UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DECIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

TAMYRIS DE MELLO

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE SAPUCAIA (*Lecythis pisonis* CAMBESS)

JERÔNIMO MONTEIRO – ES
2018

TAMYRIS DE MELLO

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE SAPUCAIA (*Lecythis pisonis* CAMBESS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Silvicultura.
Orientador: Elzimar Gonçalves de Oliveira.
Coorientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Felicio Gomes Corteletti – CRB-6 ES 000646/O

Mello, Tamyris de, 1993-
M517e Estabelecimento e multiplicação in vitro de sapucaia (Lecythis pisonis Cambess) / Mello, Tamyris de. – 2018.
63 f. : il.

Orientador: Elzimar de Oliveira
Gonçalves. Coorientador: Rodrigo
Sobreira Alexandre.
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Plantas – Propagação in vitro. 2. Crescimento (Plantas). 3. Sapucaia. I. Gonçalves, Elzimar de Oliveira. II. Alexandre, Rodrigo Sobreira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 630

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE SAPUCAIA (*Lecythis pisonis* CAMBESS)

Tamyris de Mello

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.

Drª. Liana Hilda Golin Mengarda (Examinadora externa)
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Elias Terra Wener (Examinador interno)
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª. Drª. Elzimar de Oliveira Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Espírito Santo

Dedico a Deus e ao meus pais, pela vida, por serem meus alicerces, meus heróis, meu tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter estado e por estar ao meu lado em todos os momentos, por ter me ouvido, me dado força e coragem para levantar e tentar todas as vezes que parecia não ter mais jeito. Aos meus anjos da guarda, por me guardarem, iluminarem e guiarem.

À minha família por também estar sempre ao meu lado, apoiando todas as minhas decisões, mesmo quando não compreendidas. Pelo amor, carinho, dedicação, oração, exemplo e por ser meu porto seguro, meu maior orgulho.

A todos os meus amigos, que mesmo longe, nunca deixaram de estar ao meu lado, sempre me apoiando e me dando força e conselhos.

Ao meu amigo Breno, por ter estado ao meu lado em todo o decorrer desse trabalho, me dando força, apoio, incentivo e coragem, não me deixando desanimar nunca.

À minha orientadora Profª. Drª. Elzimar de Oliveira Gonçalves, pela amizade, ensinamentos, lições, oportunidades, paciência, por ter contribuído tanto para o meu crescimento durante todos esses anos juntas e, principalmente, por acreditar e confiar em mim.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, por ter sido a ponte para tudo isso acontecer e dar certo, pelas ideias, conselhos e ensinamentos, por estar sempre de prontidão para ajudar, por toda a força, pela amizade e por ser um grande exemplo de vida.

Ao Prof. Dr. José Carlos Lopes, por ter me aceitado e aberto as portas do Laboratório de Análise de Sementes para que eu pudesse trabalhar. Por toda atenção e preocupação comigo e meu trabalho. Pela amizade, confiança e tanto carinho.

Ao Prof. Dr. Elias Terra Werner, pelo acolhimento, disposição, conhecimentos, compreensão, atenção e ajuda.

Ao Prof. Dr. Willian Bucker Moraes, pela ajuda, conselhos e sugestões, e por ter aberto as portas do Laboratório de Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas.

À Glaucia, por toda disposição e ajuda, carinho, doçura e atenção.

Ao Sr. Isaías, por estar sempre de prontidão quando solicitado, pela

atenção, ajuda e ensinamentos.

À todas as meninas do Laboratório de Análise de Sementes, por ter me acolhido, pelas conversas, ajuda e carinho.

Ao Otávio, pela amizade, risadas, conversas, confiança e por não ser somente uma super mão que ajuda, mas um exemplo de pessoa e profissional.

Aos vigilantes do Viveiro Experimental, Josuel, Juarez e Marcelo, pela companhia das noites, ajuda, conversas e gentileza.

Ao José Romário, pela ajuda, disposição, conselhos e conhecimentos adquiridos.

Ao Prof. Dr. José Franklim Chichorro, pela conversa, conselhos, sugestões, ajuda e conhecimento.

Ao Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt, pela disponibilidade de tempo, ajuda, compreensão e paciência.

Ao Prof. Dr. João Paulo Bestete de Oliveira, pela disponibilidade de tempo e preciosa ajuda.

Aos Laboratórios de Sementes, Epidemiologia e Manejo de Doenças de Plantas, e ao de Sementes Florestais.

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, ao Nudemafi, ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira e ao Viveiro Experimental.

À Universidade Federal do Espírito Santo.

À CAPES e à FAPES.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite de participação, pelas contribuições e ensinamentos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, que estão sempre dispostos a ajudar e pelo carinho.

A todos os demais que ajudaram direta e indiretamente.

A todos o meu eterno agradecimento, pois cada um contribuiu de forma única e essencial para a formação, realização e conclusão desse sonho.

Muito obrigada!

“Quem verdadeiramente quer crescer
não se prende às dificuldades. ”
(Pe. Fábio de Melo)

RESUMO

MELLO, T. **Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de** *Lecythis pisonis* **Cambess**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientadora: Profª. Dra. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.

A espécie *Lecythis pisonis* Cambess, conhecida popularmente como sapucaia, apresenta grande potencial para uso ornamental, produção de castanhas e madeira, sendo indicada para reflorestamento por ser uma espécie clímax e por atrair a fauna. Porém, apresenta baixa produção de frutos, e dificuldade na obtenção e germinação das sementes, limitando a propagação seminífera da espécie. Assim, a propagação vegetativa *in vitro* se apresenta como uma técnica a ser testada, visto que ela possibilita plantas livre de patógenos. Portanto, o objetivo deste estudo foi propagar *in vitro* segmentos caulinares de *L. pisonis*. O estudo foi dividido em quatro partes: i) minijardim seminal; ii) desinfestação dos segmentos caulinares; iii) indução de brotações *in vitro*; e iv) enraizamento *in vitro*. Para a montagem do minijardim seminal, as mudas com dois anos de idade foram transplantadas para vasos e feito o processo de revigoramento. Foram realizadas coletas mensais e contabilizada a produtividade das minicepas. No desenvolvimento do protocolo de desinfestação foram feitos três experimentos, onde foram testadas diferentes concentrações e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaOCl), e diferentes concentrações e método de aplicação de amoxicilina®. No processo de indução de brotações foram montados dois experimentos, testando diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN) e os meios de cultura WPM e MS. Para o enraizamento, foram analisadas diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) com diferentes tempos de exposição a um estresse térmico de 40 °C. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados, foi realizada a análise de variância e a análise estatística pertinente a cada caso. Com os resultados obtidos do minijardim, foi possível identificar que os meses mais quentes do ano, principalmente dezembro, foram os de maior produtividade média das minicepas, com uma correlação positiva da produtividade com a temperatura mensal média da região. Para a desinfestação do material

vegetativo, os melhores resultados foram a imersão dos explantes em NaOCl a 3% e em amoxicilina® a 3000 mg L^{-1}, por 20 minutos cada. Quanto a indução de brotações, o meio de cultura MS suplementado com BAP (0,25 mg L^{-1}) diferenciaram dos demais, obtendo as melhores médias nas características avaliadas. E o enraizamento ocorre com AIB (1 mg L^{-1}), não sendo necessário adotar estresse térmico. A propagação in vitro de sapucaia é possível com as técnicas utilizadas nesse trabalho. Porém, necessita de mais estudos e aprimoramento das técnicas na espécie para produção de mudas em larga escala, além de estudos quanto a aclimatação das plântulas.

Palavras-chave: sapucaia, cultivo *in vitro*, micropropagação, desinfestação, minijardim seminal, regulador de crescimento.

ABSTRACT

MELLO, T. **Establishment and multiplication *in vitro* of** *Lecythis pisonis* **Cambess**. 2018. Dissertation (Master of Forest Science) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Profª. Drª. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Co-adviser: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.

The species *Lecythis pisonis* Cambess, known popularly as sapucaia, presents great potential for ornamental use, production of nuts and wood, being indicated for reforestation as a climax species and for attracting the fauna. However, it presents low fruit production, and difficulty in obtaining and germinating the seeds, limiting the seminiferous propagation of the species. Thus, vegetative propagation *in vitro* is presented as a technique to be tested, since it allows pathogen free plants. Therefore, the objective of this study was to propagate *in vitro L. pisonis*. The study was divided into four parts: i) seminal minijardim; ii) disinfestation of the stem segments; iii) induction of shoots *in vitro*; and iv) *in vitro* rooting. For the assembly of the seminal minijardim, the two-year-old seedlings were transplanted to pots and the process of reinvigoration was done. Monthly collections were carried out and the productivity of minicepas was counted. In the development of the disinfestation protocol three experiments were carried out, where different concentrations and time of exposure to sodium hypochlorite (NaOCl) were tested, and different concentrations and method of application of amoxicillin were tested. In the shoot induction process two experiments were set up, testing different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN) and WPM and MS culture media. For the rooting, different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) were analyzed with different exposure times at a thermal stress of 40 ° C. All experiments were conducted in a completely randomized design, analysis of variance and statistical analysis pertinent to each case. With the results obtained from the minijardim, it was possible to identify that the hottest months of the year, mainly December, were those with the highest average productivity of the minicepas, with a positive correlation of productivity with the average monthly temperature of the region. For the disinfestation of the vegetative material, the best results were immersion of the explants in 3% NaOCl and in amoxicillin ® 3000 mg L-1, for 20 minutes each. As for shoot induction, the MS medium supplemented with BAP (0.25 mg L^{-1}) differed from the others,

obtaining the best means in the evaluated characteristics. And the rooting occurs with IBA (1 mg L^{-1}), and it is not necessary to adopt thermal stress. The *in vitro* propagation of sapucaia is possible with the techniques used in this work. However, it needs more studies and improvement of the techniques in the species for large-scale seedling production, besides studies on the acclimatization of the seedlings.

Keywords: sapucaia, *in vitro* cultivation, micropropagation, disinfestation, seed minijardim, growth regulator.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVOS 15
2.1 GERAL 15
2.2 ESPECÍFICOS 15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
3.1 SAPUCAIA 16
3.2 REVIGORAMENTO VEGETATIVO 19
3.3 DESINFESTAÇÃO 20
3.4 CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS 21
3.4.1 Micropropagação em espécies florestais 22
4. METODOLOGIA 26
4.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL 26
4.2 MINIJARDIM SEMINAL 26
4.3 DESINFESTAÇÃO 29
4.4 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES 32
4.5 ENRAIZAMENTO 34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
5.1 MINIJARDIM SEMINAL 36
5.2 DESINFESTAÇÃO 40
5.3 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES 47
5.4 ENRAIZAMENTO 51
6. CONCLUSÕES 57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Lecythis pisonis* Cambess é originária da Amazônia, com ocorrência na Floresta Atlântica, desde os estados do Ceará até o Rio de Janeiro, sendo frequente no Sul da Bahia e no Norte do Espírito Santo (MORI, 1990; SOUZA et al., 2008). É popularmente conhecida como sapucaia, castanha de sapucaia, sapucainha, pau de cachimbo, papo de anjo, fruta de cotia e fruta da lepra (LORENZI, 2002).

A espécie apresenta grande potencial para uso ornamental, produção de frutos e de madeira, sendo indicada para reflorestamento por ser uma espécie clímax e por atrair a fauna local (RIBEIRO, 2010). As castanhas da sapucaia possuem grande potencial de comercialização para alimentação humana, por possuir alto valor nutricional. De acordo com Rios e Pastore Júnior (2011), a semente é comestível, oleaginosa e muito saborosa; consumida ao natural, tostada, assada ou cozida, constituindo um excelente alimento, em igualdade de condições de poder disputar mercado com as nozes, amêndoas ou castanhas nacionais e europeias.

A espécie possui baixa frequência natural nas florestas, devido à pequena produção de sementes. Além de florescer esporadicamente, em intervalos de 1 a 5 anos, dependendo do indivíduo (WICKENS, 1991), dificultando a produção de mudas via propagação seminal.

A frutificação inicia somente após 15 anos, quando atinge uma altura entre 10,8-12,8 metros (RIZZINI, 1971). Dependendo das condições a árvore pode atingir até 50 m e seus frutos, classificados como pixídio lenhoso, oval e unilocular, com o opérculo discoide, podem pesar até 2 kg (CARVALHO, 2006). As sementes ficam presas a um funículo carnoso grosso, altamente atrativo a morcegos. Dessa forma, assim que o opérculo se desprende, estes mamíferos dispersam todas as sementes, característica que dificulta a sua coleta. Além disso, a espécie possui um processo germinativo lento e desuniforme, provavelmente decorrente da presença de dormência tegumentar ou fisiológica.

Por apresentar baixa produção, dificuldade na obtenção de sementes, crescimento lento e altas taxas de mortalidade das mudas por meio da

propagação via seminal (RICKLI et al., 2015), a propagação vegetativa *in vitro* apresenta-se como uma técnica a ser testada, visto que ela possibilita a produção de material vegetal em condições assépticas, para espécies com dificuldades de germinação (PINHAL et al., 2011; PELEGRINI et al., 2013). Além disso, o cultivo *in vitro* tem sido utilizado na área florestal para preservação de germoplasma, com rápida multiplicação em espaço reduzido e produção de mudas selecionadas (ERIG; SCHUCH, 2005). Portanto, tem-se como hipótese, que é possível produzir mudas *in vitro* de *L. pisonis* de qualidade em alta escala, dispondo de poucos propágulos.

A propagação *in vitro* apresenta-se como uma técnica viável para produção de plantas normais e livres de contaminantes, com grande e rápida multiplicação e com espaço e número de propágulos reduzido. Neste contexto, justifica-se a aplicação desta técnica a fim de facilitar a propagação e obter mudas de qualidade, tanto para reflorestamento, quanto para monocultivos para a produção de castanhas.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estabelecer e multiplicar *in vitro* segmentos caulinares de sapucaia.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a produção de segmentos caulinares do minijardim seminal;
- Estabelecer um protocolo de desinfestação dos segmentos caulinares;
- Promover a indução e crescimento de gemas axilares em segmentos caulinares *in vitro*; e
- Promover e avaliar o enraizamento das brotações *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SAPUCAIA

A espécie *Lecythis pisonis*, comumente conhecida como sapucaia, pertence à família Lecythidaceae. As árvores maiores, na idade adulta, atingem dimensões próximas de 50 m de altura e 150 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido a 1,30 m do solo) (CARVALHO, 2006). É uma planta decídua, heliófita ou esciófita, seletiva higrófita, característica das matas úmidas da costa atlântica. Ocorre principalmente no interior da mata primária densa, porém tolera formações abertas (LORENZI, 2002).

A sapucaia é uma espécie originária da Amazônia brasileira, com ocorrência na Floresta Atlântica, entre os estados do Ceará até o Rio de Janeiro, sendo particularmente frequente no Sul da Bahia e no Norte do Espírito Santo (SOUZA et al., 2008).

A espécie é decídua durante a estação seca, seguida de brotações na coloração rósea, sua floração ocorre de julho a novembro com frutificação de julho a setembro no Espírito Santo. O fruto é um pixídio lenhoso e deiscente, é unilocular, com uma abertura central, à qual são aderidas as sementes, com funículo carnoso grosso (CARVALHO, 2006). Esse funículo atrai morcegos, que retiram as castanhas deste fruto, se alimentam e dispersam suas sementes, enquanto o pixídio permanece preso na planta-mãe.

Para a produção de mudas, os frutos podem ser colhidos diretamente da árvore, ao iniciarem sua abertura espontânea, e levados ao sol para completar a abertura e liberação das sementes (LORENZI, 2002). De acordo com o mesmo autor, a emergência ocorre em 40-70 dias e a germinação é irregular. Segundo Sampaio (2000), quando semeadas logo após a coleta, 80% das sementes germinam. Porém, estas perdem a viabilidade em poucos meses e, além disso, o desenvolvimento das mudas é lento, ficando prontas para plantio em 8-10 meses (REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2016).

No campo, o desenvolvimento das plantas é moderado, podendo atingir 2,5 m de altura aos 2 anos. O crescimento prossegue com uma média de 1 m/ano

(IMA – incremento médio anual), de modo que as árvores com 10 anos de idade alcançam 10 a 12 m de altura, com diâmetro da copa de 10 m (RIOS; PASTORE JÚNIOR, 2011), iniciando a frutificação após 15 anos.

A espécie apresenta grande potencial ornamental, frutífero, medicinal e madeireiro. Seu principal atrativo para o paisagismo é a coloração rósea de suas folhas, quando jovem. É cultivada como ornamental, principalmente nos Estados de São Paulo e do Rio de Janeiro; e na maioria dos jardins botânicos, em regiões tropicais (CARVALHO, 2006).

No âmbito frutífero, as castanhas de sapucaia têm recebido atenção especial pois são fontes naturais de vitaminas, minerais, proteínas e ácidos graxos essenciais, podendo contribuir para a dieta humana e de animais (CARVALHO et al., 2012). Este uso levou à instalação de pomares entre a Bahia e o Espírito Santo com interesse do mercado internacional pelas sementes de sapucaia (FERRÃO, 2001). No entanto, os teores de nutrientes encontrados nestas castanhas de diferentes regiões apresentam grandes variações, o que pode ser reflexo dos diferentes tipos de solos e condições ambientais em que estas árvores se encontram (CARVALHO et al., 2012).

Dentro da medicina tradicional, as folhas são usadas como um banho, para o tratamento de prurido no corpo (SILVA et al., 2012). A casca contém taninos e saponinas não alcalóides, sendo empregada no combate à tosse (MILLIKEN et al., 1986). O óleo das sementes é tido como diurético, sendo eficaz contra a diabete, no tratamento da gota e da sífilis, podendo ser usado como um emoliente na redução da dor muscular (AGRA; FREITAS; BARBOSA, 2007).

A madeira é indicada para construções externas em estruturas expostas como postes, estacas, esteios, mourões e dormentes; na construção civil, é usada como vigas, caibros, ripas, tacos e tábuas para assoalhos, marcos de portas e de janelas; é também utilizada em peças torneadas ou em peças flexíveis; na fabricação de carrocerias, como cabos de ferramentas e implementos agrícolas (CARVALHO, 2006). A espécie possui diversas outras utilidades, resumidas no Quadro 1.

Quadro 1 – Utilidades da espécie *Lecythis pisonis*

Parte da planta	Forma	Categoria de uso	Uso
Caule	-	Calafetagem	Da estopa extraída da casca obtém-se material usado em calafetagem
	Fibras	Cordoaria	O líber fibroso fornece cordas grosseiras
		Têxtil	Confecção de tecidos
		Outros	Usada como envoltório de cigarros
	-	Isca	Prepara-se um veneno para peixes
	-	Medicinal	Combate às tosses; espremida sobre as feridas possui efeito cicatrizante; diurética e contra a diabetes
	Banho		Coceira
	Decocção		Diurética; é tônica e utilizada para tratamento de icterícia, hepatite e estados de febre
	Infusão		Tratamento de icterícia; alivia a dor de estômago e diarreia; alivio de complicações do fígado
	Óleo		Antissifilítico e diurético; resolve problemas de origem gotosa e sifilítica
	Pó		Antissifilítico e diurético
Folha	Banho	Medicinal	Contra coceira
	Infusão		Tratamento de icterícia
Fruto	Integral	Artesanal	Para obras torneadas como compoteiras, vasos, cofres e outros
	Infusão	Medicinal	Alivio de complicações do fígado
	Macerado		A água de maceração é utilizada contra diabetes, catarro vesical, micoses superficiais da pele (impinges) e combater a albuminúria
	Outra		A emulsão feita com as amêndoas é anticatarral e antipirética
Árvore	Integral	Ornamental	Ornamental de rua, muito decorativa, além de ser cultivada em parques e jardins
Semente	*In natura*	Alimento animal	Alimentação de frangos
	-	Alimento humano	Culinária e em confeitarias; ingrediente para doces, confeitos e pratos salgados
	Assado/cozido/ torrado		Comestível, oleaginosa e muito saborosa.
	Óleo		Óleo comestível de cor amarelo-clara, gosto doce e cheiro agradável
		Combustível	É utilizado na iluminação
		Cosmético	Formulações cosméticas
		Medicinal	Diurético e remédio eficaz contra a diabete.
		Saboaria	Fabricação de sabão

Fonte: adaptado de Rios e Pastore Júnior (2011).

3.2 REVIGORAMENTO VEGETATIVO

Um grande impedimento à propagação vegetativa encontra-se na maturação dos propágulos, o que interfere decisivamente no potencial de enraizamento dos mesmos.

O revigoramento refere-se à restauração do vigor de uma planta ou parte da planta como resultado de tratamentos culturais, como irrigação, aplicação de nutrientes, poda ou controle de pragas. Revigoramento, diferente do rejuvenescimento, é uma diminuição na idade fisiológica, ao passo que o rejuvenescimento é a diminuição na idade ontogenética, devido a uma reversão para uma fase mais juvenil (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014a).

Existem inúmeras formas de se obter o revigoramento vegetativo, e uma das principais é pelas podas drásticas ou corte raso (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Assim, de acordo com os mesmos autores, brotações juvenis surgem a partir das gemas dormentes presentes na porção da cepa remanescente após serem dadas as condições para crescimento em função da retirada da dominância apical. As estacas que serão coletadas a partir das partes mais baixas de uma árvore tem capacidade maior de enraizamento e de crescimento (HUSEN; PAL, 2003; ROSIER et al., 2005).

O corte raso, porém, se restringe a espécies que tem habilidade de rebrota e que não apresentem restrição ao corte raso para indução de brotações juvenis, como no caso de árvores matrizes produtoras de sementes ou protegidas do corte por lei (XAVIER; SANTOS, 2002).

Muitas espécies de árvores, como as coníferas, produzem pouco ou nenhum rebrote e por isso, é difícil a obtenção de brotos a partir de árvores adultas (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014b). Segundo esses mesmos autores, uma abordagem alternativa com estas espécies é utilizar plantas matrizes juvenis e podar continuamente as mudas e suas brotações para manter o vigor fisiológico. Esse procedimento é o que vem sendo adotado em jardins clonais, nos seus diferentes sistemas de manejo das cepas, em que estas são mantidas baixas, buscando ter produção de brotações juvenis aptas à formação de propágulos com bom potencial de enraizamento (XAVIER; WENDLING;

SILVA, 2013).

O minijardim clonal e seminal pode ser implantado em diferentes sistemas de recipientes, que variam desde vasos de polipropilenos de diferentes volumes, em caixas de fibra de vidro com variadas formas e dimensões (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002). O estabelecimento de minijardins permite uma série de vantagens como: melhor controle nutricional e fitossanitário (ALFENAS et al., 2009), redução de custos com transporte de pessoal e material a ser propagado (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002), maior produção por área, em menor tempo, quando comparado à estaquia convencional (ASSIS, 1997).

3.3 DESINFESTAÇÃO

A fase de estabelecimento de explantes *in vitro* é sempre uma etapa complexa na propagação *in vitro* de espécies arbóreas, em razão dos altos níveis de contaminação dos tecidos, inclusive por bactérias endógenas, as quais são difíceis de ser eliminadas (NIEDZ; BAUSHER, 2002; WATT et al., 2003). A desinfestação é realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar (ALFENAS, 2009).

Portanto, a dificuldade maior nessa etapa reside em eliminar os microrganismos do tecido vegetal sem danificar o mesmo. O ambiente *in vitro* possui condições ideais para o desenvolvimento de fungos e bactérias.

O explante é um fator crítico para descontaminação, principalmente se for utilizado materiais de plantas a partir de fontes *ex vitro* (SILVA et al., 2015). E recomendada a aplicação de fungicidas e bactericidas na fonte *ex vitro* antes do dia de coleta dos explantes.

O estabelecimento de uma cultura *in vitro* requer a remoção de contaminantes fúngicos e bacterianos. Os métodos químicos utilizados incluem antibióticos, fungicidas, álcoois, cloreto de mercúrio, e biocidas oxidantes, tais como: compostos de halogéneo (cloro, bromo e iodo) e peróxido de hidrogénio (NIEDZ; BAUSHER, 2002).

No laboratório de cultura de tecidos, o procedimento de assepsia começa

com a limpeza da câmara de fluxo laminar com álcool 70%. Em seguida, a imersão em álcool 95%, o bisturi e as pinças que forem utilizados em processo de excisão devem ser flambados. As vidrarias devem ser esterilizadas em autoclave por 20 minutos, a 121 °C e em pressão de uma atmosfera (CID, 2014).

Para a descontaminação dos explantes, o agente descontaminante deve eliminar microrganismos e, ao mesmo tempo, não afetar negativamente o desenvolvimento do material. O hipoclorito de sódio tem sido amplamente utilizado na descontaminação de superfície dos explantes, e tem mostrado uma eficiência elevada no combate à bactérias e fungos (EMMANUEL et al., 2004). A atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio é atribuída principalmente ao ácido hipocloroso (HOCl), de baixo peso molecular que permite a penetração na parede celular do microrganismo (LEN et al., 2002).

O método usado depende da espécie estudada, do tipo de explante, de fitotoxicidade, tipo do contaminante(s), e custo (NIEDZ; BAUSHER, 2002). Mesmo tomando todas as providências de uma assepsia rotineira, pode não ser possível controlar completamente a contaminação por esta ter uma base endógena (CID, 2014).

3.4 CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

A cultura de tecidos consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo apropriado e ambiente asséptico. A aplicação dessa técnica está apoiada na teoria da totipotência, caracterizada como sendo a capacidade de uma célula vegetal, viva, nucleada, com sistema laminar intacto e já diferenciada, ser induzida a voltar ao estado meristemático, podendo redefinir seu padrão de diferenciação celular, podendo desenvolver novos órgãos e mesmo indivíduos inteiros (TERMIGNONI, 2005).

A utilização da técnica da cultura de tecidos vegetais oferece uma alternativa para produzir plantas de qualidade em escala comercial uniforme, a partir da seleção de um genótipo. Essa técnica tornou-se importante para a produção de mudas saudáveis e bem desenvolvidas, tornando-se um elemento essencial para o sucesso de novas culturas.

Entre as várias técnicas de cultura de tecidos, relacionam-se a micropropagação, a cultura de embriões, a polinização *in vitro*, a cultura de protoplastos e a microenxertia (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A micropropagação pode ocorrer por meio da organogênese direta, quando as células originais do explante iniciam mitoses dentro de um padrão de divisão que estabelece a formação do órgão e/ou do indivíduo; ou indireta, quando se inicia a formação de um calo e, a partir das células do calo, há a formação de um indivíduo ou partes dele (TERMIGNONI, 2005).

Os resultados obtidos durante todo o processo de propagação *in vitro* são diretamente influenciados pela especificidade das espécies e dos clones quanto ao meio de cultura, aos reguladores de crescimento e às condições ambientais, controlados por fatores genéticos (GAHAN; GEORGE, 2008).

Com o objetivo de formar uma planta completa, o desenvolvimento da propagação *in vitro* é constituído de quatro fases: i) seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura nas condições *in vitro*; ii) multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio de cultura adequado à propagação; iii) enraizamento dos propágulos vegetativos obtidos no estágio anterior; e iv) aclimatização das plantas obtidas na condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). A necessidade e a duração de cada fase dependem da espécie e do objetivo a ser atingido.

3.4.1 Micropropagação em espécies florestais

A micropropagação tem sido utilizada na área florestal para preservação de germoplasma, limpeza clonal, rápida multiplicação em espaço reduzido, rejuvenescimento, produção de mudas selecionadas (ERIG; SCHUCH, 2005), aceleração dos programas de melhoramento, obtenção de sementes sintéticas e fusão de protoplastos (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Além disso, possibilita a formação e manutenção de microjardins clonais, a partir de clones rejuvenescidos, permitindo a propagação de genótipos de interesse (OLIVEIRA et al., 2016).

A propagação *in vitro* é uma importante ferramenta para trabalhar com espécies florestais que possuem baixa produção de semente, baixa germinação, recalcitrância e crescimento lento, características que tornam os processos de regeneração difíceis e lentos (GARCÍA; SÁNCHEZ, 2016).

Muitas empresas florestais utilizam a propagação *in vitro* para produção massal de genótipos selecionados através de sucessivas gerações (NAVROSKI; REINIGER, 2015). No gênero *Eucalyptus* a técnica é amplamente disseminada, iniciou-se nos anos 60, obtendo-se vários protocolos e otimização de protocolos completos de organogênese de plantas. Desde então, culturas assépticas *in vitro* de *Eucalyptus* foram estabelecidas a partir de diferentes tipos de explantes (sementes, plântulas, meristemas e flores), com origem juvenil ou adulta (LE ROUX; VAN STADEN, 1991).

Para *Eucalyptus*, a propagação *in vitro* mediante a proliferação de gemas axilares tem sido a mais utilizada, sendo mais simples do que os sistemas de propagação *in vitro* por embriogênese somática e organogênese, por se basear na proliferação de gemas pré-formadas (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A micropropagação também vem ganhando espaço na produção de mudas de coníferas, onde as duas principais técnicas utilizadas são a embriogênese somática e a organogênese (CÉZAR et al., 2015). Esses mesmos autores estabeleceram um protocolo de organogênese direta para *Pinus taeda*, onde ápices caulinares de mudas foram cultivados em meio WV5 (COKE, 1996) suplementado com BAP e ANA (ácido naftaleno acético), e o enraizamento foi induzido em diferentes meios de cultura também suplementado com BAP e ANA. O maior percentual de segmentos nodais com brotos e o maior número médio de brotos por explante foram obtidos em meio de cultura contendo BAP (2,5 mM); e a melhor taxa de enraizamento foi obtida quando explantes foram inoculadas em ágar-água com ANA (2,68 mM) e BAP (0,44 mM).

Além disso, a técnica vem ganhando espaço também em outras espécies lenhosas, como o estabelecimento da mangabeira via organogênese direta (SOARES et al., 2007). Segundo estes autores, para a obtenção de brotações, segmentos caulinares com até duas gemas laterais foram inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), suplementado com diferentes concentrações de BAP, e para o enraizamento o meio foi suplementado com

diferentes concentrações de ANA ou AIB. As concentrações de 5,0 mg L^{-1} e 3,0 mg L^{-1} de BAP foram as mais eficientes na indução de brotações e gemas, respectivamente. O ANA não se mostrou eficiente nas concentrações testadas, no enraizamento *in vitro* de brotações de mangabeira. Sendo que na presença de 3,0 mg L^{-1} de AIB, 20% das brotações enraizaram.

Na propagação *in vitro* de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., segmentos cotiledonares e nodais de plântulas emergidas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP, TDZ (thidiazuron) ou CIN (cinetina) para induzir a organogênese de brotos adventícios (GUTIÉRREZ et al., 2011). Na fase de enraizamento foram testadas diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) e de carvão ativado. Nos segmentos nodais houve maior capacidade organogênica do que nos segmentos cotiledonares. O maior número de brotos foi obtido com TDZ (1,0 mg L^{-1}) e BAP (1,5 mg L^{-1}), respectivamente. A presença de AIB (2,0 mg L^{-1}) com carvão ativado (2,0 g L^{-1}) promoveu a maior porcentagem de enraizamento e maior número de raízes adventícias.

Outros protocolos de organogênese direta também já foram estabelecidos, como para *Jatropha curcas* L. (PEQUEÑO-GRANADO et al., 2015), *Azadirachta indica* A. Juss. (HOULLOU et al., 2015), para o gênero *Genipa* (SA et al., 2016), e também protocolo de embriogênese somática *in vitro* de *Azadirachta indica* (ARTIGAS; SILVA, 2015).

Uma das grandes limitações da propagação *in vitro* em espécies florestais tem sido o enraizamento de partes aéreas. São inúmeros os fatores internos, externos e interações envolvidas no processo. O explante merece uma grande atenção, pois tanto fatores relacionados à padrões genéticos da planta-matriz quanto ao seu estado fisiológico, influenciam do início ao fim do procedimento (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

As características do meio de cultura e as condições ambientais *in vitro* devem variar de modo a assemelhar-se com as condições *ex vitro*. Além da composição química do meio, é fundamental o controle dos fatores físicos, principalmente pH, luminosidade e temperatura. A luz é fundamental para os processos fotossintéticos, os fatores fotomorfogênicos e o fototropismo. A temperatura das salas de crescimento varia entre 23 e 27 ºC, visto que

geralmente estão acondicionadas diferentes espécies vegetais na mesma sala de crescimento (CID, 2014). Porém para espécies tropicais, essa temperatura pode ser maior. O pH deve ficar entre 5,6-5,8, valores predominantes no citoplasma das células vegetais. Um valor de pH baixo conduz à competição dos íons H^+ com os nutrientes catiônicos (NH^{4+}, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+} e Zn^{2+}) pelas células dos tecidos radiculares e, em valores mais elevados de pH, diminui a absorção de nutrientes aniônicos como o NO^{3-}, $H_2PO_4^{2-}$, Cl^-, e MoO_4^{2-} (TORRES; CALDAS, 1990).

Outro fator importante nas espécies lenhosas são a produção de metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos. Portanto, para facilitar o crescimento ou promover a organogênese de uma ampla variedade de espécies, tem sido incorporado ao meio nutritivo o carvão ativado. Seu efeito é atribuído não só para absorção de substâncias inibidoras liberadas pelo tecido, mas também pelas liberadas pelo meio (5-hidroximetilfurfural), após sua passagem pela autoclavagem (CID, 2014).

Os maiores obstáculos ao conhecimento adequado dos fenômenos envolvidos no processo de organogênese residem na dificuldade de isolar e caracterizar os fatores que controlam estes fenômenos, em virtude da sua complexidade e da grande interação existente entre eles (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

4. METODOLOGIA

4.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Produção Vegetal, no município de Alegre, e no Viveiro Experimental localizado na área experimental do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, no município de Jerônimo Monteiro. Todos pertencentes no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAE-UFES).

As mudas utilizadas para o estabelecimento do minijardim seminal foram provenientes da germinação de sementes da espécie *Lecythis pisonis* coletadas de matrizes existentes na região Norte do Espírito Santo, no município de Linhares. Tais sementes foram germinadas em 2014 no Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, no município de Jerônimo Monteiro e posteriormente conduzidas por dois anos no Viveiro Florestal do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, no município de Alegre.

4.2 MINIJARDIM SEMINAL

As mudas de sapucaia com dois anos de idade foram transplantadas para vasos de polietileno nas dimensões 30x26 cm, contendo uma mistura de terra de sobsolo e substrato comercial Plantmax Florestal® (2:1). O substrato comercial é constituído de 60% de casca de pinus, 15% de vermiculita granulometria “fina”, 15% granulometria “superfina” e 10% de húmus. Também foram acrescentados na mistura 2,5 Kg m^{-3} de superfosfato simples.

Após transplantadas, foi feito a quebra apical das mudas na altura de 15 cm acima do coleto, visando a quebra da dominância apical e estimulo da ocorrência de brotações laterais sem cessar o processo de fotossíntese. Obtendo-se as minicepas do minijardim, que permaneceram na casa de vegetação durante toda a experimentação, fornecendo os explantes para o estabelecimento *in vitro*.

O manejo do minijardim seminal foi feito com irrigações de gotejamento diárias (5 vezes ao dia por 5 minutos) e fertilizações com macro e micronutrientes, visando manter a turgescência e o *status* nutricional adequado para produção de material vegetativo.

As minicepas foram adubadas quinzenalmente aplicando-se 50 mL de solução nutritiva por minicepa, com 200 g de úreia e 150 g de cloreto de potássio por m^3 de substrato (GONÇALVES et al., 2005). Após um ano de produção, foram feitas duas aplicações de NPK 4-14-8, 10 g por vaso (recomendação do fabricante) em um intervalo de 90 dias. Também foram aplicados, com um borrifador manual, os fungicidas Dithane® (2 g L^{-1}) e Orthocide® (2,4 g L^{-1}) e o bactericida Serenade® (20 mL L^{-1}), quinzenalmente e intercalando os produtos, afim de manter a sanidade do material vegetativo. Para controlar os ataques de cochonilhas e pulgões, foi feito a catação manual, seguida da aplicação de uma solução de sabão neutro a 5%.

Foram feitas coletas mensais de explantes, com duas gemas e aproximadamente 3 cm de comprimento (Figura 1), os quais foram contabilizados, para a análise de regressão da produtividade média mensal por minicepa e sua correlação com a temperatura média mensal da região de estudo (Figura 2). Foram observados os períodos de desfolha e queda de produção, e as pragas existentes no minijardim durante o período de 1 ano.

Figura 1 – A: formação da minicepa; B: minicepa em período produtivo; C: brotação retirada da minicepa e identificação da polaridade por meio da marcação dos explantes; e D: explante com duas gemas e 3 cm de comprimento. Barra: 1,0 cm.

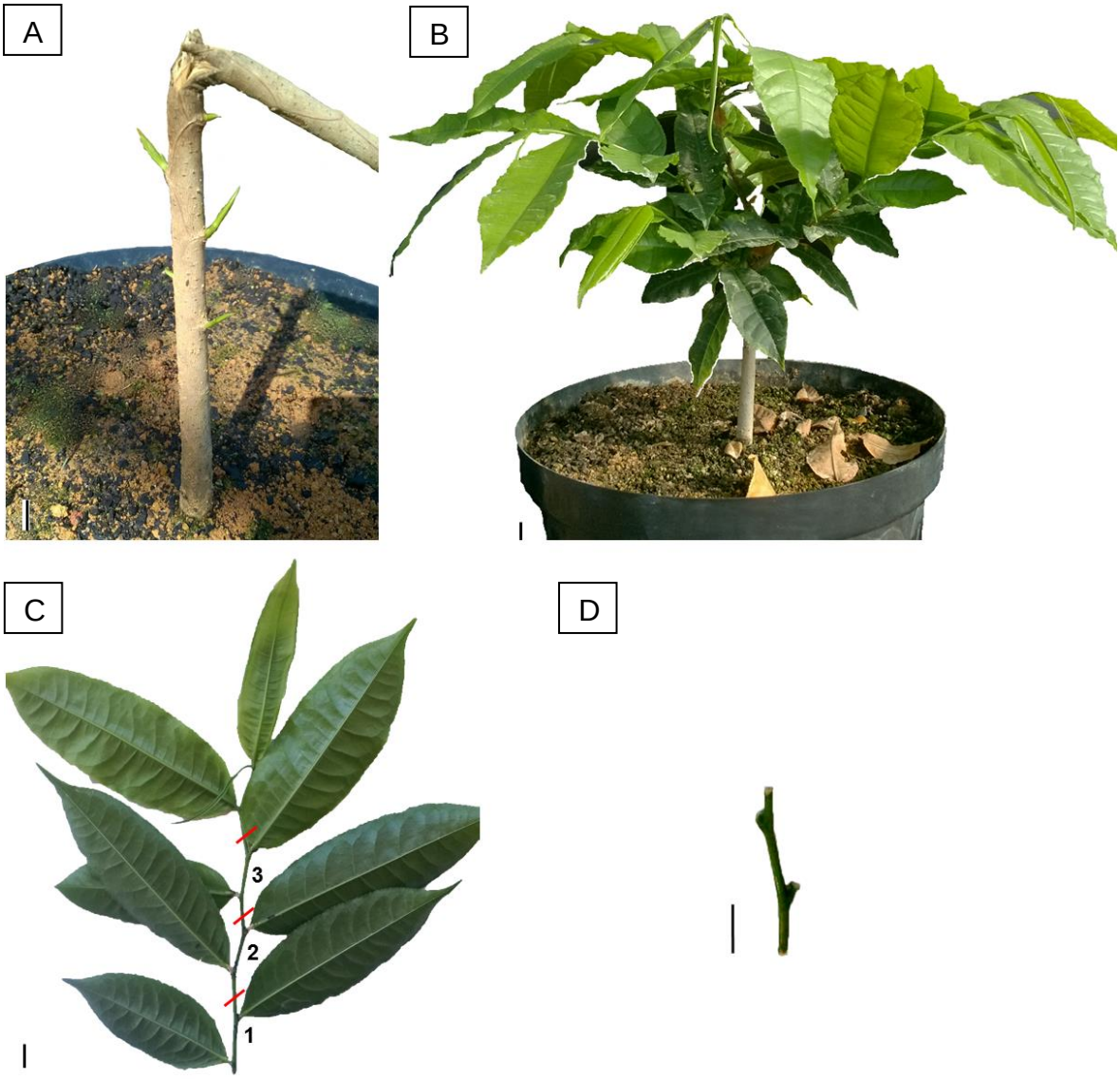
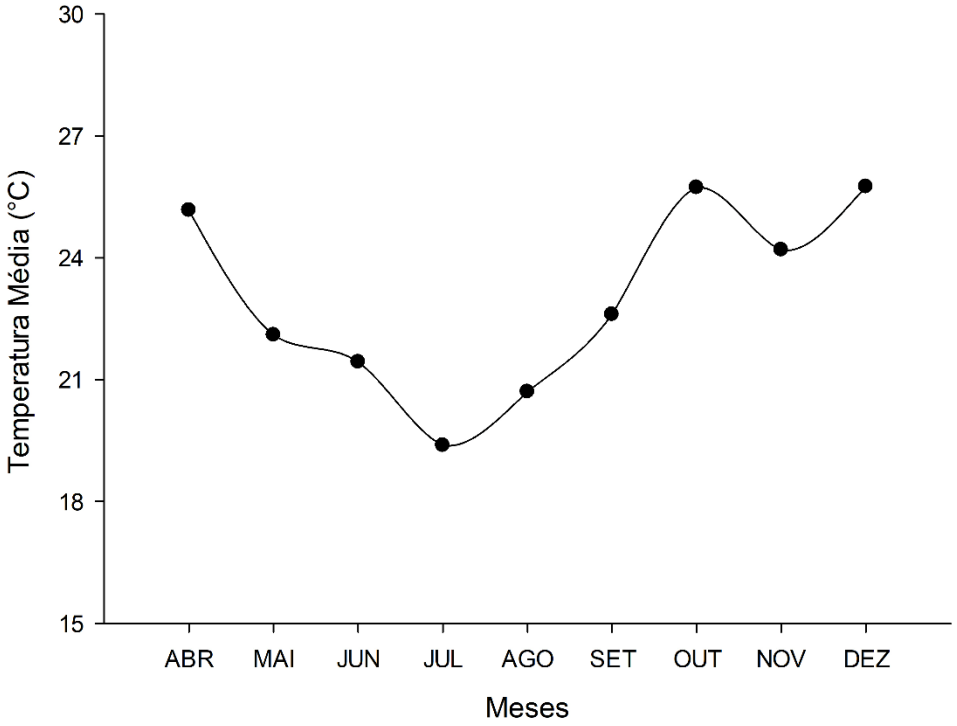


Figura 2 – Temperaturas mensais média no período de coletas de explantes, coletadas na estação meteorológica Alegre – A617, em Rive.



Fonte: INMET, 2018.

4.3 DESINFESTAÇÃO

O material vegetativo coletado no minijardim seminal em Jerônimo Monteiro – ES foi conduzido em sacolas plásticas fechadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Produção Vegetal, em Alegre - ES. Na câmara de fluxo laminar foram excisados os segmentos caulinares, e posteriormente, seguidos para desinfestação.

Para a definição do protocolo de desinfestação dos segmentos caulinares de *L. pisonis,* foram feitos três experimentos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinco explantes cada.

No primeiro, foram testadas as concentrações (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 %) e o tempo de imersão (5; 10; 15 e 20 minutos) de hipoclorito de sódio (NaOCl) ativo (Tabela 1).

Tabela 1 – Disposição dos tratamentos com diferentes concentrações e tempo de exposição no NaOCl

Tratamentos	**NaOCl**	
	Concentrações (%)	Tempos (Minutos)
T1	1	5
T2		10
T3		15
T4		20
T5	1,5	5
T6		10
T7		15
T8		20
T9	2	5
T10		10
T11		15
T12		20
T13	2,5	5
T14		10
T15		15
T16		20
T17	3,0	5
T18		10
T19		15
T20		20

O segundo experimento conteve nove tratamentos, e foram analisadas concentrações de NaOCl (0; 3 e 5%) e de amoxicilina® (0; 500 e 1000 mg L^{-1}) (Tabela 2).

Tabela 2 – Disposição dos tratamentos com diferentes concentrações de NaOCl e amoxicilina®

Tratamentos	**NaOCl (%)**	**Amoxicilina® (mg L^{-1})**
T1	0	0
T2	3	0
T3	5	0
T4	0	500
T5	0	1000
T6	3	500
T7	3	1000
T8	5	500
T9	5	1000

O terceiro experimento foi composto por doze tratamentos, analisando concentrações de NaOCl (2,5 e 3 %) e concentrações de amoxicilina® (1000; 2000 e 3000 mg L^{-1}) na desinfestação e no meio de cultura (Tabela 3). Para os dois últimos experimentos, os explantes foram imersos em álcool 70% (um minuto), em NaOCl e amoxicilina® (20 minutos em cada), e tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, após cada solução.

Tabela 3 – Disposição dos tratamentos com diferentes concentrações de NaOCl e amoxicilina® como solução desinfestante e no meio de cultura

Tratamentos	Método	NaOCl (%)	Amoxicilina® (mg L^{-1})
T1	Solução de amoxicilina®	2,5	1000
T2			2000
T3			3000
T4	Solução de amoxicilina®	3	1000
T5			2000
T6			3000
T7	Amoxicilina® no meio de cultura	2,5	1000
T8			2000
T9			3000
T10	Amoxicilina® no meio de cultura	3	1000
T11			2000
T12			3000

Após desinfestação, foi excisado a extremidade inferior dos explantes, a fim de retirar o tecido necrosado, e inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) com carvão ativo (1000,0 mg L^{-1}). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1 com hidróxido de potássio (KOH) e/ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N, o qual foi distribuído nos tubos de ensaio e autoclavados durante 20 minutos à temperatura de 121 ºC e pressão de 1 atm, antes da inoculação.

Os tubos de ensaio foram lacrados com filme de PVC e mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 60 µmol m^{-2} s^{-1}, fotoperíodo de 8/16 horas e temperatura de 27 ± 2 °C. Foram contabilizados as percentagens de contaminação com 21 dias, e no final dos experimentos foram avaliados a frequência e comprimento (com auxílio de um paquímetro digital) das brotações, e a percentagem de explantes que formaram calos na base.

Os dados submetidos a análise de variância. Para o experimento 1, foi

ajustado um modelo de superfície de resposta para cada característica, e para as demais, utilizou-se o teste de agrupamento de médias Scott-knott em nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional Genes (CRUZ, 2016).

4.4 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES

Foram conduzidos dois experimentos de multiplicação, o primeiro, composto por 10 tratamentos, analisando diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN). O segundo composto por 18 tratamentos sendo foi analisado os meios WPM e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com diferentes concentrações de BAP. Ambos em delineamento inteiramente casualizados, com quatro repetições e cinco explantes cada.

Após desinfestados, com o melhor tratamento encontrado nos experimentos de desinfestação, os explantes passaram por um período de estabelecimento no meio de cultura sem regulador de crescimento, e posteriormente, foram transferidos para frascos de vidro (250 mL) contendo 20 mL do meio WPM com polivinilpirrolidona (1000,0 mg L^{-1}) e suplementado com BAP e CIN (Tabela 4).

Tabela 4 – Disposição dos tratamentos com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN)

Tratamentos	BAP (mg L^{-1})	Tratamentos	CIN (mg L^{-1})
1	0	2	0
3	0,25	4	0,25
5	0,5	6	0,5
7	0,75	8	0,75
9	1,0	10	1,0

No segundo experimento, os explantes desinfestados foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) diretamente no meio de tratamento (WPM ou MS) com polivinilpirrolidona (1000,0 mg L^{-1}) e suplementado com BAP (Tabela 5).

Tabela 5 – Disposição dos tratamentos com diferentes meios de cultura e concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP)

Tratamentos	Meio	BAP (mg L^{-1})
1		0
2		0,25
3		0,5
4		1,0
5	WPM	2,0
6		4,0
7		8,0
8		16,0
9		32,0
1		0
2		0,25
3		0,5
4		1,0
5	MS	2,0
6		4,0
7		8,0
8		16,0
9		32,0

Os explantes foram inoculados verticalmente nos frascos e tubos, com o pH do meio de cultivo ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado a 121 ºC e 1,0 atm, por 20 minutos. Foram tampados, lacrados com filme de PVC e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 27 ± 2 ºC, com irradiância de fótons de 60 µmol m^{-2} s^{-1}.

Foram inoculados segmentos caulinares com duas gemas iniciais, e aos 50 dias de cultivo foram analisados:

- Número de gemas finais (NG);
- Frequência relativa de explantes que formaram brotações (%) (FB);

$$\frac{nº\ de\ explantes\ que\ formaram\ brotações\ por\ repetição}{Total\ de\ explante\ por\ repetição} \times 100$$

- Número de brotações por explante (NB);
- Comprimento de brotações por explante (obtido com auxílio de um

paquímetro digital – cm) (CP);

- Taxa de multiplicação - segundo metodologia descrita por Erig e Schuch (2005) (TM);

$$\frac{nº\ de\ gemas\ finais\ por\ explante}{nº\ de\ gemas\ iniciais\ por\ explante}$$

- Percentagem de explantes que formaram calos na base (PC); e
- Mortalidade dos explantes (%) (Mt).

Os dados interpretados por análise de variância, e teste de Scott-knott e Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional Genes (CRUZ, 2016).

4.5 ENRAIZAMENTO

Os segmentos caulinares foram desinfestados e inoculados em meio WPM, sem regulador de crescimento, permanecendo durante um mês em sala de crescimento para o desenvolvimento de novas brotações. A seguir, essas brotações foram dispostas verticalmente em tubos de ensaio (25x150 mm), contendo 10 mL de meio WPM com polivinilpirrolidona (1000,0 mg L^{-1}) e suplementado com diferentes concentrações ácido indol-3-butírico (0; 1; 2 e 3 mg L^{-1}). O meio teve o pH ajustado para 5,8 ± 0,1.

Depois dos tubos serem tampados e lacrados com filme de PVC, foram transferidos para sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 ºC no escuro por sete dias, e posteriormente, fotoperíodo de 8/16 horas (sete dias). Após esse período, foram acondicionadas em câmara de germinação tipo *Biochemical Oxigen Demand* (BOD) para o estresse térmico a uma temperatura de 40 ± 2 ºC, por um período de 0, 12, 24, 36 e 48 horas. E em seguida, foram transferidos para a sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2 ºC com fotoperíodo de 8/16 horas.

Após 70 dias de cultivo foram analisadas as características:

- Número máximo de raízes (NR);
- Comprimento de raízes (com o auxílio de um paquímetro digital - cm) (CR);

- Percentagem de explantes com a parte aérea morta (PAM);
- Frequência relativa de explantes que formaram raízes (%) (FR);

$$\frac{nº\ de\ explantes\ que\ formaram\ raízes\ por\ repetição}{Total\ de\ explante\ por\ repetição} \times 100$$

- Percentagem de calos (PC);
- Biomassa seca de calos (MSC), separados e acondicionadas em sacos de papel e colocados para secar em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C, até a obtenção da biomassa seca constante.

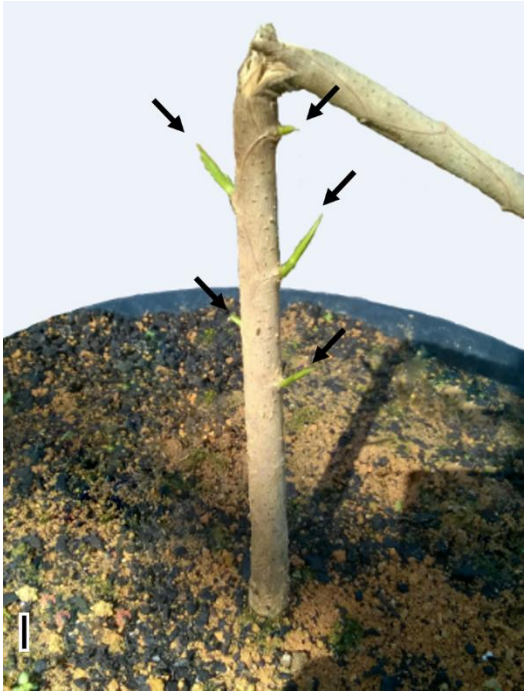
O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 20 tratamentos, três repetições com cinco explantes cada. Foi realizado a análise de variância, e para as características que apresentaram interação significava, a 5% de significância, foi ajustado um modelo para a superfície de resposta, e para as demais, uma análise descritiva dos dados. As análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional Genes (CRUZ, 2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MINIJARDIM SEMINAL

A quebra de dominância apical das mudas foi realizada em agosto de 2016 e, após nove dias, observou-se a presença de brotações nas minicepas (Figura 3). Após trinta dias, foram retiradas a parte aérea remanescente, iniciando as podas. A sobrevivência das minicepas de *Lecythis pisonis* cultivadas no minijardim seminal, durante o período de avaliação do experimento, foi de 100%. O que indica que os métodos de manejo e coleta de material vegetativo foram adequados.

Figura 3 – Formação das minicepas seminais de *Lecythis pisonis*. Setas: brotações com nove dias após quebra apical. Barra: 1,0 cm.

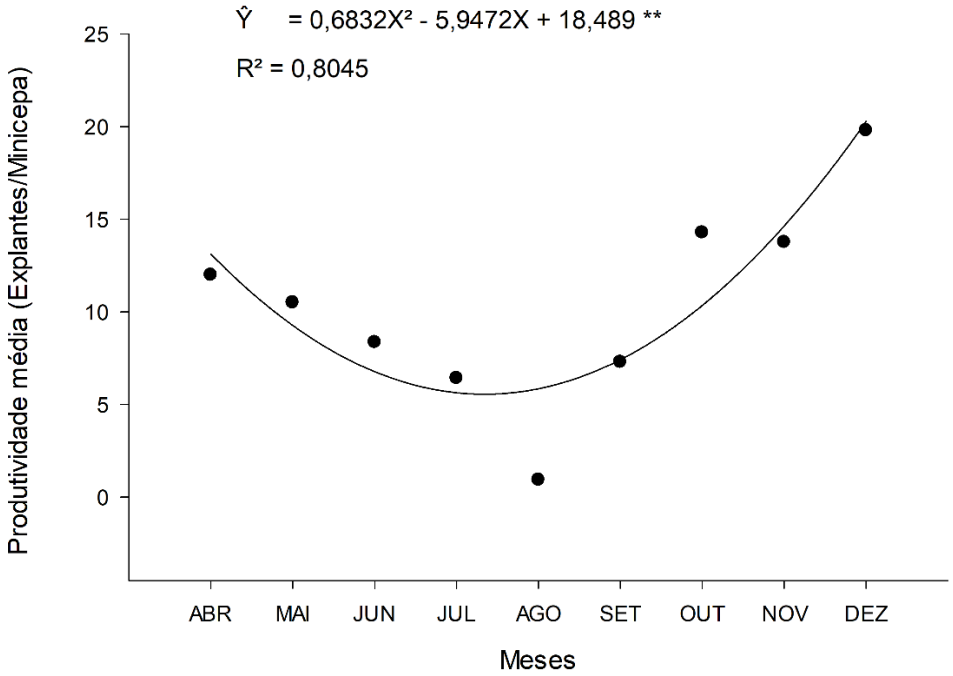


No trabalho realizado por Mantovan et al. (2017) com *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., o início da formação dos brotos também ocorreu em um período de sete a nove dias depois da poda do ápice e obtiveram 100% de sobrevivência das minicepas. Outros trabalhos, com *Cedrela fissilis* Vell. e *Grevillea robusta* A. Cunn., também apresentaram 100% de sobrevivência durante o período de avaliação das minicepas, quando cultivadas em tubetes

(XAVIER et al., 2003; SOUZA JUNIOR; QUOIRIN; WENDLING, 2008).

Pelo ajuste de regressão para a produtividade média por minicepa em função dos meses de coleta. Observou-se que não há exaustão das minicepas com o manejo adotado, porém a produtividade média é diretamente influenciada pela época de coleta (Figura 4).

Figura 4 – Produtividade média das minicepas de *Lecythis pisonis* em função do mês de coleta



**Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de F.

A produtividade das minicepas teve uma correlação positiva de 0,759 com a temperatura mensal média da região do estudo, e uma produtividade média máxima de 19,79 explantes/minicepa em dezembro. A maior produtividade do minijardim ocorreu nas épocas mais quentes do ano, onde as temperaturas altas influenciam positivamente na formação de brotações. Possivelmente por espécie ser de clima tropical, o que explica um metabolismo provavelmente mais acelerado, em decorrência de maiores valores de temperatura e irradiância para esta espécie, permitindo maior alocação de biomassa para as raízes. Essa resposta foi observada por Robakowski et al. (2018) com a espécie *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., conferindo maior eficiência subterrânea para água e nutrientes. Esse comportamento também foi observado em outras espécies,

como *Sapium glandulatum* (L.) Morong. (FERREIRA et al., 2010) e *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. (PIRES et al., 2015).

Além da variável temperatura ter influenciado na redução da produção em agosto, outros fatores também influenciaram negativamente, como a queda das folhas e a incidência de fungo (*Cladosporium* sp.). A sapucaia é uma espécie decídua (LORENZI, 2002), perde suas folhas em uma época do ano, normalmente em períodos mais secos. Neste estudo 58% das minicepas perderam suas folhas de agosto a setembro, diminuindo a produção de brotações (Figura 5).

Figura 5 – Minicepa após perder suas folhas no período de agosto a setembro. Barra: 1,0 cm.

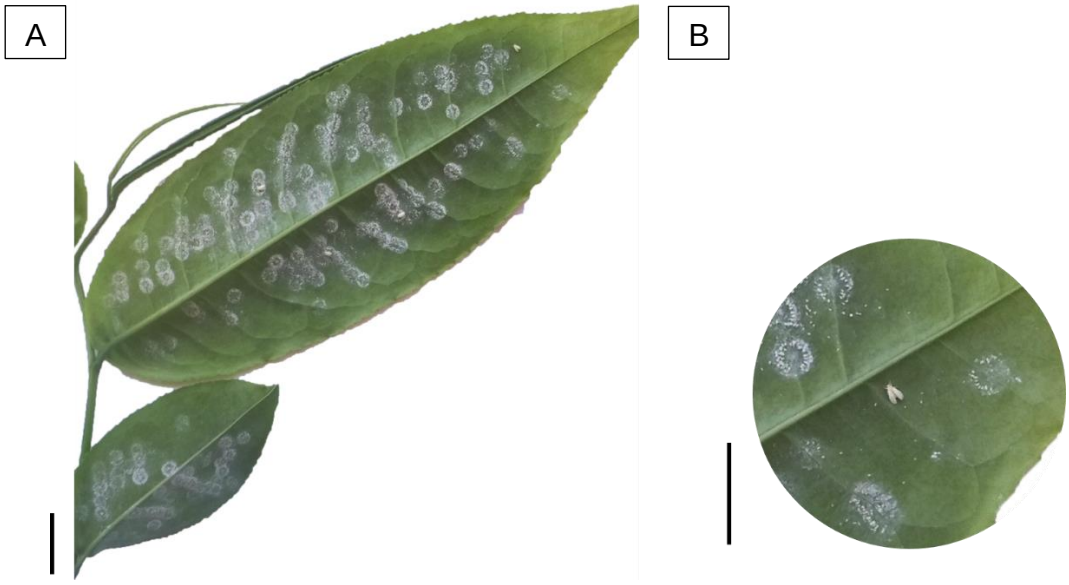
No mesmo período o minijardim foi atacado pelo fungo *Cladosporium* sp., causando manchas foliares nas matrizes (Figura 6). O *Cladosporium* spp. tem uma ampla distribuição ecológica, ocorrendo em todos os tipos de substrato e em uma grande variedade de hospedeiros, sobrevivendo de forma biotrófica ou necrótrofa, ou mesmo em tecido de planta senescente (WALKER et al., 2016). Já foi relatado em várias espécies florestais, como: *Carya illinoinensis* (Wangenh.) K. Koch (WALKER et al., 2016), *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.,

Psidium cattleyanum Sabine, *Erythrina falcata* Benth., *Dodonea viscosa* Jacq., *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (CARMO et al., 2017).

Figura 6 – *Cladosporium* sp. em folhas de sapucaia. A: início da colonização do fungo no limbo foliar; B: manchas foliares; e C: estruturas de reprodução do fungo. Barra: 1,0 cm.

Outra praga ocorrente no minijardim, no período de novembro e dezembro, foi *Aleurothrixus* sp. (Figura 7), fazendo com que diminuísse a produtividade em janeiro. Algumas espécies podem sugar grande quantidade de seiva das plantas, transmitir viroses e substâncias toxicogênicas. Essa praga encontra-se distribuída na maior parte do território brasileiro, sendo as espécies de citros suas principais hospedeiras (RAGA et al., 2011).

Figura 7 – *Aleurothrixus* sp em folhas de sapucaia. A: infestação na parte abaxial da folha; e B: *Aleurothrixus* sp. Barra: 1,0 cm.



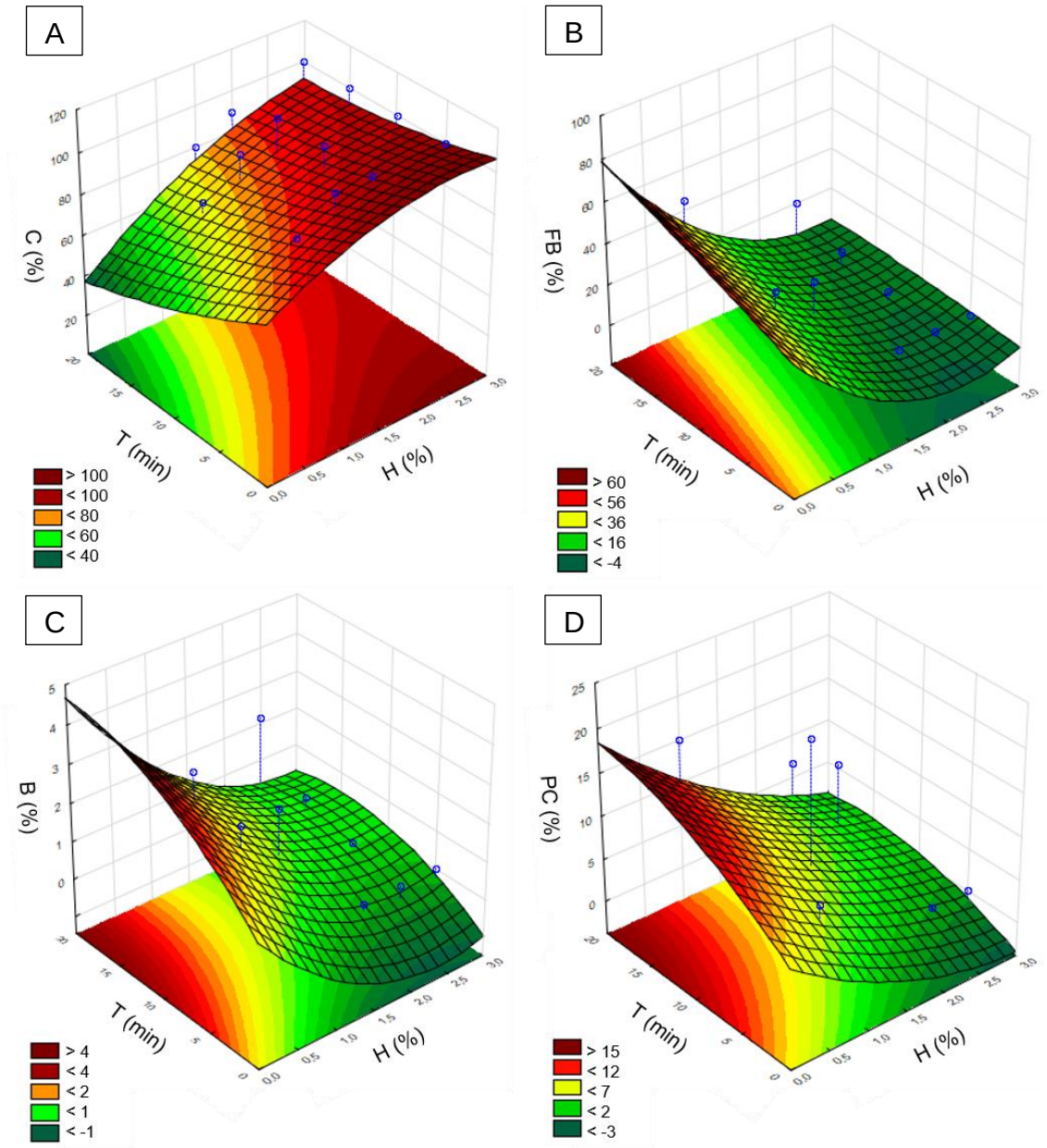
No entanto, mesmo em épocas em que a produção de explantes é baixa, a técnica de minijardim para sapucaia é viável para produção de propágulos, tendo em vista que a produção de sementes ocorre apenas uma vez ao ano de forma irregular e sua germinação é lenta e desuniforme.

5.2 DESINFESTAÇÃO

Como não existe um protocolo de desinfestação para *Lecythis pisonis*, os experimentos foram acompanhados diariamente, para certificação de quantos dias necessitaria para fazer a avaliação final. Portanto, verificou-se que após 21 dias não houve aumento na percentagem de contaminação.

A análise de variância da interação foi significativa para todas as variáveis dos três experimentos. Porém, o primeiro não se mostrou eficiente, com uma contaminação mínima de 68% no tratamento de 1% de hipoclorito de sódio (NaOCl) em 20 minutos de imersão, e máxima de 100% com 3% NaOCl em 5 minutos (Figura 8A).

Figura 8 – Superfície de resposta para a interação das variáveis A: contaminação (C), B: frequência de brotação (FB), C: comprimento das brotações (B) e D: percentagem de calos (PC) com tempo de imersão (T) e concentração de NaOCl (H), em explantes de sapucaia, aos 21 dias. Pontos em azul: dados observados



Sendo:

A) $C=77.16799+10.833H-1.00004T$; $R^2 = 41,3\%$.

B) $FB=22.57249-19.44343H+3.5695H^2+3.6441T-0.01001T^2-2.47483HT+0.49535H^2T$; R2 = 63,2%.

C) $B=-2.23084-0.46886H+0.51738H^2+1.07346T-0.0384T^2-0.42563HT+0.01591HT^2$; R2 = 61,1%.

D) $PC=8.83466-3.91701H+0.23996T$; R2 = 30,8%.

A maioria dos explantes que não contaminaram, emitiram brotações, obtendo uma frequência de brotação de 35,98%, e de comprimento dos brotos de 2,47 cm, nos tratamentos com 1% NaOCl em 20 e 15 minutos (Figura 8 B e C, respectivamente). No entanto, a frequência ainda foi baixa devido à alta taxa de mortalidade dos explantes, decorrente das contaminações.

Quanto a percentagem de calos formados na base dos explantes, teve seu ponto máximo de 9,71% no tratamento com 1% NaOCl em 20 minutos de imersão (Figura 8 D). Pode-se observar que essa variável teve uma relação positiva com o tempo de imersão, pois, à medida que aumenta o tempo de imersão também aumenta a percentagem de calos, em cada concentração. Os calos, em geral, se originam em zonas com injúrias químicas ou físicas (BAJAJ, 1989), e quanto maior o tempo de exposição dos explantes ao NaOCl, maiores são os danos causados ao tecido.

O NaOCl é uma das principais substâncias utilizadas para assepsia do material vegetativo, por apresentar baixo custo e ser de fácil aquisição. Porém, apesar de ter sido eficaz no controle de fungos, não foi eficiente para bactérias, o principal agente contaminante nesse experimento (Figura 9). Tal resultado pode ter sido influenciado pelo pH da solução de hipoclorito de sódio, pois sua atividade biocida aumenta significantemente com a formação do ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl é um ácido fraco e sua formação é fortemente influenciada pelo pH do meio, sendo ótima entre pH 6 e 9 (EMMANUEL et al., 2004). Com o aumento da faixa de pH da solução, mecanismos de defesa das bactérias são ativados, fazendo com que se desenvolvam mesmo em concentrações altas de cloro ativo, diminuindo a eficiência do produto (HIRATA; MANCINI FILHO, 2002). Tal hipótese é corroborada pelos resultados de Brondani et al. (2010) e Golle et al. (2013), estudando *Liquidambar styraciflua* L. e *Eugenia involucrata* DC., respectivamente.

Figura 9 – Tubos com explantes contaminado, após 21 dias em sala de crescimento; setas: contaminação por bactérias. Barra: 1,0 cm.

Na desinfestação de segmentos nodais de *Tectona grandis* Linn. F., o melhor tempo de imersão no NaOCl foi de 20 minutos (FERMINO, NAGAO, SCHERWINSKI-PEREIRA; 2009). O aumento no tempo de imersão no NaOCl, diminui as contaminações por bactérias (GOLLE et al., 2013), mas ainda sugere a necessidade de procedimentos adicionais para a obtenção de cultivos assépticos. Diante de tais resultados, foi introduzido o antibiótico amoxicilina® ao protocolo, fixando o tempo de imersão de 20 minutos em todos tratamentos.

No segundo experimento, os tratamentos em que a concentração de NaOCl e/ou de amoxicilina® eram zero, tiveram altas percentagens de contaminação, permanecendo no mesmo grupo estatístico. Todavia, a combinação das duas soluções, diminuíram significativamente a contaminação, alcançando maiores resultados com 3 e 5% de NaOCl e 1000 mg L^{-1} de amoxicilina® (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores médios de contaminação (C), frequência de brotação (FB), comprimento de brotos (B) e percentagem de calos (PC), sob diferentes concentrações de NaOCl (H) e amoxicilina® (A), em explantes de sapucaia, após 21 dias em sala de crescimento

Tratamentos	H (%)	A (mg L^{-1})	C (%)	FB (%)	B (cm)	PC (%)
T1		0	100,00 d[1]	0,00 b	0,00 c	0,00 b
T2	0	500	100,00 d	0,00 b	0,00 c	0,00 b
T3		1000	100,00 d	0,00 b	0,00 c	0,00 b
T4		0	93,25 d	6,67 b	0,53 c	6,67 b
T5	3	500	46,75 b	33,33 a	3,13 a	6,67 b
T6		1000	33,25 a	33,33 a	2,28 b	6,67 b
T7		0	93,25 d	6,67 b	0,76 c	6,67 b
T8	5	500	70,00 c	30,00 a	1,65 b	26,75 a
T9		1000	26,75 a	46,67 a	3,01 a	26,75 a

[1]Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

As concentrações de H e A também influenciaram na frequência de brotações (FB), no comprimento das brotações (B) e na formação de calos (PC). Os tratamentos sem amoxicilina® tiveram resultados de FB semelhantes ao primeiro experimento, devido à alta contaminação por bactérias. Já para o comprimento de brotos, a amoxicilina® influenciou positivamente no alongamento das brotações, enquanto a percentagem de calos aumentou significativamente nas combinações NaOCl (5%) com amoxicilina® (500 e 1000 mg L^{-1}). A amoxicilina® é um antibiótico derivado da penicilina, um composto muito ativo na promoção de fenômenos controlados por hormônios nas plantas. Quando aplicado em baixas concentrações, a penicilina promove o alongamento do hipocótilo, enquanto altas concentrações resultam em inibição do alongamento, podendo ser tão ativa como as citocininas ou alterando os níveis desse hormônio, causando um aumento nos níveis de clorofila (MUKHERJI; WAREING, 1983). Entre as várias respostas produzidas pela penicilina estão a indução de α-amilase e síntese de ribonuclease, síntese e retenção de cloroplasto, efeitos na morfologia das folhas, circunferência da haste e comprimento do entrenó, formação de giberelina e citocininas endógenas e o aprimoramento do enraizamento (PUROHIT, 1985).

Apesar da amoxicilina® (1000 mg L^{-1}) ter diminuído consideravelmente as

contaminações, ainda não foi 100% eficaz, sendo necessário estudar concentrações superiores. E devido ao fato de ter aumentado o comprimento das brotações, também é interessante investigar melhor o efeito da amoxicilina® no meio de cultura.

No terceiro experimento, o NaOCl (2,5 e 3%) com a amoxicilina® (1000 mg L^{-1}) não foram eficientes na desinfestação. Já as demais concentrações de A diminuíram significativamente a contaminação, pertencendo todos esses, ao mesmo grupo estatístico (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores médios de contaminação (C), frequência de brotação (FR), comprimento de brotos (B) e percentagem de calos (PC), aos 21 dias, sob diferentes doses de hipoclorito de sódio (H) e amoxicilina® (A)

Trat.	Método	H (%)	A (mg L^{-1})	C (%)	FB (%)	B (cm)	PC (%)
T1	Solução	2,5	1000	46,67 b[(1)]	33,33 c	1,58 b	20,00 b
T2			2000	6,67 a	73,33 a	2,13 a	50,00 a
T3			3000	6,67 a	73,33 a	1,84 a	28,33 b
T4		3	1000	40,00 b	15,00 c	1,42 b	6,67 b
T5			2000	13,33 a	53,33 b	1,82 a	26,67 b
T6			3000	0,00 a	90,00 a	2,03 a	30,00 b
T7	No meio	2,5	1000	5,00 a	50,00 b	0,93 c	45,00 a
T8			2000	5,00 a	20,00 c	0,51 c	60,00 a
T9			3000	5,00 a	20,00 c	0,15 c	5,00 b
T10		3	1000	0,00 a	80,00 a	1,22 b	73,33 a
T11			2000	0,00 a	33,33 c	0,81 c	60,00 a
T12			3000	6,67 a	20,00 c	0,50 c	25,00 b

[(1)]Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

As maiores frequências de brotações foram observadas com o uso de NaOCl e amoxicilina®, nas concentrações de 2,5% com 2000 e 3000 mg L^{-1}; 3% com 3000 mg L^{-1} e 3% com 1000 mg L^{-1} no meio de cultura.

No que se refere ao comprimento das brotações, as maiores médias foram no método 1, com amoxicilina® como solução desinfestante. Enquanto nos tratamentos do método 2, no qual se testou amoxicilina® no meio de cultura, verificou-se o desenvolvimento de brotações anormais, com entrenós mais curtos e, na maior parte, com maiores porcentagens de calos na base dos explantes e ao longo de caule e folhas (Figura 10).

Figura 10 - A: brotação dos explantes de sapucaia no método de imersão em solução de amoxicilina® por 20 minutos; B: brotação dos explantes de sapucaia no método utilizando a amoxicilina® no meio de cultura, ambos aos 21 dias em sala de crescimento. Barra: 1,0 cm.

Os antibióticos podem ser utilizados submetendo os explantes a banhos ou adicionados ao meio de cultura, porém também podem possuir ação bacteriostática, e não bactericida, serem fitotóxicos e favorecerem alterações nas respostas morfogenéticas (DONATO et al. 2005; PALÚ et al., 2011). Portanto, o presente estudo comprova a influência da amoxicilina® no comprimento das brotações, em que, 20 minutos em contato com o material vegetativo é suficiente para controlar a contaminação por bactérias e agir positivamente no alongamento das brotações. Já a amoxicilina® no meio de cultura por 21 dias, torna-se tóxica aos explantes, resultando em brotações anormais, não devendo ser recomendada a sua aplicação no meio.

São diversos os antibióticos utilizados para o controle de bactérias, porém são escassos os trabalhos realizados com amoxicilina® em plantas. A amoxicilina® (D-(-)-alfa-amino-p-hidroxibenzil penicilina) é uma penicilina semissintética de amplo espectro bactericida sobre microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Seu mecanismo de ação está baseado na inibição da biossíntese do mucopeptídeo da parede celular das bactérias (ANVISA, 2018).

Os antibióticos clorofenicol, ácido nalidícico, tetracicliona e norfloxacina,

são fitotóxicos para gemas apicais de figueira (PALÚ et al., 2011). Outro antibiótico que também é fitóxico, quando usado no meio de cultura, é o rifampicina, interferindo negativamente na multiplicação do material vegetativo (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003; LIMA; MORAES, 2006).

Logo, o melhor tratamento para desinfestação de explantes de *Lecythis pisonis* foi o uso de solução de imersão em NaOCl (3%), seguido da imersão em amoxicilina® (3000 mg L^{-1}), ambos imersos por 20 minutos, com 0% de contaminação, 90% de frequência de brotação, 2,03 cm de comprimento de brotação e 30% de calos.

5.3 INDUÇÃO DE BROTAÇÕES

No primeiro experimento, a análise de variância foi significativa apenas para as variáveis frequência de brotação (%), taxa de multiplicação e percentagem de calos (%) sob diferentes concentrações e tipo de citocininas (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios de frequência de brotação de sapucaia (FR), taxa de multiplicação (TM) e percentagem de calos (PC), sob diferentes concentrações de BAP e CIN, após 50 dias em sala de crescimento

Trat.	Citocininas	Concentrações (mg L^{-1})	FB (%)	TM	PC (%)
T1	BAP	0,00	53,33 b[(1)]	1,30 b	53,25 a
T2		0,25	86,67 a	2,57 a	26,67 b
T3		0,50	40,00 b	1,00 b	20,00 b
T4		0,75	66,67 a	2,20 a	45,00 a
T5		1,00	73,25 a	1,80 a	15,00 b
T6	CIN	0,00	53,33 b	1,30 b	53,33 a
T7		0,25	55,33 b	1,90 a	15,33 b
T8		0,50	53,25 b	1,57 b	13,25 b
T9		0,75	50,00 b	1,20 b	0,00 b
T10		1,00	51,50 b	1,51 b	22,50 b

[(1)]Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-knott.

O BAP teve destaque para a indução de brotações em todas as variáveis que tiveram diferenças significativas, proporcionando os melhores resultados, comparado com a CIN. O BAP (0,25; 0,75 e 1 mg L^{-1}) apresentaram as maiores

frequências de brotações. Já para a taxa de multiplicação, além desses tratamentos, o uso de CIN (0,25 mg L^{-1}) também ficou em evidência. No entanto, os resultados obtidos nesse experimento ainda são baixos quando se pensa em propagação *in vitro*, que preconiza propagação rápida e em massa.

Outros autores, observaram as melhores taxas de multiplicação com o uso do BAP em espécies florestais, como no trabalho de Moura et al. (2012) com a espécie *Bowdichia virgilioides* Kunth. na concentração de 0,3 mg L^{-1}, Souza et al. (2011) para a espécie *Myrcianthes pungens* (Berg) Legr. com 1 mgL^{-1}; Santos et al. (2006) e Gutiérrez et al. (2013) para as espécies *Caryocar brasiliense* Camb. e *Tapirira guianensis* Aubl. com 1 mg L^{-1}; e Soares et al. (2007) para a espécie *Hancornia speciosa* Gomes com 1 mg L^{-1} ou 2 mg L^{-1}. Quanto a cinetina (CIN), os resultados foram inferiores comparados com o BAP, corroborando com Tallón, Porras e Pérez-tornero (2012) com a espécie *Citrus* spp., Mantovani et al. (2013) com a espécie *Ginkgo biloba* L. e García e Sánchez (2015) com a espécie *Aniba perutilis* Hemsl..

A eficiência do BAP deve-se à capacidade dos tecidos vegetais metabolizá-lo de forma mais eficiente do que outros reguladores sintéticos, ou à capacidade do produto para promover a produção de hormônios naturais na planta (ABBASI et al., 2013). Além da influência do BAP sobre os resultados de cada espécie, também há outros fatores, como a idade das plantas matrizes, uma vez que, as mudas utilizadas nesse trabalho já tinham 2,5 anos e quanto mais jovem as mudas, maior é a capacidade de seus tecidos de se diferenciar e multiplicar. E ainda, o meio de cultura, pois cada meio foi formulado para atender as exigências específicas à espécie em estudo. Por isso, testou-se, não só o regulador de crescimento, como também o meio de cultura.

No segundo experimento de indução de brotações, os meios WPM e MS, apresentaram diferenças significativas em todas as variáveis estudadas, exceto para o número de brotos no meio WPM (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores médios de número de brotos (NB), número de gemas (NG), comprimento dos brotos (CP), frequência de brotação (FR), taxa de multiplicação (TM), percentagem de calos (PC) e percentagem de mortalidade (Mt), em função do tipo de meio e de concentrações de BAP, em explantes de sapucaia, após 50 dias em sala de crescimento

Meio	BAP (mg L^{-1})	NB	NG	CP (cm)	FB (%)	TM	PC (%)	Mt (%)
WPM	0	0,73 a[1]	3,80 ab	1,27 ab	53,33 bc	1,30 bc	40,00 def	20,00 a
	0,25	0,87 a	5,13 a	1,69 a	86,67 a	2,62 a	53,33 cde	23,33 ab
	0,5	0,53 a	2,33 bc	0,57 bc	50,00 bc	1,20 bc	26,67 ef	25,00 ab
	1	0,78 a	3,60 ab	0,99 abc	71,00 ab	1,90 ab	20,00 f	23,33 ab
	2	0,50 a	2,20 bc	0,39 c	50,00 bc	1,10 bc	55,00 cd	40,00 abc
	4	0,45 a	1,00 c	0,16 c	45,00 c	0,50 c	66,67 bc	46,67 bc
	8	0,47 a	1,47 c	0,27 c	20,00 d	0,73 c	93,33 ab	50,00 c
	16	0,55 a	1,87 bc	0,26 c	55,56 bc	0,58 c	100,00 a	42,22 abc
	32	0,53 a	1,00 c	0,15 c	66,67 ab	0,50 c	86,67 ab	46,67 bc
MS	0	0,85 bc	5,60 bc	1,93 b	86,67 ab	3,03 bc	20,00 d	0,00 a
	0,25	1,15 ab	8,30 a	3,20 a	100,00 a	4,15 a	53,33 abc	0,00 a
	0,5	1,00 ab	5,33 bc	2,37 ab	100,00 a	2,67 c	46,67 bc	0,00 a
	1	0,90 abc	7,15 ab	2,19 b	80,00 ab	3,53 ab	20,00 d	0,00 a
	2	1,00 ab	7,00 ab	2,24 b	100,00 a	3,50 abc	53,33 abc	0,00 a
	4	1,30 a	7,80 a	1,91 b	100,00 a	4,27 a	66,67 ab	0,00 a
	8	0,53 cd	3,13 d	0,58 cd	26,67 c	1,20 d	46,67 bc	40,00 b
	16	0,93 abc	4,87 cd	1,03 c	73,33 b	1,73 d	75,00 a	26,67 b
	32	0,15 d	0,65 e	0,03 d	20,00 c	0,33 e	33,33 cd	70,00 c

[1]Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O número de brotos no meio WPM não diferenciaram entre si, as maiores diferenças ocorreram no número de gemas, em que, os melhores resultados foram de 5,13; 3,80 e 3,60 com o uso de BAP (0,25; 1,0 e 0 mg L^{-1}, respectivamente). No meio MS, embora o número de brotações tenha sido baixo, as médias do número de gemas foram notavelmente superiores, 8,30; 7,80; 7,15 e 7,0 com o uso de BAP nas concentrações de 0,25, 4,0, 1,0 e 2,0 mg L^{-1}, respectivamente (Tabela 9).

O sucesso da cultura de tecidos vegetais como meio de propagação de plantas é grandemente influenciado pela natureza do meio de cultura utilizado. Apesar do desenvolvimento dos meios de cultura terem envolvido um grande número de curvas dose-resposta para os vários minerais essenciais, cada

espécie vegetal tem sua própria composição elementar, respondendo diferente a cada composição (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

No meio MS, o comprimento das brotações foi superior (3,2 e 2,37 cm) nas concentrações 0,25 e 0,5 mg L^{-1} de BAP. Já para a frequência de brotação, a maioria dos tratamentos foram superiores a 80%, chegando a 100%, não diferindo entre si. E as maiores taxas de multiplicação (4,15, 4,27,3,53 e 3,5) foram com o uso de BAP a 0,25; 4; 1 e 2 mg L^{-1}, respectivamente (Tabela 9). Possivelmente, pelo nitrogênio presente no meio MS, ser um dos principais nutrientes com o qual as citocininas interagem, indicando uma interação positiva das citocininas na regulação das enzimas envolvidas com o metabolismo assimilatório desse elemento, ativando a enzima nitrato redutase e promovendo maior multiplicação celular (SAMUELSON et al., 1995).

As menores concentrações de BAP foram visivelmente melhores, em comparação as demais concentrações avaliadas. O comprimento de brotos no meio WPM, teve as maiores médias com 0,0, 0,25 e 1 mg L^{-1} de BAP (1,27, 1,69 e 0,99 cm, respectivamente). Para as variáveis frequência de brotação e taxa de multiplicação, as concentrações 0,25 e 1 mg L^{-1} diferiram das demais, obtendo 86,67 e 71% de brotações e 2,62 e 1,9 de multiplicação, respectivamente (Tabela 9). As citocininas atuam em baixa concentração e, muitas vezes, as citocininas exógenas são convertidas em várias formas de metabólitos como mecanismo regulador para manter a homeostase da citocinina. Esses metabólitos podem ser menos ativos, formas de translocação e armazenamento que estão prontamente disponíveis em caso de esgotamento do “pool” de citocininas livres, ou dos produtos de desintoxicação que estão na maior parte indisponíveis para o tecido da planta, regulando vários processos fisiológicos e de desenvolvimento (AREMU et al., 2012).

Na maioria das variáveis, nas concentrações acima de 8 mg L^{-1} de BAP, os resultados foram inferiores comparado com os demais, em ambos os meios de cultura (Tabela 9), sugerindo um grau de toxicidade em concentrações superiores a essa.

Cada espécie irá responder diferente as concentrações de citocininas em cada meio. No meio MS, para *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. a melhor concentração de BAP foi de 0,56 mg L^{-1} (ROCHA et al., 2007), para *Acacia mearnsii* De Wild. (BORGES JÚNIOR; SOBORSA; MARTINS-CODER, 2004) e

para *Genipa americana* L., foi 1 mg L^{-1} (SA et al., 2016). Os hormônios vegetais raramente atuam isoladamente, a resposta final pode estar associada a dois ou mais hormônios, ou um pode induzir a síntese de um outro. E como cada material vegetativo e espécie possui diferentes concentrações endógenas de hormônios, o resultado final estará associado a um balanço hormonal inerente a cada caso.

Embora a análise estatística tenha sido feita separada para cada meio de cultura, é visível que o meio MS obteve melhores resultados que o meio WPM. Provavelmente, devido ao meio WPM possuir apenas 45% da força iônica total do meio MS, e concentrações menores de nitrato (MS 40 µM; WPM 9,7 µM) e amônio (MS 20 µM; WPM 4,9 µM). Consequentemente, o WPM possui uma baixa concentração de nitrogênio total (14,7 µM) comparado ao MS (60,00 µM) (ROCHA et al., 2007). Portanto, a combinação da concentração de 0,25 mg L^{-1} de BAP com o meio de cultura MS, obteve os melhores resultados nesse estudo.

5.4 ENRAIZAMENTO

O efeito do ácido indol-3-butírico (AIB) e do tempo de estresse à temperatura de 40 ºC foi significativo para todas as variáveis estudadas, com exceção do comprimento das raízes (CR), que não se ajustou a nenhum modelo de superfície de resposta.

Analisando a interação do ácido indol-3-butírico (AIB) com o estresse térmico para cada variável, isoladamente, é possível observar com o CR que os melhores valores foram nos tratamentos com 1 mg L^{-1} de AIB, sendo a maior média (5,45 cm) com 12 h de estresse térmico (Figura 11). Já as variáveis número de raízes, frequência de enraizamento e massa seca de calos, obtiveram um valor máximo na superfície de resposta de 4,44, 39,98% e 0,238 g na concentração de 2 mg L^{-1} de AIB sem estresse térmico (Figura 12 A, B e C, respectivamente). Da mesma forma, verifica-se um comportamento semelhante com os demais tratamentos, geralmente aumentado em função da concentração de AIB, enquanto diminui por volta das 24 horas de exposição ao estresse térmico.

Figura 11 – Aspecto da indução rizogênica de *Lecythis pisonis* em diferentes concentrações de AIB e tempos de exposição ao estresse térmico de 40 ºC, após 70 dias em sala de crescimento. Barra: 1,0 cm.

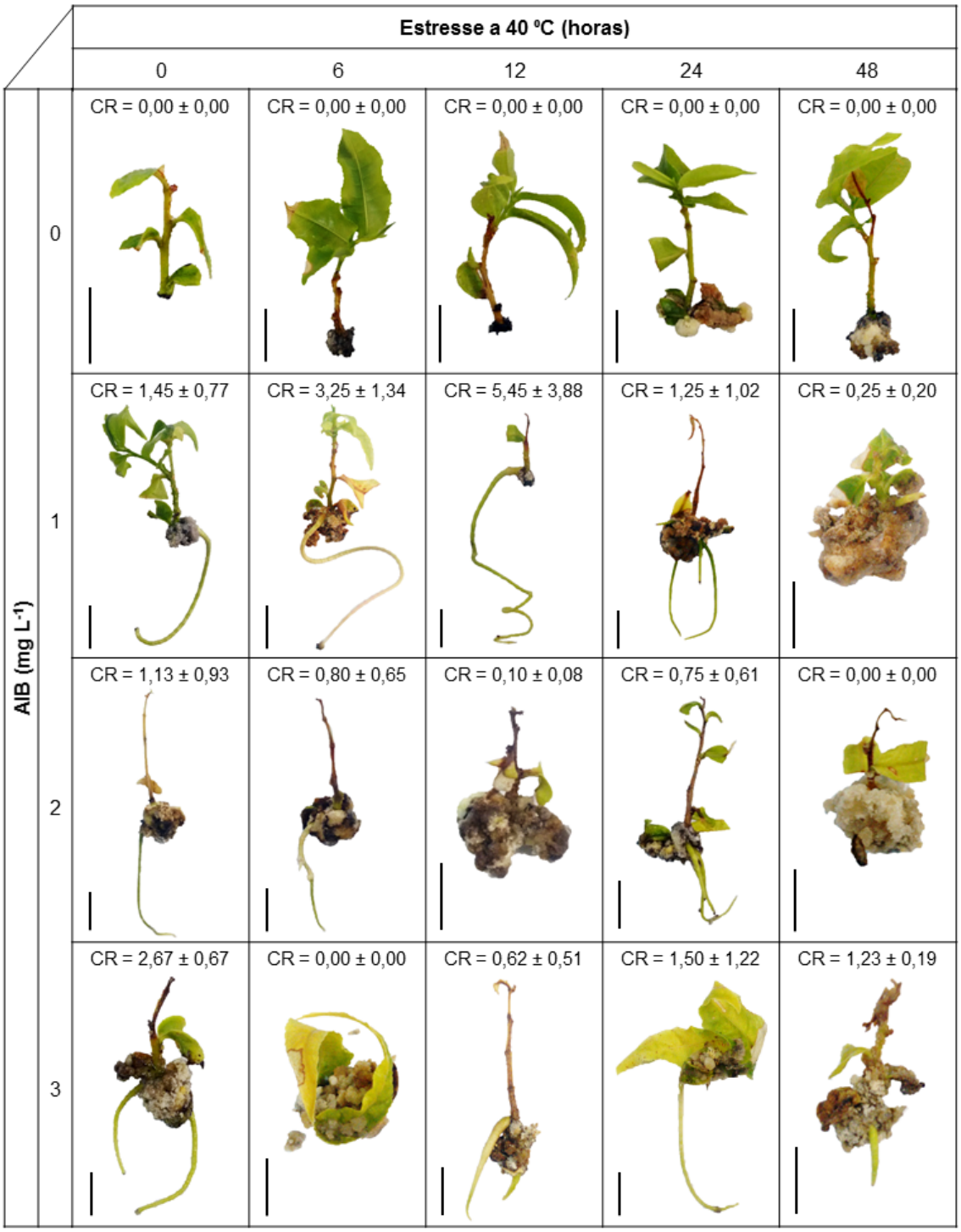
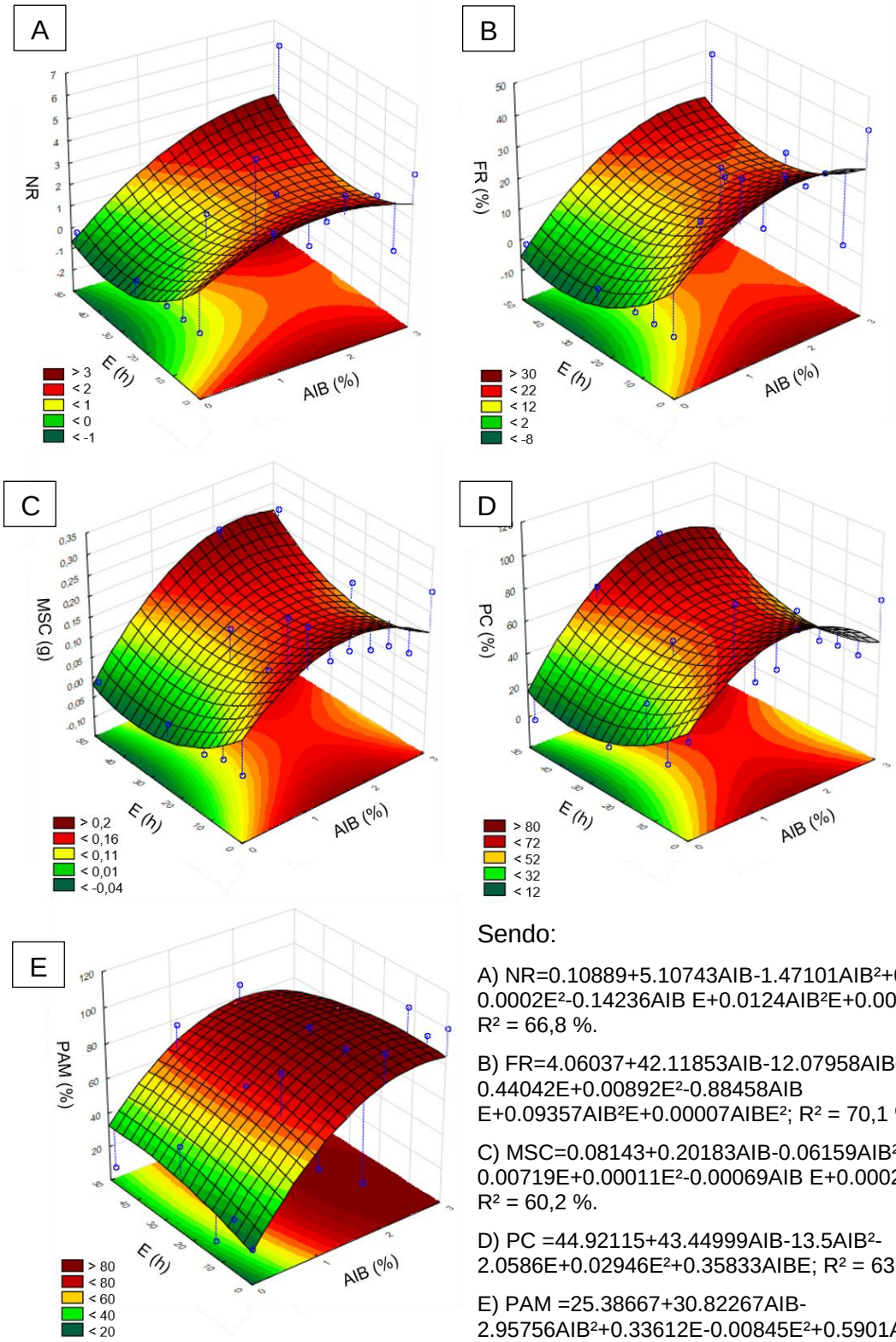


Figura 12 - Superfícies de resposta para as variáveis A: número de raízes (NR), B: frequência de enraizamento (FR), C: massa seca de calos (MSC), D: percentagem de calos (PC), e E: parte aérea morta (PAM) para a interação entre as diferentes concentrações de AIB e estresse a 40 ºC (E), em explantes de sapucaia, aos 70 dias. Pontos em azul: dados observados



Sendo:

A) $NR=0.10889+5.10743AIB-1.47101AIB^2+0.01144E-0.0002E^2-0.14236AIB\ E+0.0124AIB^2E+0.00002AIBE^2$; $R^2 = 66,8$ %.

B) $FR=4.06037+42.11853AIB-12.07958AIB^2-0.44042E+0.00892E^2-0.88458AIB\ E+0.09357AIB^2E+0.00007AIBE^2$; $R^2 = 70,1$ %.

C) $MSC=0.08143+0.20183AIB-0.06159AIB^2-0.00719E+0.00011E^2-0.00069AIB\ E+0.00022AIB^2E$; $R^2 = 60,2$ %.

D) $PC =44.92115+43.44999AIB-13.5AIB^2-2.0586E+0.02946E^2+0.35833AIBE$; $R^2 = 63,9$ %.

E) $PAM =25.38667+30.82267AIB-2.95756AIB^2+0.33612E-0.00845E^2+0.5901AIB\ E-0.08695AIB^2E^2$; $R^2 = 63,8$ %.

Para a percentagem de calos, apesar de ter um comportamento semelhante as variáveis NR, FR e MSC, seu valor máximo na superfície de resposta foi no tratamento com o uso de 2 mg L^{-1} de AIB e 48 h de estresse térmico, obtendo um valor de 81,28% (Figura 12 D). Possivelmente, em resposta a elevação do nível de estresse. A calogênese, normalmente, não é uma resposta desejada na rizogênese. No entanto, nesse estudo, todos os explantes que formaram raízes, formaram antes, uma massa de calos na base. E observou-se que em algumas plântulas as raízes se desprendia facilmente, indicando uma organogênese indireta (Figura 13).

Figura 13 – Raiz desconectada da plântula, formada a partir da calogênese de explantes de sapucaia, aos 70 dias. Barra: 1 cm.

A presença de AIB influenciou a formação e o crescimento de calos na base dos explantes. A suplementação do meio com essa auxina resultou em valores maiores de massa seca e percentagem de calos comparado com os demais tratamentos, independentemente do tempo de estresse. Essa relação também foi observada em *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (KIELSEI et al., 2009), em *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Sm. (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012), *Acacia leucophloea* (Roxb.) Willd. (SHARMA et al., 2017), na qual observaram que, quanto maior a concentração de AIB, maior a formação de calos.

Quanto a percentagem de parte aérea morta, o máximo valor na superfície de resposta foi de 91,24%, com 3 mg L^{-1} de AIB, sem estresse (Figura 12 E). Verificando-se uma relação crescente com o aumento da concentração de AIB,

assim indicando, um grau de toxidez em concentrações acima dessa.

Tanto a variável percentagem de calos, quanto a percentagem de parte aérea morta, foram altas na maioria dos tratamentos, demonstrando que, apesar do alto índice de mortalidade da parte aérea, a base dos explantes permaneceram vivos proliferando massa celular.

Em geral, ao analisar juntamente todas as variáveis estudadas, o enraizamento teve influência positiva somente do AIB, enraizando em todas as concentrações, com destaque para 1 mg L^{-1} sem estresse térmico. O processo de indução e iniciação de raízes adventícias e calos é regulado pela relação quantitativa entre os níveis de auxina e citocinina na planta, sendo esses teores endógenos variantes para cada espécie e genótipo (GUTIÉRREZ et al., 2011). Além disso, esses valores de hormônios endógenos em contato com os de reguladores de crescimento, presente no meio de cultura, desencadeiam uma resposta diferente para cada concentração e condição (origem e tipo de material vegetativo, ambiente e nutrição).

Para *Cordia trichotoma* (MANTOVANI; FRANCO; VESTENA, 2001), *Erythrina velutina* (COSTA; NEPOMUCENO; SANTANA, 2010) e *Amburana acreana* (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012) os melhores resultados ocorreram em baixas concentrações de AIB (0,5 mg L^{-1}) em meio WPM; *Parapiptadenia rigida* (KIELSEI et al., 2009) e *Acacia leucophloea* (SHARMA et al., 2017) foi de 1 mg L^{-1} no meio WPM e MS, respectivamente; e em *Searsia dentata* (PRAKASH; STADEN, 2008), 2 mg L^{-1} em meio MS. Já para *Bauhinia cheilantha* (GUTIÉRREZ et al., 2011) as concentrações entre 1,7 e 2,7 mg L^{-1} em meio WPM foram as mais responsivas; enquanto *Hancornia speciosa* (SOARES et al., 2007) somente enraizou com 3 mg L^{-1}, dentre as concentrações testadas. Estas informações comprovam a necessidade de um balanço hormonal diferente para cada espécie estudada.

Um fator que pode ter influenciado na eficiência do enraizamento é a idade do material vegetativo utilizado, pois, mesmo com o revigoramento das mudas de sapucaia com a técnica de minijardim, espécies florestais são mais difíceis de propagar a partir de estacas ou cultura de tecidos, em razão dos tecidos serem mais lenhosos. Uma possível solução seria subcultivos sucessivos *in vitro*, a fim de rejuvenescer o material; usar técnicas para isolar e

quantificar com precisão as auxinas endógenas e seus metabólitos, para ter maior conhecimento do balanço hormonal que deve ser feito para a propagação da espécie; fazer estudos anatômicos e de ontogenia do material. Além de testar concentrações menores de AIB e outras auxinas.

6. CONCLUSÕES

A propagação *in vitro* de sapucaia é possível com as técnicas utilizadas nesse trabalho, pois:

- O estabelecimento e manutenção do minijardim é viável para produção de propágulos, com maior produtividade nos meses mais quentes do ano;
- A desinfestação dos segmentos caulinares é eficaz com o uso de solução de imersão de 3% de hipoclorito de sódio e 3000 mg L^{-1} de amoxicilina®, por 20 minutos cada;
- O meio de cultura MS suplementado com 0,25 mg L^{-1} de 6-benzilaminopurina induziu mais brotações *in vitro* de sapucaia; e
- O enraizamento *in vitro*, ocorre com 1 mg L^{-1} de ácido indol-3-butírico, não sendo necessário adotar estresse térmico.

Porém, necessita-se de mais estudos e aprimoramento das técnicas na espécie para produção de mudas em larga escala, além de estudos quanto a aclimatação das plântulas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, N. A. et al. Assessing the response of indigenous loquat cultivar Mardan to phytohormones for *in vitro* shoot proliferation and rooting. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, Hangzhou, v. 14, n. 9, p. 774-784, 2013.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA, F. J. M. Sinopse das plantas conhecidas como medicinais e venenosas no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.17, p.116-155, 2007.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 500 p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=2579622015&pIdAnexo=2530601>. Acesso em: 02 fev. 2018.

AREMU, A. O. et al. Physiological responses and endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured 'Williams' bananas in relation to roscovitine and an inhibitor of cytokinin oxidase/dehydrogenase (INCYDE) treatments. **Planta**, Berlim, v. 236, n. 6, p. 1775-1790, 2012.

ARTIGAS R, M. D.; SILVA, R. F. Establishment of regeneration system for somatic embryogenesis of *Azadirachta Indica* A. Juss. **Acta biológica Colombiana**, Bogotá, v. 20, n. 2, p. 73-83, 2015.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, Salvador, 1997. **Anais**... Colombo: EMBRAPA/CNPF, 1997. v.1, p.300-304.

BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 7**: Medicinal and Aromatic Plant II. Berlin: Springer-Verlag, 1989. 547p.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R. DE C.; MARTINS-CODER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 493-497, 2004.

BRONDANI, G. E. et al. Desinfestação e meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. **Floresta**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 541-554, 2010.

CARMO, A. L. M. DO et al. Associação de fungos com sementes de espécies florestais nativas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 3, p. 246-247, 2017.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. 2 v. Colombo: EMBRAPA, 2006. 627p.

CARVALHO, I. M. M. DE et al. Caracterização química da castanha de

sapucaia (*Lecythis pisonis* cambess.) da região da zona da mata mineira. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 971-977, 2012.

CÉZAR, T. M. et al. Influence of culture medium, explant length and genotype on micropropagation of *Pinus taeda* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 1, p. 13-22, 2015.

CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2014, 325 p.

COKE, J. E. Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pines. 1996. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/5534434.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2016.

COSTA, G. M. DA; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. DE. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.

CRUZ, C. D. Genes Software - extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

DONATO, V. M. T. S. et al. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 134-141, 2005.

EMMANUEL, E. et al. Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. **Environment International**, Cumbria, v. 30, n. 7, p. 891-900, 2004.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FERMINO, P. C. P.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Ocidental. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - FABACEAE). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2012.

FERRAO, J. E. M. **Fruticultura tropical**: espécies com frutos comestíveis. 2 v. Lisboa: Instituto de Investigação Cientifica Tropical, 2001. 580 p.

FERREIRA, B. G. A. et al. Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (Vell.) PAX com o uso de ácido indol butírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 19-31, 2010.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEROGE, E. F. HALL, A. M.; e DE KLERK, G.-J. **Plant propagation by tissue culture**: the background. 3 ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 355-402.

GARCÍA, L. M. D.; SÁNCHEZ, R. A. H. Multiplicación clonal *in vivo* e *in vitro* de la especie forestal nativa *Aniba perutilis* Hemsl. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 65, n. 2, p. 190-196, 2016.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. Plant propagation by tissue culture. **Springer**, Dordrecht, 2008, 502 p.

GOLLE, D. P. et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 77-82, 2013.

GONÇALVES et al. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2005. 427 p.

GUTIÉRREZ, I. E. M. DE et al. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 260-265, 2011.

GUTIÉRREZ, I. E. M. et al. Multiplicação *in vitro* de *Tapirira guianensis* aubl. (Anacardiaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 2, p. 143-151, 2013.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus*. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba-SP, n. 194, 2002. 22 p.

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

HOULLOU, L. M. et al. Clonal propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) via direct and indirect *in vitro* regeneration. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 439-445, 2015.

HUSEN, A.; PAL, M. Effect of serial bud grafting and etiolation on rejuvenation and rooting cuttings of mature trees of *Tectona grandis* Linn. f. **Silvae Genetica**, Varsóvia, v. 52, n. 2, p. 84-88, 2003.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>. Acesso em: 02 fev. 2018.

KIELSEI, P. et al. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1098-1104, 2009.

LEN, S. V. et al. Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 1, p. 209-212, 2002.

LE ROUX J. J.; VAN STADEN J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* – a review. **Tree Physiology**, Oxford, v. 9, p. 435-477, 1991.

LIMA, J. D.; MORAES, W. DA S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (Musa AAA cv. CAIPIRA). **Pesquisa Agropecuária**

Tropical, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 181–186, 2006.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, v. 1, 1368 p.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MANTOVANI N. et al. *In vitro* shoot induction and multiplication from nodal segments of adult *Ginkgo biloba* plants. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 184-189, 2013.

MANTOVAN, N. et al. Cultivo de canafístula (*Peltophorum dubium*) em minijardim clonal e propagação por miniestacas. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 225-236, 2017.

MILLIKEN, W. et al. **The ethnobotany of the Waimiri Atroari indians of Brazil**. Kew: Royal Botanic Garden, 1986. 146p.

MORI, S. Diversificação e conservação das lecythidaceae neotropicais. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1, p. 45-68, 1990.

MOURA, L. C. et al. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1691-1698, 2012.

MUKHERJI, S.; WAREING, P. F. The effect of penicillin on the levels of endogenous gibberellins and cytokinins in mungbean (*Vigna radiata* L.) seedlings. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 25, n. 3, p. 161-165, 1983.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Phisiologia Plantarum**, Medford, v. 15, n. 3, p. 473-97, 1962.

NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA). **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 38, n. 1, p. 79-86, 2015.

NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.

OLIVEIRA, L. S. DE et al. Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 235-247, 2016.

PALÚ, E. G. et al. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

PELEGRINI, L. L. P. et al. Germinação *in vitro* de eixos embrionários zigóticos de imbuia (*Ocotea porosa* (Nees ex Martius) Liberato Barroso). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.

PEQUEÑO-GRANADO, I. L. et al. Inducción organogénica de *Jatropha curcas* L. A partir de hojas jóvenes. **Polibotánica**, Cidade do México, n. 39, p. 79-89, 2015.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. D. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PIRES, P. et al. Sazonalidade e soluções nutritivas na miniestaquia de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 283-293, 2015.

PRAKASH, S.; STADEN, J. VAN. Micropropagation of *Searsia dentata*. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 44, n. 4, p. 338-341, 2008.

PUROHIT, S. **Hormonal Regulation of Plant Growth and Development,** Bikaner: Dungar College, 1985, 412 p.

RAGA, A. et al. Novos registros de Aleyrodidae (Hemiptera) no estado de Roraima, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 3, p. 439-441, 2011.

REDE DE SEMENTES DO CERRADO. Disponível em: <http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Espécies/Lecythidaceae/pisonis_2708/index.html>. Acesso em: 06 set. 2016.

RIBEIRO, G. D. **Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades.** Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010. 179 p.

RICKLI, H. C. et al. Origem de brotações epicórmicas e aplicação de ácido indolilbutírico no enraizamento de estacas de *Vochysia bifalcata* Warm. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 385-393, 2015.

RIOS, M. N. da S.; PASTORE JÚNIOR, F. **Plantas da Amazônia**: 450 espécies de uso geral. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2011. 1650 p.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras uteis do Brasil**: manual de dendrologia brasileira. São Paulo, SP: E. Blucher/USP, 1971. 294 p.

ROBAKOWSKI, P.; BIELINIS, E.; SENDALL, K. Light energy partitioning, photosynthetic efficiency and biomass allocation in invasive *Prunus serotina* and native *Quercus petraea* in relation to light environment, competition and allelopathy, **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 1, n. 1, p. 1-19, 2018.

ROCHA, S. C. et al. Micropropagation of *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

ROSIER, C. L. et al. Stumping height, crown position, and age of parent tree influence rooting of stem cuttings of fraser fir. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 3, p. 771-777, 2005.

SA, F. P. DE et al. *In vitro* propagation and acclimatization of genipapo accessions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 40, n. 2, p. 155-163, 2016.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports,** New York, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.

SAMPAIO, P. T. B. Castanha-sapucaia (*Lecythis pisonis*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade amazônica**: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e tecnológico, 2000. p.141-147.

SAMUELSON, M. E.; CAMPBELL, W. H.; LARSSON, C. M. The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in arley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 3, p. 533-539, 1995.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagation of pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Brazilian Journal of Fruticulture**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SHARMA, P. et al. Micropropagation of *Acacia leucophloea* (Roxb.) Willd.: a multi-purpose legume tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, Allahabad, v. 87, n. 5, p. 1-7, 2017.

SILVA, L. L. et al. Effects of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in a mouse model of pruritus. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 139, n.1, p. 90-97, 2012.

SILVA, L. C. et al. Decontaminant solution on *in vitro* growth of *Byrsonima intermedia* seedlings. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 4, p. 674-679, 2015.

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

SOUZA JUNIOR, L. DE; QUOIRIN, M.; WENDLING, I. Miniestaquia de *Grevillea robusta* A. Cunn. a partir de propágulos juvenis. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 4, p. 455-460, 2008.

SOUZA, V. A. B. DE et al. Características físicas de frutos e amêndoas e

características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 946-952, 2008.

SOUZA, L. DOS S. DE et al. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 691-697, 2011.

TALLÓN, C. I.; PORRAS, I.; PÉREZ-TORNERO, O. Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v. 48, n. 5, p. 488-499, 2012.

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

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1990. 433 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. 509 p.

WALKER, C. et al. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 3, p. 1-11, 2016.

WATT, M. P. et al. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlim, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-Part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, Purdue, v. 45, n. 4, p. 449-471, 2014a.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry-part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, Purdue, v. 45, n. 4, p. 473-486, 2014b.

WICKENS, G. E. Management issues for developmentofnon-timber forest products. **Unasylva**, v. 42, n. 165, p. 3-8, 1991. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/u2440e/u2440e02.htm>. Acesso em: 11 set. 2016.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A. Clonagem em espécies florestais nativas. In: ROCHA, M. G. B. **Melhoramento de espécies arbóreas nativas**. Belo Horizonte: IEF, 2002. 173 p.

XAVIER, A. et al. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 139-143, 2003.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. DA. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa: UFV, 2013. 279 p.