxicidade e maximizar sua eficiência (LONDE et al., 2007).

No ensaio IV observa-se que os tratamentos combinados com fungicida, hipoclorito de sódio e álcool 70% não foram eficazes para desinfestação de segmentos nodais *Libidibia ferrea* provenientes de campo causando contaminação total quinze dias após a inoculação (Tabela 5).

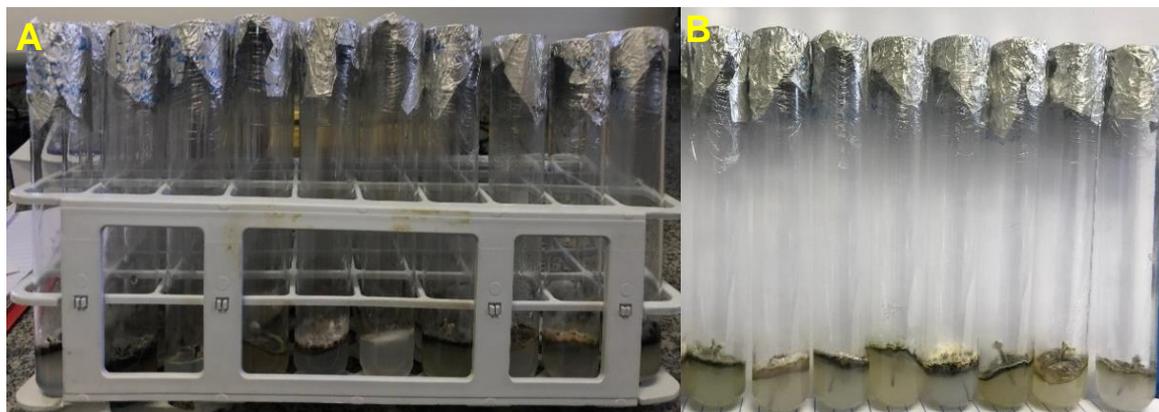
Tabela 5 - Estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais de *Libidibia ferrea* com FHA (2% fungicida, hipoclorito de sódio e Álcool 70%) em diferentes concentrações de tempo.

Tratamentos	Tempo horas	Explantos mortos(%)	Explantos vivos(%)	Contaminação fúngica(%)	Contaminação bacteriana(%)	Oxidação(%)
FHA	24	100	0	100	0	0
FHA	48	100	0	100	0	50
FHA	72	100	0	100	0	100

Fonte: Monteiro, 2019.

Verificou-se, pela análise dos dados que não houve interação significativa entre os fatores testados ocorrendo contaminação em todos os tratamentos sem a sobrevivência de explantes (Figura 8). Resultados similares sobre contaminação fúngica e bacteriana foram observados no trabalho realizado por Naue et al. (2007) com álcool 70% e hipoclorito de sódio para a desinfestação de explantes de *Nicotiana tabacum* verificaram que não foram eficientes para controlar microrganismos contaminantes.

Figura 8 - Explantes de *Libidibia ferrea* inoculadas em meio MS, contaminadas por microrganismos após serem tratadas com agentes químicos combinados. A – Tubos de ensaio com explantes submetidos ao tratamento; B – Contaminação microbiana.



Fonte: Monteiro, 2019.

Nos estudos feitos por Salles et al. (2017) para a desinfestação de segmentos nodais *Acacia mearnsii* foi utilizado um tratamento combinado composto por álcool etílico 70%, cloreto de mercúrio a 0,4% e hipoclorito de sódio a 2%. Esse tratamento foi eficiente para remoção de microrganismos pois houve a sobrevivência de 80% dos explantes de 10 mm.

Em relação à oxidação, verificou-se um alto número de explantes mortos em relação ao tempo de exposição do material vegetal ao tratamento com os agentes desinfestantes combinados. Uma das possíveis explicações para os altos índices de oxidação é origem do material vegetal (árvores adultas) e a ausência de reguladores de crescimento nas metodologias testadas.

Sobre os reguladores de crescimento Bassan et al. (2006) afirma que a ocorrência de compostos fenólicos pode estar ligada a processos de regulação de crescimento, os quais, dependendo da concentração endógena no tecido, induzem à síntese dos compostos polifenólicos.

No estudo desenvolvido por Erig e Schuch (2003) observaram altos valores de explantes oxidados este no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Malus domestica* B., visto que os tecidos recém excisados de espécies lenhosas tendem a secretar elevadas proporções de substâncias fenólicas e taninos no meio de cultura, em resposta ao ferimento sofrido. A liberação desses compostos causa alteração na composição do meio de cultivo e a absorção de metabolitos, gerando a oxidação dos explantes durante o cultivo *in vitro* (ANDRADE et al., 2000).

Sobre o controle da oxidação George e Sherrington (1984) comenta que é um ponto importante da micropropagação das espécies vegetais de interesse que a oxidação é resultado da liberação de compostos fenólicos no meio de cultura que precursores da produção de lignina são altos quando o explante apresenta tecido injuriado ou estressado.

Não houve a sobrevivência ou enraizamento dos explantes de *L. ferrea* nos diferentes ensaios montados devido a contaminação microbiana e a oxidação. A alta porcentagem de explantes oxidados pode estar relacionada com a alta concentração intrínseca de compostos fenólicos nos tecidos vegetais.

Sobre o alto índice de contaminação e explantes mortos de *L. ferrea* observado nesse trabalho Kozai e Kubota (2005) afirmam que espécies arbóreas respondem com baixas taxas de sobrevivência e enraizamento a tratamentos in vitro. Sendo assim, espécies vegetais, especialmente as lenhosas enraízam com dificuldade mesmo na presença de hormônios de crescimento.

Em geral, o uso de explantes de plantas provenientes do campo, resulta em uma maior contaminação e um baixo percentual de sobrevivência. Fato este observado neste estudo, onde os explantes de segmentos nodais de *L. ferrea* foram submetidos a diferentes metodologias de assepsia. Os resultados destes trabalhos, provavelmente, se devem as condições fitossanitárias das plantas-matrizes e a falta de manutenção previa com pulverização de inseticidas.

Sendo assim, na cultura de tecidos vegetais as contaminações microbianas geralmente são causadas: microrganismos resistentes aos agentes químicos utilizados no processo de desinfestação, erros do manipulador, baixa capacidade da técnica de assepsia e a presença de microrganismos endolíticos (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

Sobre esses organismos Azevedo (1998) cita que os principais são fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando partes aéreas ou radiculares sem ocasionar dano aparente a seus hospedeiros, assim, se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos que causam doenças às plantas.

Em relação a interação entre planta e o microrganismo endofítico é intensa e resistente, o estabelecimento de micropropagação sem a contaminação é muito baixo. Sendo assim torna-se necessária realizar pesquisas sobre o risco e

benefício para escolher ou não o desenvolvimento *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO 1998).

Os problemas mais encontrados no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas Schuch e Erig (2005) mencionam a contaminação e oxidação. Em acréscimo, outro fator agravante está na origem do material utilizado como matriz para o cultivo *in vitro*. Sobre a contaminação de espécies arbóreas Couto et al. (2004) relata a dificuldade para o estabelecimento *in vitro* devido à grande diversidade de microrganismo contaminantes resistentes a assepsia química.

O uso de segmentos nodais de plantas provenientes do campo, geralmente, resulta em um maior índice de contaminação e um baixo percentual de sobrevivência. Os fungos e bactérias, normalmente, competem com as plantas pelos nutrientes e vitaminas do meio de cultura, afetando o desenvolvimento, podendo leva-las, inclusive a morte (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2010).

No trabalho realizado por Jaakola et al. (2001) apresentou problemas com o cultivo *in vitro* de explantes de *Vaccinium myrtillus* que foi limitada devido a contaminação, causada pela origem do material vegetal, condições de manutenção que é proveniente de plantas matrizes mantidas no campo o que favorece a contaminação de microrganismos.

Assim, uma das primeiras etapas no estabelecimento *in vitro* é a utilização de agentes químicos para remoção de microrganismos. Os agentes desinfetantes utilizados na cultura de tecidos para a assepsia de segmentos nodais e gemas apicais incluem o etanol, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio (VASSIL e THORPE, 1994).

Com relação ao tempo de exposição ao desinfestante, não houve diferenças significativas para as variáveis oxidações, contaminação microbiana e estabelecimento *in vitro* nos diferentes ensaios desse estudo. No entanto, a desinfestação por tempo prolongado não foi eficiente visto que ocorreu oxidação dos explantes associado ao aparecimento de microrganismos. George e Sherrington (1984) afirma que as diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos.

Um dos principais problemas enfrentados neste trabalho foi a oxidação dos explantes especificamente em relação ao tempo de exposição maior aos agentes desinfestantes. Sobre esse problema Grattapaglia e Machado (1998) está

relacionado no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina.

Além da desinfestação dos explantes outra estratégia que pode ser utilizada para reduzir a contaminação microbiana é a utilização de meios de cultura mais pobres em macro, micronutrientes e sacarose, para diminuir o alto índice de microrganismos beneficiados pelas condições climáticas da amazônica. Essa metodologia tem sido utilizada com sucesso na descontaminação e no cultivo *in vitro* de espécies nativas lenhosas (CHAGAS et al., 2012).

6.2 Experimento II

Análise de variância demonstrou que a interação entre substrato e hormônio apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) para variáveis de número de brotações, comprimento da estaca, comprimento da maior raiz e número de folhas de *L. ferrea*. De maneira análoga foi observado para o fator substrato. Por outro lado, o fator hormônio não demonstrou diferença significativa (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de variância para sobrevivência (SOB), porcentagem de enraizamento (ENR), número de brotações (NB), comprimento da estaca (CME), comprimento da maior raiz (CMR) e número de folhas (NF), em relação aos três tipos de substratos combinados com estacas de *Libidibia ferrea*.

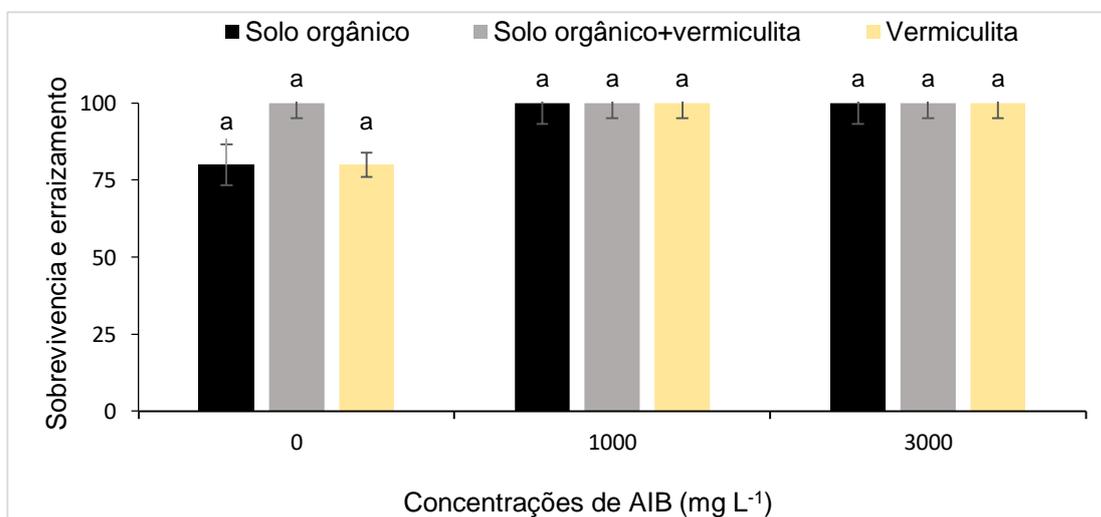
Fontes de variação	GL	SOB	ENR	NB	CME	CMR	NF
SUBSTRATO	2	222,22 ^{ns}	222,22 ^{ns}	17,6222 ^{**}	47,40 ^{**}	103,41 ^{**}	669,09 ^{**}
HORMÔNIO	2	888,9 ^{ns}	888,9 ^{ns}	0,6889 ^{ns}	29,22 ^{ns}	18,16 ^{ns}	15,09 ^{ns}
SUBS*HOR	4	222,2 ^{ns}	222,2 ^{ns}	1,6889 ^{**}	10,14 ^{**}	20,39 ^{**}	73,56 ^{**}
RESÍDUO	36	444,4	444,4	3,0111	12,76	10,03	72,23
CV (%)		22,06	22,06	45,93	24,47	44,11	48,35

*significativo a 5%; ns não significativo.

6.2.1 Sobrevivência e Enraizamento

Todos os tratamentos testados foram eficientes para sobrevivência e enraizamento de estacas de *L. ferrea* (Figura 9), entretanto, não diferindo estatisticamente entre si, sendo assim, não houve interferência das concentrações de hormônios de crescimento para essa variável.

Figura 9 - Valores médios de porcentagem de sobrevivência e enraizamento das estacas de *Libidibia ferrea* nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico + vermiculita e vermiculita. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).



Nesse trabalho foram utilizadas estacas apicais oriundas de plântulas de jucá com diâmetro de aproximadamente 1 mm, assim este tipo de estaca tem uma alta atividade meristemática, conseqüentemente, com uma facilidade de perda de vigor, desidratação e baixa quantidade de reservas nutricionais (CUNHA, 2014).

A presença de um par de folhas nas estacas apicais favoreceu a sobrevivência e conseqüentemente o enraizamento uniforme (Figura 11). Uma das possíveis explicações para esse resultado foi o material vegetal submetido a aplicações de fungicidas e o período de instalação do experimento que foi realizada no inverno período com ocorrências de chuvas e alta umidade o que contribuiu para o crescimento das estacas reduzindo o número de mortas.

Figura 10 - Estacas apicais de *Libidibia ferrea* aos 90 dias de propagação, ilustrando a sobrevivência, enraizamento e crescimento. A – Estacas no substrato solo orgânico + vermiculita; B – Estacas no substrato solo orgânico; C – Estacas no substrato vermiculita.



Fonte: Monteiro, 2019.

Sobre as estacas apicais com presença de folhas Hartmann et al. (2011) afirma que esses órgãos vegetativos são as principais fontes sintetizadoras de carboidratos através da fotossíntese e fonte de auxinas, hormônio este que é translocado para a base das estacas para induzir a formação de raízes.

As folhas pré-existent nas estacas atuam como um dos fatores determinantes no enraizamento, através da produção de fito hormônios, tal como ácido indolacético e de cofatores essenciais a esse processo (FACHINELLO et al. 1994).

Resultados similares desse trabalho foram encontrados por Ruíz e Mesén (2010) que ao trabalharem com a espécie *Plukenetia volubilis* L. da família Euphorbiaceae apresentaram menor porcentagem de perda de folhas com apenas

6,5% de desfolhação e o número de raízes emitidas e a capacidade de sobrevivência e crescimento da parte aérea foram influenciados pela quantidade de reservas presente na estaca.

Resultados distintos foram encontrados nos experimentos realizados por Gonçalves et al (1991) com a espécie *Rhipsalis elliptica* avaliando a influência dos substratos no enraizamento de estacas apicais e não apicais, e verificaram que a vermiculita foi o tratamento mais eficiente se comparando com outros substratos.

O processo de crescimento das raízes adventícias seguiu os parâmetros descrito por Hartmann et al., (2011), onde indicam que o desenvolvimento de raízes adventícias seguem três fases como: diferenciação celular seguida de inchaço de células meristemáticas iniciais; a diferenciação desse grupo celular (meristemáticas) em primórdios da raiz reconhecida; crescimento das novas raízes, incluindo ruptura do tecido da estaca, e a conexão vascular com os tecidos condutores.

Resultados de enraizamento obtido neste estudo estão relacionados com a quantidade de reservas que se encontram nas estacas de maior comprimento. Fachinello et al. (2005) verificou que a real importância dos carboidratos para formação de raízes é que a auxina requer fonte de carbono para a biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas, gerando à necessidade da formação de novas raízes.

O enraizamento ainda pode estar ligado à lignificação das estacas e a presença de compostos fenólicos livres. As estacas menos lignificadas, dentre elas, as apicais, apresentam uma maior quantidade de compostos fenólicos nos tecidos (FAIVRE-RAMPANT et al., 2002).

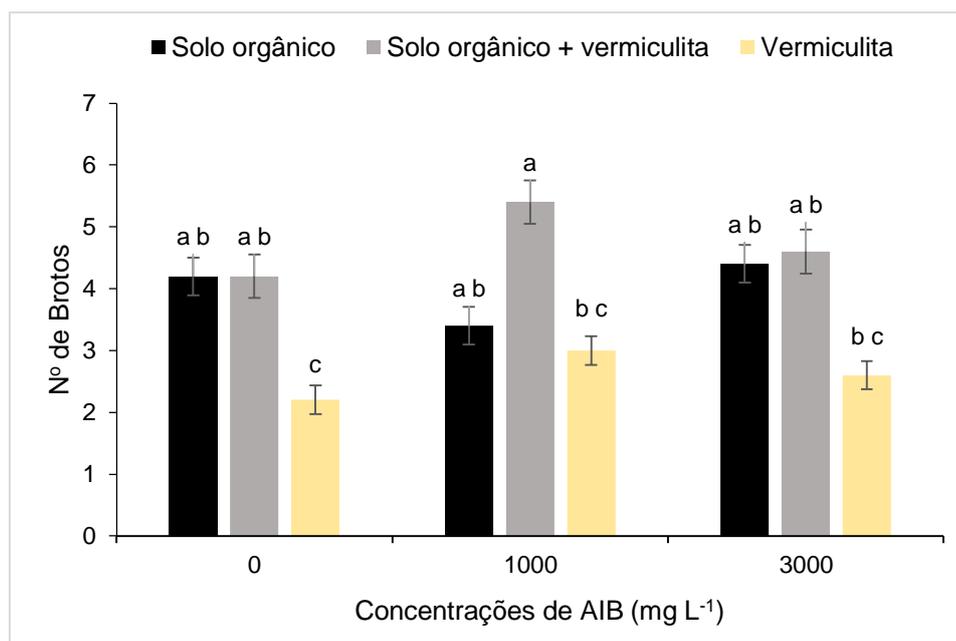
Os resultados vistos nesse trabalho podem estar relacionados as condições ambientais, como época do ano de instalação do experimento, temperatura, umidade assim como a origem e a qualidade fisiológica do material vegetal a ser propagado. Segundo Pio et al. (2003), vários fatores podem influenciar o enraizamento das estacas, tanto intrínsecos, relacionados à própria planta, quanto extrínsecos, ligados às condições ambientais.

Desse modo, o alto índice de sobrevivência e enraizamento em todos os substratos e nas diferentes concentrações de hormônios pode estar ligado a presença de auxinas endógena suficiente para promover o desenvolvimento de raízes adventícias, não necessitando, portanto, de aplicação de reguladores para esse fim (YAMAMOTO, 2013).

6.2.2 Número de brotações

O substrato solo orgânico + vermiculita combinado com AIB (1000 mg L⁻¹) estimulou o maior número de brotos por estaca (5,4). Por outro lado, o menor número de brotos foi observado no substrato vermiculita no tratamento ausente de reguladores de crescimento (Figura 11).

Figura 11 - Valores médios de porcentagem de número de brotações das estacas de *Libidibia ferrea* nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico + vermiculita e vermiculita. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).



Fonte: Monteiro, 2019.

Isoladamente, o substrato vermiculita não favoreceu um maior número de brotações independentemente das concentrações de AIB utilizadas. Por outro lado, quando este substrato é utilizado em combinações com o substrato solo orgânico, este permite um melhor desempenho para desta variável em questão.

Estudo realizado por Burgos et al. (2004) observou um enraizamento e números brotações das estacas de *Ocimum selloi* foram ocasionados pelo uso de substrato inerte vermiculita, em contraposição ao uso de terra. Sobre a influência do tamanho da estaca no número de brotações Nicoloso et al. (2001) verificou no seu estudo com a espécie *Pfaffia glomerata* que o número e o comprimento das brotações por estaca foram maiores naquelas de 10 cm do que nas de 20 cm.

Assim, as reservas nutricionais das estacas combinada com a disponibilidade dos nutrientes oferecida pelo substrato depois da sobrevivência e

enraizamento foi o fator determinante para o desenvolvimento das estacas. As estacas apicais por apresentarem gemas terminais, a dominância apical deve inibir o desenvolvimento de gemas laterais (PIO et al., 2005).

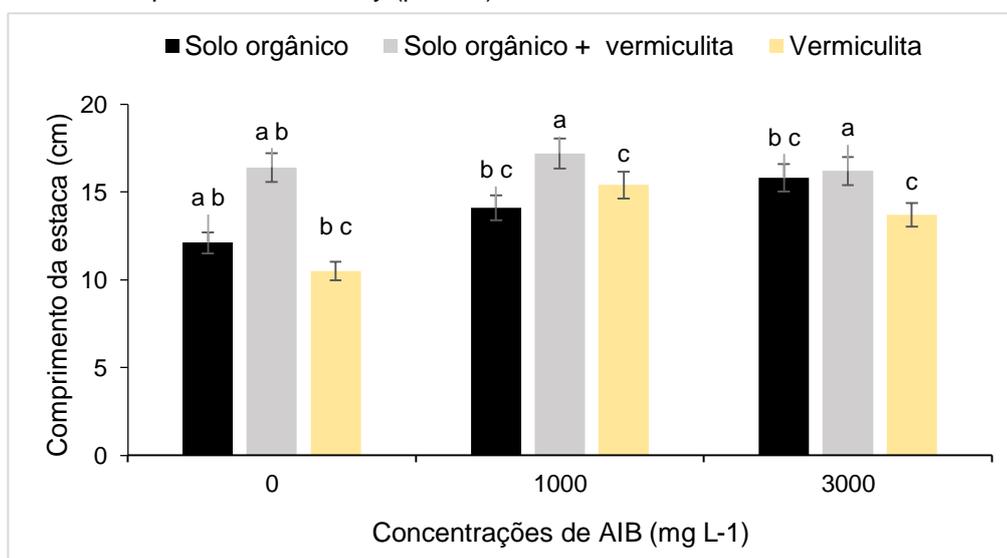
A principal fonte produtora de auxina para a planta é a gema apical e é transportado de forma unidirecional, considerado transporte polar, da extremidade apical para a basal. Essas variações de gradiente afetam o crescimento do vegetal, como alongamento do caule, inibição do crescimento das gemas axilares e determina a dominância apical. Desse modo a proximidade da gema apical nas estacas apicais, propicia maior formação de raízes e um maior número de brotações (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Outra característica vista nesse estudo foi que nem todas as gemas axilares desenvolveram ramos. Para Aguiar (2004) a maioria dos os meristemas axilares serão inativos ou continuam em dormência, se tal mecanismo não ocorresse a grande quantidade de ramos seria prejudicial energeticamente para a planta.

6.2.3 Comprimento da estaca

O substrato solo orgânico + vermiculita apresentaram as melhores respostas para o comprimento das estacas em comparação com os demais tratamentos. As estacas plantadas em vermiculita tiveram a menor média, com 10,5 no tratamento sem adição de hormônios, provavelmente devido serem um substrato inerte e ter uma baixa disponibilidade de nutrientes. (Figura 12).

Figura 12 - Valores médios de porcentagem de comprimentos das estacas de *Libidibia ferrea* nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico + vermiculita e vermiculita. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Monteiro, 2019.

Sendo assim, os comprimentos das estacas apresentaram interferência quanto ao substrato utilizado, mostrando que os substratos mais ricos em nutrientes (solo orgânico + vermiculita) ocasionaram em brotações mais cumpridas.

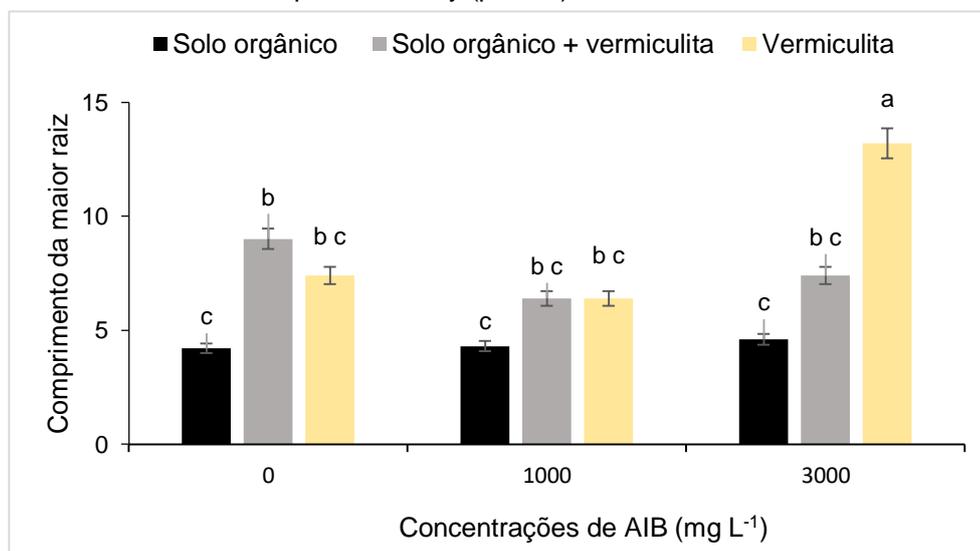
Resultados contrários desse trabalho foram encontrados no estudo de Ferreira et al. (2010), trabalhando com propagação vegetativa de maniçoba (*Manihot glaziovii*) usando estacas de 25 cm de comprimento, verificaram um maior comprimento das brotações em estacas com maior diâmetro diferentes dos resultados desse estudo que apresentou um maior comprimento das estacas relacionado ao substrato e ao tipo de estaca do tipo apical.

6.2.4 Comprimento da maior raiz

Foi observado que o substrato vermiculita em combinação de AIB (3000 mg L⁻¹) apresentou o maior comprimento médio de raízes 13,2 e difere de todos os tratamentos. Este resultado pode ser atribuído devido às estacas apicais apresentarem um par de folhas que auxiliam diretamente na realização de fotossíntese e conseqüentemente na produção de auxina, promovendo a sobrevivência e crescimento radicular (BORDIN et al., 2005).

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Stumpf et al (1999), que trabalhando com a propagação de *Chamaecyparis lawsoniana* Parl. em substratos de arroz carbonizada, casca de arroz, areia e vermiculita foram encontradas diferenças estatísticas favoráveis à vermiculita para comprimento das raízes (Figura 13).

Figura 13 - Valores médios de porcentagem de comprimentos da maior raiz de *Libidibia ferrea* nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico + vermiculita e vermiculita. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo de Tukey (p<0,05).



Neste estudo, foi observado que as estacas no substrato vermiculita tiveram um aumento no comprimento das raízes devido à elevação do percentual de porosidade total, espaço de aeração e água disponível (Figura 14).

Este crescimento pode estar ligado as concentrações endógenas mais elevada de auxinas, favorável ao maior crescimento do sistema radicular (ANTUNES et al., 2000).

Figura 14 - Estacas apicais de *Libidibia ferrea* após 90 dias de propagação, ilustrando o desenvolvimento radicular e parte aérea. A – Estacas obtidas do substrato terra; B – Estacas obtidas do substrato terra + vermiculita; C – Estacas obtidas do substrato vermiculita.



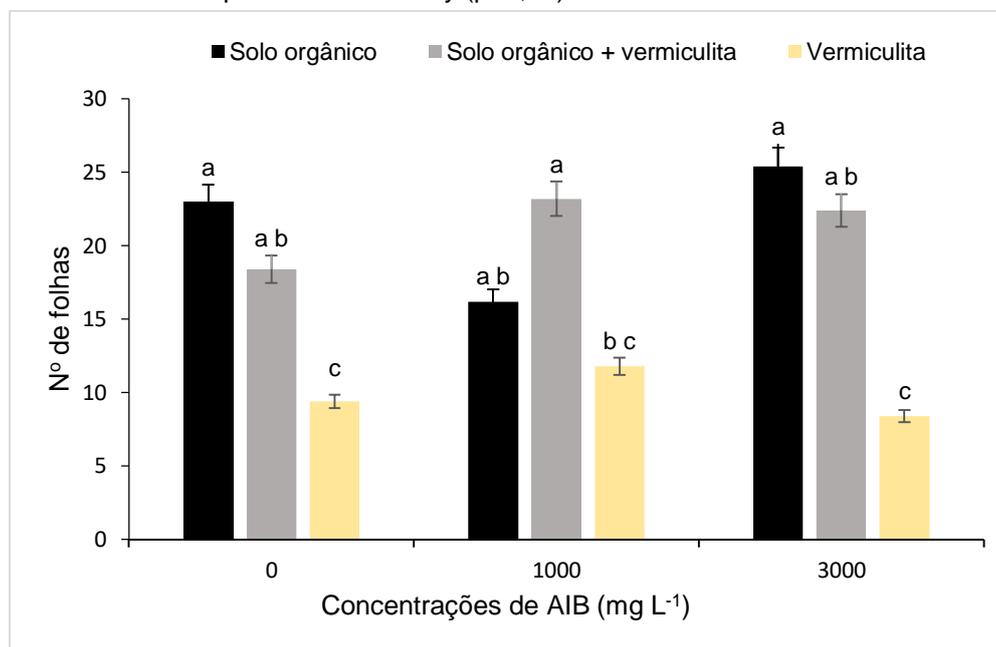
Fonte: Monteiro, 2019.

Os principais fatores que afetam o crescimento das raízes na propagação vegetativa Fachinello et al. (2005) cita que é a condição fisiológica da planta matriz, o tipo de estaca, balanço hormonal, potencial genético de enraizamento, oxidação de compostos fenólicos, entre outros.

6.2.5 Número de folhas

Para a variável número de folhas, observou-se que nos substratos solo orgânico e solo orgânico + vermiculita não houve diferença significativa, obtendo as maiores medias na concentração 3000 (mg L⁻¹). Houve diferença significativa para os valores das estacas no substrato vermiculita com os menores índices independente da concentração de AIB (Figura 15).

Figura 15 - Valores médios de porcentagem de números de folhas de *Libidibia ferrea* nos três substratos: solo orgânico, solo orgânico + vermiculita e vermiculita. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Monteiro, 2019.

Estes resultados confirmam que os substratos solo orgânico e a combinação solo orgânico + vermiculita deram um suporte nutricional para as estacas lançarem seus brotos e desenvolverem suas folhas. Por outro lado, uma das explicações para o baixo índice no número de folhas para as estacas no substrato vermiculita independente da concentração de hormônio está relacionado que elas investiram em produção de raiz reduzindo a formação novas folhas.

Sobre a formação de estruturas na parte aérea da estaca Lima et al. (2006) explica que funciona como um forte drenador consumidor das reservas de carboidratos e compostos nitrogenados, sendo assim, o seu surgimento antes da emissão das raízes na base da estaca pode levar à exaustão dessas reservas, prejudicando o enraizamento ou resultando na morte das estacas. Conforme Pio et al. (2005), a remoção da gema apical em estacas, promove a quebra da dominância apical, estimulando a ativação das gemas laterais no lançamento de brotações e, conseqüentemente, no aumento do número de folhas.

7 CONCLUSÃO

O uso dos agentes químicos hipoclorito de sódio (NaClO), de álcool 70%, e de CabrioTop®, nas concentrações empregadas nesse trabalho, são ineficazes para desinfestação de explantes de segmentos nodais de *L. ferrea*.

A interação de substrato terra + vermiculita na concentração 1000 (mg L⁻¹) Ácido indolbutírico favorece a formação de plântulas uniformes de *L. ferrea* em condições *ex vitro*.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. Arquitetura de Plantas. **Instituto Politécnico de Bragança**, Escola Superior Agrária, 39 p. 2014.

ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar. 2000.

ANTUNES, L. E. C.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. A. Propagação de cultivares de amoreira-preta (*Rubus* spp.) através de estacas lenhosas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 195-199, abr. 2000.

AZEVEDO, J. L. Microbiologia de microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de (ed.). *Ecologia microbiana*. Jaguariúna/ **EMBRAPA-CNPMA**, 488 p. 1998.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium*). **Ciência Florestal**, v.16, n.4, p.381-390, 2006.

BENEDITO, C.P.; COELHO, M. de F. B.; GUIMARÃES, I. P.; JUNIOR, V. P. A.; MAIA, S. S. S.; BATISTA, P. F. Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. férrea em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, n.3, p.508-513, 2012.

BHOJWANI, S. S.; DANTU, P. K. Micropropagation. In: Plant Tissue Culture: Na Introductory Text. India: **Springer India**, p. 245–274. 2013.

BORDIN, I.; HIDALGO, P. C.; Bürkle, R.; ROBERTO, S. R. Efeito da presença da folha no enraizamento de estacas semilenhosas de porta-enxertos de videira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p.215-218, jan-fev, 2005.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira**. 1ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2011.

BURGOS, A. M. L.; LÓPEZ, A. E.; CENÓZ, P. J. Propagación del anís de campo *Ocimum selloi* (Lamiaceae) por medio de esquejes. In: **Comunicaciones científicas y tecnológicas**. Resumen Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste, 2004.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética**. Editora Coimbra: p. 407, 2010.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Campo Grande: Embrapa, 42 p. 2003.

CID, L.P.B. **A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso?** Rev. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. 8p. 2002.

CLEMENT, C.R.; BOREM, A.; LOPES, M.T.G. **Da domesticação ao melhoramento de plantas. Domesticação e Melhoramento: espécies amazônicas**. Editora UFV, Viçosa, 2009.

CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A. **Tissue culture techniques for native Amazonian fruit trees**. In: LEVA, A.; RINALDIP, M. R. (Eds.). Recent advances in plant *in vitro* culture. Croatia: InTech Prepress, p. 151-164, 2012.

COSTA, L. M. **Desenvolvimento de produto seco por aspersão obtido a partir das cascas do caule de *Libidibia ferrea* Martius var *ferrea* (fabaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Manaus: UFAM, 2012. 127p.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

CUNHA, A. L. B. **Propagação vegetativa de *Piper hispidum* sw. e *Piper tuberculatum* jacq. em função de diferentes substratos e tipos de estacas**. Mestre em Agronomia Tropical – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, 2014.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. UNESP, 230 p. 1996.

DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A.; WENDLING, I. Introdução ao cultivo *in vitro* de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Boletim de pesquisa e desenvolvimento** / Embrapa Florestas. Colombo, 2008.

EMMANUEL, E.; KECK, G.; BLANCHARD, J. M.; VERMANDEB, P.; PERRODINA, Y. Toxicological effects of disinfection using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, Cumbria, v. 30, p. 891-900, 2004.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

ESPINOSA, C. A.; PUENTE, C. A.; GARCIA, S. *In vitro* plant tissue culture : means for production of biological active compounds. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 1–18, 2018.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas; UFPEL, 1994. 179p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 132p. 2005.

FERREIRA, L. E.; ANDRADE, L. A. de; GONÇALVES, G. S.; SOUZA, E. P. de; FERREIRA, H. V. Diâmetro de estacas e substratos na propagação vegetativa de maniçoba, *Manihot glaziovii* Muell. Arg. **Revista Ciência Agronômica**, 393-402. Centro de Ciências Agrárias - UFC, Fortaleza, CE. 2010.

FAIVRE-RAMPANT, O.; CHARPENTIER, J. P.; KEVERS, C. M.; DOMMES, J.; VAN ONCKELEN, H.; DAY-ALLEMAND, C.; GASPAR, T. Cuttings of the nonrooting rac tobacco mutant overaccumulate phenolic compounds. **Function Plant Biol** 29: 63-71. 2002.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H. E. P.; SILVA, D. J. H. da; BARBOSA, J. G.; Produção de mudas de tomateiro por meio de estacas enraizadas em hidroponia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.4, p.343-348, 2004.

FREITAS, C. A. B. **Estabelecimento *in vitro* de *Annona crassiflora* e *Annona squamosa* utilizando segmentos nodais**. Dissertação Mestre em Biologia Geral - Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2014.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. de M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n.5, p. 801-807, 2012.

GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; FERRAZ, I. D. K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 747-749, jul. 2007.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. 1. ed. Eversley: Exegetics, 709 p. 1984.

GONÇALVES, A. L.; CATHARINO, E. L. M.; TOYOFUKU, R. A. Efeitos de diferentes substratos no enraizamento de estacas apicais e não apicais de *Rhipsalis elliptica* G.A. Lindberg, Cactaceae. In: **Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais**, 8., 1991, Joinville. Anais. Joinville: UFSC, 1991. p. 68.

GOULART, A. C. P.; FIALHO, W. F. B. Incidência e controle de *Fusarium moniliforme* Sheldon em sementes em milho. **Revista Brasileira de Sementes**, 21(1): p. 216-22, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. **Micropropagação**. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Vol. I. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH. Brasília. p.183 - 260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, R. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: principles and practices**. 8 ed. New Jersey: Prentice Hall, 915p. 2011.

KERBAUY, G. B. **Clonagem de plantas *in vitro*: uma realidade.** Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento, v. 1, p. 30–33, 1997.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. **Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages.** In: KOZAI, T.; et al (Ed.). Photoautotrophic (Sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Netherlands: Springer, p. 19-22. 3 cap. 2005.

JAAKOLA, L.; TOLVANEN, A.; LAINE, K.; HOHTOLA, A. Effect of N6 isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.66, p.73-77, 2001.

LEBOWITZ, F.J. **Plant Biotechnology, a laboratory manual.** 1995.

LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. de M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; BENITEZ, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.669-671, 2007.

LIMA, R. L. S.; SIQUEIRA, D. L.; WEBER, O. B.; CAZETTAS, J.O. Comprimento de estacas e parte do ramo na formação de mudas de aceroleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 83-86, 2006.

LONDE, L. N.; SOUSA, C. S.; VIEIRA, C. U.; BONETTI, A. M.; KERR, W. E. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, 23(3): p. 94-100, 2007.

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

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

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas: diagnose e controle.** Brasília: Embrapa - CNPH, 70p, 1997.

MAIA, G.N. Caatinga: **árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação Gráfica, Leitura & Arte, 413 p. 2004.

MORAIS, T. P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAKAMURA, E. S. KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Libidibia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119–124, 2002.

NOGUEIRA, J. C. B. Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**. São Paulo, v. 24, 71p, 1977.

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. Resumos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2007. p.1-5.

NAVES, V.C. **Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras: UFLA, 2001. 76p.

NICOLOSO, F. T.; CASSOL, L. C.; FORTUNATO, R. P. Comprimento da Estaca de ramo no enraizamento de Ginseng Brasileiro (*Pfaffia Glomerata*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.57-60, 2001.

NOZAKI, A.H.; HAYASHI, K.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; Iinuma, M.; AKAO, Y. Pauferrol, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II

inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**. v. 48, p. 8290–8292, 2007.

PAIVA, H. N.; GOMES, J.M. **Propagação Vegetativa de Espécies Florestais**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2005.

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

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e Metabólitos Secundários *in vitro* de Plantas Medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 102 p. 2001.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. **Arvores de Manaus**. Manaus, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 312 p., 1975.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, v. 1, p. 210-224, 1996.

PIO, R.; PIO, R.; CHALFUN, N.; COELHO, J.; CONTIJO, T.; CARRIJO, E. Enraizamento de estacas apicais de figueira tratadas com sacarose e ácido indolbutírico por imersão rápida. **Revista Brasileira Agrociência**, v.9, n.1, p.35-38, 2003.

PIO, R; BASTOS, D. C.; BERTI, A. J.; FILHO, J. A. S.; Filho, F. A. A. M. F.; Entelmann, F. A.; ALVES, A. S. R.; NETO, J. E. B. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 562-567, mai-jun, 2005.

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**. [s.l.] Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

QUISEN, R.C; ANGELO, P.C. SILVA. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos**. Manaus, AM: EMBRAPA- Amazônia Ocidental, 44p, 2008.

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

RIBEIRO, J.M.; BASTOS, D.C **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 26p, 2008.

RUÍZ-SOLSOL, H.;MESÉN, F. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Agronomia Costarricense**, v.34, n.2, p.259-267, 2010.

SALLES, E. A. P. B. Desinfestação e introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. **Pesquisa Florestal Brasileira** v. 37, n. 92, p. 485-491, out./dez. 2017.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 446p.

SCHUCH, M.F.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221p.

STUMPF, E. R. T.; GROLLI, P. R.; SILVA, J. A. G.; Enraizamento de estacas de *Chamaecyparis lawsoniana* Parl. em cinco substratos com uso de ácido indolbutírico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 207-211, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4 ed. Artmed, p. 622-624. 2009.

VASSIL, I.K.; THORPE, T.A. **Plant cell, and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 593p.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; PREAM ANAND, R.; SELVARAJ, N. *In vitro* propagation of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. from nodal segments of a 10-year-old tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology** – Plant, Heidelberg, v. 39, n. 4, p. 409-414, 2003.

WENDLING, I. 2003. **Propagação vegetativa**. I Semana de estudo universitário – Florestas e meio ambiente. Embrapa Florestas.

XIMENES, N.C.A. **Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem da *Caesalpinia ferrea* (Cf e PL):** aplicação biológica. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Universidade Federal do Pernambuco, Recife. 53p, 2004.

YAMAMOTO, L. Y.; KOYAMA, R.; BORGES, W. F. S.; ANTUNES, L. E. C.; ASSIS, A. M.; ROBERTO, S. R. Substratos no enraizamento de estacas herbáceas de amora-preta Xavante. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.1, p.15-20, jan, 2013.