



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

DANIEL DA SILVA

MICROPROPAGAÇÃO DE *Caesalpinia ferrea* Martius

**MANAUS
2015**

DANIEL DA SIVA

MICROPROPAGAÇÃO DE *Caesalpinia ferrea* Martius

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio

**MANAUS
2015**

Ficha Catalográfica

S586m Silva, Daniel da
Micropropagação de *Caesalpinia férrea* Martius. /
Daniel da Silva -- Manaus: Universidade do Estado do
Amazonas, 2015.
Xii, 57 f. : il.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Recursos Naturais da Amazônia, 2015.
Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio
1. Biotecnologia 2.Cultura de tecidos vegetais
3.Multiplicação *in vitro* 4.Planta medicinal Amazônica I.
Título.
CDU: 633.88(811.3)

Ficha catalográfica elaborada por
Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

DANIEL DA SILVA

MICROPROPAGAÇÃO DE *Caesalpinia ferrea* Martius

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: ___/___/___

Banca Examinadora:

Dr. Cleiton Fantin Rezende
Universidade do Estado do Amazonas

Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque
Universidade do Estado do Amazonas

Dra. Nádia Verçosa de Medeiros Rapôso
Universidade do Estado do Amazonas

**MANAUS
2015**



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA – MBT

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO
ALUNO DANIEL DA SILVA EM
BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA.

Aos cinco dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quinze às treze horas, realizou-se no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, localizado no 4º andar do prédio anexo da Escola Superior de Ciências da Saúde ESA, situado na Avenida Carvalho Leal, n.º 1.777, Cachoeirinha, a Defesa Pública da dissertação de mestrado de Daniel da Silva, sob o título “Micropropagação de *Caesalpinia ferrea* Martius”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, tendo como orientador Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio, segundo encaminhamento da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores: Dr. Cleiton Fantin Rezende (Presidente), Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque (Membro), Dra. Nádia Verçosa de Medeiros Rapôso (Membro).

Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os referidos membros da banca emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo o aluno sido APROVADO.

Dr. Cleiton Fantin Rezende

CPF: 011832849-10

Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

CPF: 92571549049

Dra. Nádia Verçosa de Medeiros Rapôso

CPF: 504807.587-00

Dedicatória.

“Maxime” Dedico este trabalho a minha Avó *“In memorian”* Palmira Nonata da Silva Pereira e a minha Mãe Maria das Dores Nonata da Silva, que através de suas orientações sempre me exigiram um pouco mais, fazendo-me crescer intelectualmente e moralmente, e por ter me ensinado a importância da educação.

“Epígrafe”.

“Os grandes feitos são conseguidos
não pela força, mas pela
perseverança”.

Samuel Johnson

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado, ter me dado esperança, força de vontade e acima de tudo a sabedoria para a conquista de mais uma vitória pessoal e profissional.

À minha família, que sempre acreditou no meu potencial de realizar este sonho e suportando a minha ausência, e dando-me força para ser um vencedor.

À minha querida Avó, “*In memoriam*” Palmira Nonata da Silva Pereira que ainda em vida me ensinou os princípios da vida.

À minha querida Mãe, Maria das Dores Nonata da Silva, dando-me conselhos valiosíssimos, e atitude de direcionar no caminho correto.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA, pela oportunidade do exercício científico e apoio pela realização deste trabalho.

Ao meu orientador Dr. Paulo de Tarso de Barbosa Sampaio pela oportunidade e confiança depositado a minha pessoa, sobretudo, que sempre demonstrou acreditar no meu trabalho.

À Dra. Suely Costa pela paciência e ajuda nas análises estatísticas deste projeto.

Ao Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza pela identificação e obtenção da espécie vegetal.

Aos técnicos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Dra. Angela Maria Imakawa e Flávio Bruno Silva pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao casal maravilhoso Zequinha e Eutália que me acolheu carinhosamente juntamente com seus filhos e filhas na sua humilde residência.

À minha “segunda família” o casal Rui Torres e Socorro Fernandes, pela a oportunidade que me deste desde o início da minha carreira acadêmica, eternamente grato.

Aos meus amigos e colegas de turma: Messe Elmer Torres da Silva, Marta Rodrigues de Oliveira, Jorge Luiz Rodrigues Manrique e Lucinaldo Sá, pelas horas de estudos nas madrugadas e pelas diversões.

À minha querida namorada, Josilene Cavalcante pelo companheirismo nesta jornada.

Aos vigilantes da EST Sr. Izidoro e Sr. Walbert pela irrigação dos viveiros aos domingos e feriados.

A todos os amigos e familiares, de forma uma direta e indiretamente que sempre me apoiarem na realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação do Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart) espécie nativa da Amazônia com potencial medicinal, ornamental e madeireiro. As sementes foram obtidas do Banco de Sementes do Laboratório de Microbiologia e Fertilidade do Solo do INPA e após o beneficiamento, foram submersas por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,0%, 0,10%, 0,25 %, 0,50% e 1,0% e inoculadas em meio de cultura de MS basal. O tratamento com 0,25% do agente desinfestante possibilitou 90% de germinação *in vitro* de sementes. Os explantes germinados *in vitro* foram segmentados e inoculados no meio de cultura MS suplementado com 0,1 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de IBA. Os resultados indicam que 100% de explantes apresentaram brotações e 32,21% desenvolveram sistemas radiculares e ausência total de calos. Foi observado que 90% dos explantes originados das gemas desenvolveram brotos com 2,73 cm de altura e maior taxa de multiplicação (10,21%). A aclimação de explantes de *C. ferrea* foi possível sem a presença de raízes desenvolvidas *in vitro* e, que o substrato terra é o mais indicado para a aclimação, apresentando 63,33% de plantas vivas. Concluímos que esta espécie pode ser propagada *in vitro*, entretanto, é necessário aprofundar os estudos sobre a aclimação das plantas multiplicadas *in vitro* na casa de vegetação.

Palavras-chave: Biotecnologia, Cultura de Tecidos Vegetais, Multiplicação *in vitro*, Planta Medicinal Amazônica.

ABSTRACT

This project aimed to develop a micropropagation protocol of "Jucá" (*Caesalpinia ferrea* Mart), an Amazon native species with medicinal, ornamental and timber potential. Seeds were obtained from the Seed Bank belonged to the Laboratory of Microbiology and Soil Fertility at INPA-Manaus, and after processing, were submerged for 30 minutes in sodium hypochlorite solution of 0.0%, 0.10%, 0.25%, 0.50% and 1.0% and inoculated in MS basal medium. The treatment at 0.25% of sterilizing agent allowed 90% of germination of *in vitro* seeds. The explants germinated *in vitro* were targeted and inoculated on MS medium supplemented with 0.1 mg /L of BAP and 0.1 mg /L of IBA. The results indicate that 100% of explants showed shoots and 32.21% developed root systems and total absence of callus. It was observed that 90% of explants derived from yolks developed shoots with 2,73cm and higher proliferation rate (10.21%). The Acclimatization of explants of *C. ferrea* was possible without the presence of roots grown *in vitro*, and that the soil is the most suitable substrate for acclimatization with 63.33% of living plants. We conclude that this species can be propagated *in vitro*, however, further studies are necessary about acclimatization of plants multiplied *in vitro* in the greenhouse.

Keywords: Biotechnology, Vegetal Tissue Culture, *in vitro* multiplication, Amazon medicinal plant.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Classificação taxonômica da planta <i>Caesalpinia</i> var. <i>ferrea</i>	16
Tabela 2. Alguns nomes populares de <i>Caesalpinia ferrea</i> divulgados no Brasil.	17
Tabela 3. Composição dos meios basais MS de Murashige & Skoog (1962), B5 de Gamborg et al. (1968) e WPM de Lloyd & McCown (1980).	30
Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes de <i>Caesalpinia ferrea</i>	34
Tabela 5. Efeitos de diferentes concentrações e tipos de citocininas no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Caesalpinia ferrea</i>	37
Tabela 6. Efeito das diferentes posições da gema no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Caesalpinia ferrea</i>	38
Tabela 7. Efeito de diferentes diluições dos meios de cultura basais, Murashige e Skoog (MS), Gamborg (B5) e Wood Plant (WP) e suas diluições pela metade e pela quarta parte, no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes <i>Caesalpinia ferrea</i>	40
Tabela 8. Efeitos de diferentes concentrações (mg/L) e tipos de citocininas no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Caesalpinia ferrea</i>	43
Tabela 9. Porcentagem de explantes de <i>Caesalpinia ferrea</i> que sobreviveram à aclimação em diferentes tipos de substratos.	45

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Características morfológicas de *Caesalpinia ferrea*. (A) Planta adulta; (B) Detalhe da folha e flor; (C) Frutos; (D) Sementes; (E) Tronco e (F) Madeira 18
- Figura 2.** Estrutura de Pauferrol A (2',4',4'-trihidroxichalcona). 19
- Figura 3.** Procedimentos realizados para a obtenção de plantas a partir da micropropagação. 21
- Figura 4.** Localização das gemas em uma plântula de *Caesalpinia ferrea*.....29
- Figura 5.** Sementes de *Caesalpinia ferrea*, cultivadas em tubos de ensaios com meio MS basal, suplementado com sacarose e ágar[®]: (A) contaminada, (B) não germinada, (C) germinada e (D) plântula..... 35
- Figura 6.** Plântulas de *Caesalpinia ferrea* plantadas em bandejas de polietileno cobertas com vidro transparente durante 30 dias (A) e, após 60 dias (B) de plantio.....44

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

2ip: Isopenteniladenina

AIA: Ácido 3-indol-acético

ANA: Ácido naftalenoacético

ANOA: Ácido beta-naftoxiacético

ApCFA: Ácido p-clorofenoxiacético

B5: Meio de Cultura de Gamborg (1968)

BAP: 6-benzilaminopurina

EST: Escola Superior de Tecnologia

IBA: Ácido 3-indol-butírico

KIN: 6-furfurilaminopurina ou cinetina

LCTV - Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais

MS: Meio de Cultura de Murashige & Skoog (1962)

TDZ: Tiazuron ou N-fenil-N'-1,2,3-tiadizol-5,1-uréia

WP: Meio de cultura Woody Plant de Lloyd & McCown (1980)

ZEA: Zeatina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Classificação taxônomica de <i>C. ferrea</i>	16
2.2 Distribuição geográfica de <i>C. ferrea</i>	16
2.3 A Família Fabaceae	17
2.4 Aspectos morfológicos da família.....	17
2.5 Princípios ativos e atividades biológicas.....	18
2.6 Informações adicionais.....	20
2.7 Micropropagação.....	20
2.7.1 <i>Uma visão geral da técnica</i>	20
2.7.2 <i>Meios de cultura</i>	22
2.7.3 <i>Reguladores de crescimento vegetal</i>	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos	25
CAPÍTULO I	26
1. INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Experimento 1: Assepsia e germinação in vitro de sementes de <i>C. ferrea</i>	29
2.2 Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de <i>C. ferrea</i>	31
2.3 Experimento 3: Efeito de diferentes posições da gema na haste quanto ao número médio e altura média das brotações de <i>C. ferrea</i>	31
2.4 Experimento 4: Efeito de diferentes diluições dos meios basais no número médio e na altura média das brotações de <i>C. ferrea</i>	31
2.5 Experimento 5: Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxinas no enraizamento nodais de <i>C. ferrea</i>	32
2.6 Experimento 6: Aclimação.....	32
2.7 Análises Estatísticas	32

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1 Experimento 1: Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>C. ferrea</i>	33
3.2 Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de <i>C. ferrea</i>	35
3.3 Experimento 3: Efeito de diferentes posições da gema no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>C. ferrea</i>	38
3.4 Experimento 4: Efeito de diferentes diluições dos meios de cultura no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>C. ferrea</i>	39
3.5 Experimento 5: Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxinas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de <i>C. ferrea</i>	41
3.6 Aclimação.....	44
4. CONCLUSÃO	47
5. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Na Amazonia há grande diversidade de espécies com potencial para serem utilizadas com fins ornamentais, cosmético, perfumaria e farmacêutica (CUNHA e PASCOALOTO, 2006). Neste contexto, destaca-se o Jucá (*Caesalpinia ferrea* Martius), uma planta medicinal amazônica pertencente à família Fabaceae nativa do Brasil, amplamente distribuída principalmente no Norte e Nordeste (LORENZI, 2002). Estudos científicos comprovam a eficácia do princípio ativo “Pauferrol” presente nesta espécie que inibe o crescimento das células cancerígenas (NOZAKI et al., 2007; OHIRA et al., 2013).

O extrativismo praticado de maneira indiscriminada das populações naturais desta espécie, além de promover a erosão genética vem contribuindo para a destruição do seu habitat na Amazônia. Estudos das técnicas de propagação sexuada e assexuada do Jucá justificam-se devido à necessidade da obtenção de mudas para o cultivo comercial e para programas de melhoramento genético (BENEDITO et al., 2012).

Uma das principais técnicas de cultura de tecidos vegetais é a micropropagação que visa à produção de um grande número de mudas em curto espaço de tempo. Apesar da utilização da regeneração de plantas *in vitro* ser conhecida como um dos processos importantes e revolucionários dentro da biotecnologia vegetal. É necessário aprofundar os estudos sobre os mecanismos envolvidos no processo de regeneração de plantas a partir de células isoladas não diferenciadas, órgãos ou tecidos vegetais cultivados em um meio de cultura asséptico. O cultivo *in vitro* possibilita a clonagem de milhares de indivíduos num curto espaço de tempo, devido à totipotência das células meristemáticas dos tecidos vegetais (ROCHA, 2009; JUNGHANS e SOUZA, 2013).

Uma das peculiaridades da micropropagação é a possibilidade do maior controle das diferentes fases do crescimento dos explantes *in vitro*. Isso não seria possível sem adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, compostos orgânicos dos quais em baixas concentrações, promovem, inibem, ou, ainda, modificam o crescimento do vegetal quando cultivados *in vitro* (HARTMANN et al., 2004). Estes componentes direcionam o metabolismo do explante para o processo desejado, e os efeitos observados quanto às respostas das células, tecidos e órgãos *in vitro*, variam de acordo com as condições ambientais, o tipo do explante e o genótipo da planta (PASQUAL, 2001).

O tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* (HARTMANN et al., 2004).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo para a regeneração *in vitro* de explantes do Jucá, usando-se os reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA), ácido 3-indolacético (AIA), ácido 3-indol-butírico (IBA), 6-benzilaminopurina (BAP), 6-furfurilaminopurina ou cinetina (KIN) e tidiazuron (TDZ) em meio de cultura, para indução de broto, raiz e calo em brotações apicais e segmentos nodais do Jucá.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação taxônomica de *C. ferrea*

De acordo com o sistema de classificação de Cronquist (1981), a taxonomia do Jucá encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação taxonômica da planta *Caesalpinia* var. *ferrea*

Taxonomia	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
Subclasse	Rosidae
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Espécie	<i>Caesalpinia ferrea</i> Martius ex Tulasne var. <i>ferrea</i>

2.2 Distribuição geográfica de *C. ferrea*

De acordo com Ducke (1953) e Rizzini e Mattos Filho (1968), a *C. ferrea* Martius apresenta três variedades bem caracterizadas. A variedade *ferrea* (sinônimo: *C. ferrea* var. *cearensis*), com ocorrência na Região Nordeste, é forma peculiar à Caatinga, onde é conhecida principalmente por jucá; a variedade *parvifolia* e a variedade *leiostachya*, formas característica da Floresta Atlântica, onde são espontâneas no Rio de Janeiro. Esta última é muito próxima da variedade *parvifolia*, contudo suas folhas têm de nove a onze pinas e estas doze a 20 folíolos.

A *C. ferrea* é uma árvore largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, principalmente nos estados de Amazonas, Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí e Pernambuco (ALZUGARAY, 1984; LEWIS, 1987; ULIBARRI, 1996) sendo conhecida por vários nomes descritos em diferentes estados brasileiros conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Alguns nomes populares de *Caesalpinia ferrea* divulgados no Brasil.

Nome	Estado
Jucá	Amazonas
Ibirá-obi; imirá-obi; imirá-itá; jucá e pau-ferro-da-mata	Espirito Santo
muirá-itá; muirá-obi; muirapixuma; mururé; pau-ferro-do-norte	Pernambuco
Pau-ferro-verdadeiro	Rio Grande do Sul
Peroba-sobro	Bahia
Quiripiranga	Rio de Janeiro

2.3 A Família Fabaceae

A família Fabaceae é constituída de 730 gêneros e 19.325 espécies, e é subdividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS et al., 2005; SOUZA, 2012), situando-se entre as três maiores famílias de Angiospermae (POLHILL et al., 1981).

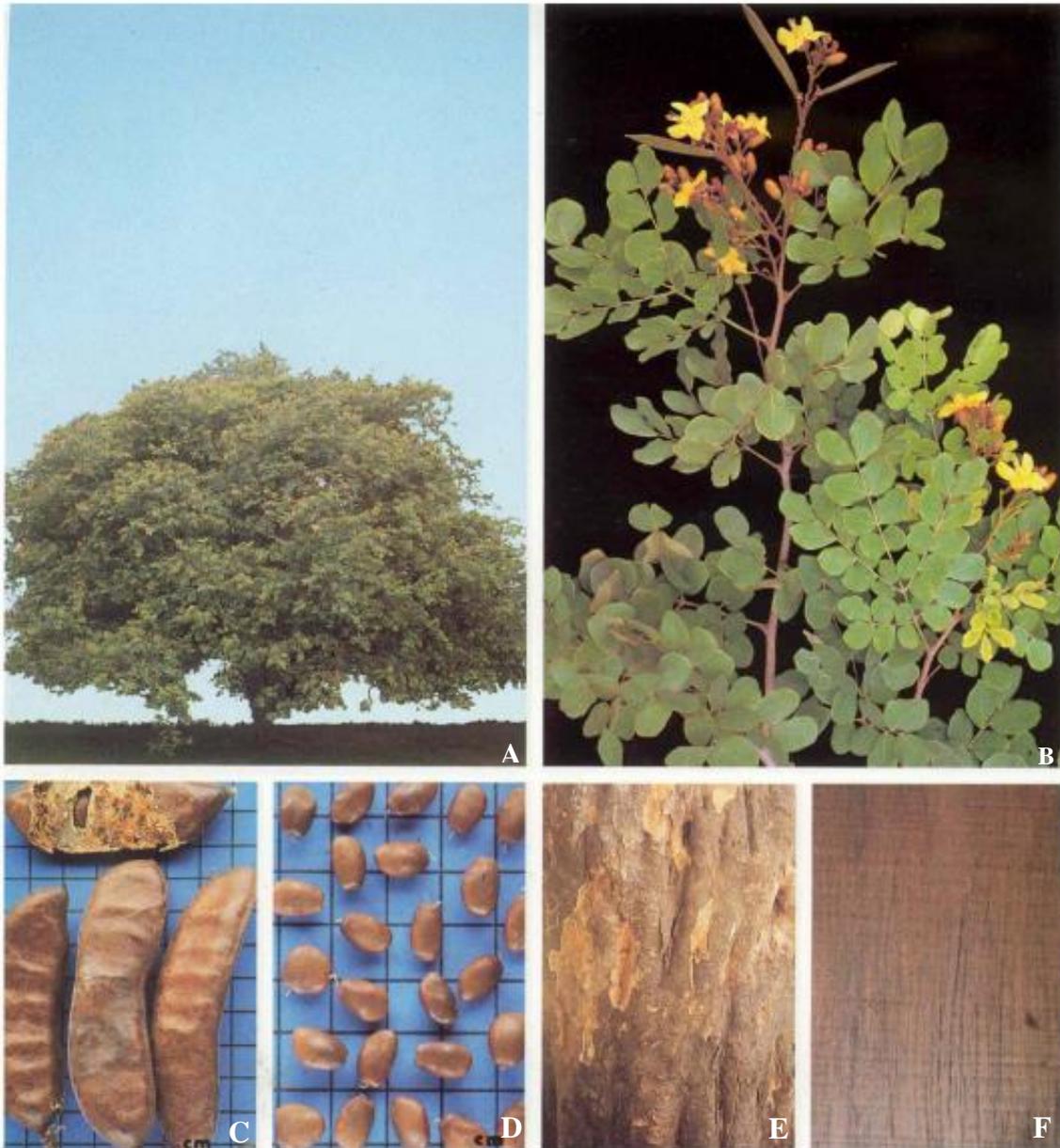
A subfamília Caesalpinioideae reúne cerca de 171 gêneros e 2.250 espécies (LEWIS et al., 2005), onde são abundantes na América do Sul, África tropical e sudeste da Ásia (COWAN, 1981).

Segundo Barroso et al., (1991), as espécies nativas correspondem a 64 gêneros e 790 espécies. A subfamília Caesalpinioideae distingue-se pelas folhas pinadas ou bipinadas, raramente simples ou unifolioladas; flores geralmente zigomorfas, com sépalas livres (exceto em Cercideae), sendo a pétala adaxial sobreposta pelas pétalas laterais adjacentes, quando estas estão presentes; o legume é o tipo de fruto mais freqüente e as sementes não apresentam ranhura hilar e geralmente possuem o eixo da radícula reto (COWAN, 1981; BARROSO et al., 1991).

2.4 Aspectos morfológicos da família

De acordo com Lorenzi, (1992) trata-se de uma árvore de 10-15 metros de altura, possui tronco curto de 40-60 cm de diâmetro. Consiste em folhas compostas bipinadas de 15-19 cm de comprimento, com 5-11 pinas opostas; folíolos em número de 8-24 por pina. A madeira é muita pesada, dura, rígida, compacta, de cor variando de vermelha, castanha até quase preta, de longa durabilidade natural (Figura 1).

Figura 1 - Características morfológicas de *Caesalpinia ferrea*. (A) Planta adulta; (B) Detalhe da folha e flor; (C) Frutos; (D) Sementes; (E) Tronco e (F) Madeira.



Fonte: Lorenzi, 1992.

2.5 Princípios ativos e atividades biológicas

Na medicina popular da região Nordeste do Brasil, o pó da casca de jucá é frequentemente usado no tratamento de feridas cutâneas com bons resultados, o que desperta grande interesse nos estudos biotecnológicos e farmacológicos dessa espécie (XIMENES 2004; ROQUE et al., 2010).

Algumas das propriedades terapêuticas de *C. ferrea* têm sido descritas, e incluem o uso na forma de chás e infusões para o tratamento de feridas e contusões, febre, alívio da tosse crônica, afecções hemoptísicas pulmonares (tosses seguidas de sangue), asma

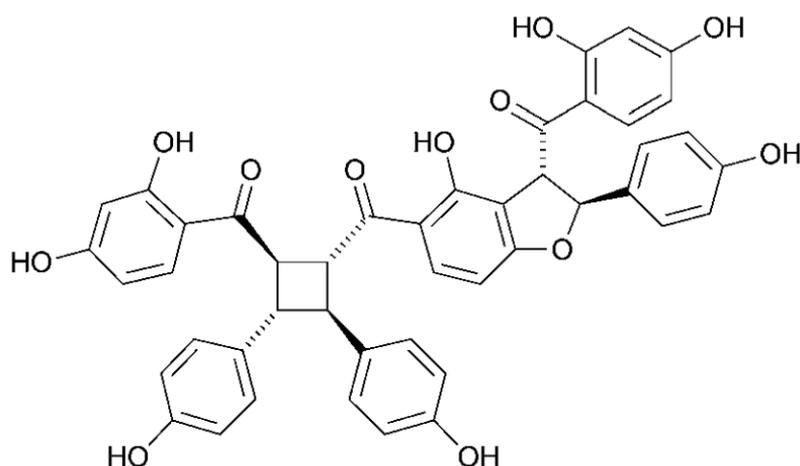
(BRAGA, 1976), enterocolite e diarreia (BALBACH, 1988), no combate a anemia e diabetes (SOUZA, 2002).

Estudos científicos comprovam que o jucá possui atividades: antifúngica e antibacteriana (XIMENES, 2004), anti-inflamatória, antibacteriana e analgésica (CARVALHO et al., 1996), imunoestimulante (QUEIROZ et al., 2001; SUDHAKAR et al., 2006) e cicatrizante (OLIVEIRA et al., 2010).

Estudos realizados por Cavalheiro et al., (2009) indicaram a presença das atividades celulásica, amilásica, anticoagulante e, sobretudo, potente atividade larvicida contra *Aedes aegypti* no extrato aquoso das sementes de *C. ferrea*, podendo ser utilizado como importante ferramenta no controle da dengue no Brasil.

De acordo com Nozaki et al., (2007) um novo derivado de chalcona denominado Pauferrol A, foi isolado a partir do caule de *C. ferrea* e por ser um trímero chalcona foi fundido por um anel ciclobutano e a sua estrutura foi determinada com base na espectroscopia de RMN-2D (Figura 2). Este novo trímero chalcona Pauferrol A mostrou potencial atividade inibidora contra a topoisomerase II humana, e inibe a proliferação das células por meio da indução de apoptose em células de leucemia HL60 humanas (mieloide aguda). Os mesmos autores afirmam que este foi primeiro relato de isolamento e descrição da estrutura deste trímero chalcona e sua atividade biológica. Este mesmo estudo foi citado por Veitch & Grayer (2011) em sua revisão, e estes ressaltam a importância da atividade biológica e inibidora do Pauferrol A sobre a topoisomerase II, que é considerada um alvo clínico para drogas anti-cancerígenas.

Figura 2. Estrutura de Pauferrol A (2',4',4'-trihidroxichalcona).



Fonte: Nozaki et al., 2007.

2.6 Informações adicionais

A árvore é útil para o paisagismo em geral, apresentando ótimas características ornamentais e proporcionando boa sombra, sendo utilizada principalmente em ruas e avenidas (LORENZI, 1992; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; MAIA, 2004). Também é uma espécie indicada para reflorestamentos mistos destinados à recomposição de Áreas de Preservação Permanente (APP) que foram degradadas.

Apresenta uma grande importância também na indústria madeireira, por apresentar madeira muito dura e fibras revessas, difícil de ser desdobrada, de longa durabilidade natural. É empregada na construção civil, na forma de vigas, esteios, caibros, escadas e outros (LORENZI, 1992; MAIA, 2004). A madeira do jucá é muito dura, sendo assim considerada como o “ébanó” brasileiro, pois o verdadeiro ébano (*Dyospirus ebenum*) é uma madeira muito dura utilizada para a fabricação de móveis de luxo na Índia e Sri Lanka.

2.7 Micropropagação

2.7.1 Uma visão geral da técnica

A Cultura de Tecidos Vegetais é o conjunto de técnicas utilizadas para cultivar *in vitro* células e tecidos vegetais em meio nutritivo sintético, de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais visando produzir uma nova planta (RIBEIRO e BASTOS, 2008; RIBEIRO, 2010; CARVALHO et al., 2011).

A cultura de tecidos vegetais consiste no fenômeno denominado de totipotência, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (RODRIGUEZ, 1987; TAITZ & ZEIGER, 2004; TERMIGNONI, 2005; RIBEIRO e BASTOS, 2008).

Essas técnicas apresentam importância prática para área agrícola e florestal, onde aparecem como uma das metodologias mais polivalentes que tem como um dos principais objetivos oportunizar uma alternativa de manipular plantas, inclusive em nível molecular quando necessário. Além disso, tem conquistado destacada posição na recuperação de doenças; na propagação comercial de plantas; no melhoramento genético; no manejo, no intercâmbio e na conservação de germoplasma; e em outras aplicações com as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários (JUNGHANS e SOUZA, 2013).

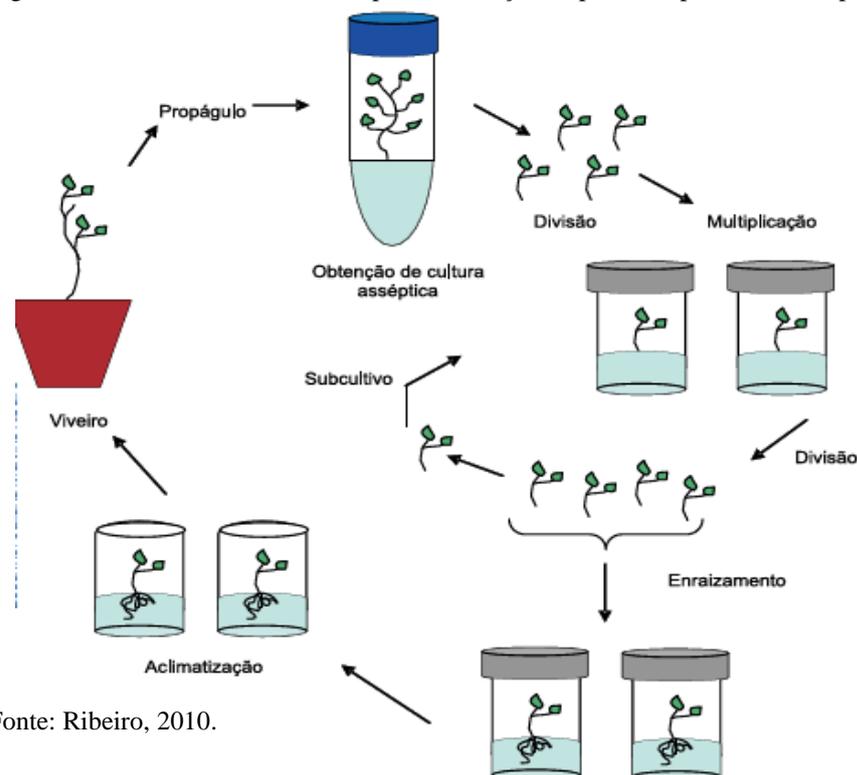
Neste contexto, a cultura de tecidos de plantas possibilita fornecer ao produtor mudas de alto padrão genético e fitossanitário em quantidade suficiente para suprir a necessidade do mercado em curto espaço de tempo (TOMBOLATO e COSTA, 1998).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, a micropropagação se destaca, uma vez que esta técnica permite produzir grande número de plantas em curto espaço de tempo e com garantia fitossanitária e de estabilidade genética das mudas (CHAVES et al., 2006; TONIETTO et al., 2008).

A micropropagação de plantas representa uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, entre as quais as que apresentam propriedades medicinais com valor farmacológico reconhecido. Embora esta técnica tenha como desvantagem o custo elevado, a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, por meio do melhoramento genético, justificam a sua utilização (LIMA et al., 2007).

Conforme a Figura 3, o sucesso de um protocolo de micropropagação depende de vários fatores durante as etapas como: estado fisiológico da planta matriz, coleta de explantes, esterilização dos meios de cultura, condições de incubação, manipulação de subculturas e uso de reguladores de crescimento, meio de cultura, entre outros (GONZÁLES et al., 2004; CARVALHO et al., 2006; QUISEN et al., 2008).

Figura 3. Procedimentos realizados para a obtenção de plantas a partir da micropropagação.



Fonte: Ribeiro, 2010.

2.7.2 Meios de cultura

Os meios nutritivos usados na cultura de tecidos, quanto aos nutrientes, baseiam-se nas exigências de crescimento e desenvolvimento das plantas, com algumas modificações para atender às necessidades específicas das condições *in vitro* (SANTOS-SEREJO et al., 2006; FICK, 2007).

A composição dos meios de cultura utilizados na micropropagação varia de acordo com a espécie e as diferentes etapas do processo, ou seja, assepsia, multiplicação e enraizamento *in vitro*. Dentre os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação, destacam-se o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), Wood Plant Medium - WPM (LLOYD e MC COWN, 1980) e Gamborg B5 (GAMBORG et al., 1968). O meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é um meio definido, que consiste de sais inorgânicos, vitaminas, carboidrato e agente gelificante. O meio MS é universalmente usado especialmente para morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas e caracteriza-se pela elevada concentração em sais minerais (QUISEN et al., 2008).

O meio Gamborg B5 foi desenvolvido por Gamborg et al. (1968) e contém quantidades mais baixas de sais minerais, o que parece ser preferido pelas células de determinadas espécies (QUISEN et al., 2008). O meio WPM (LLOYD e MC COWN, 1981) ou meio para plantas lenhosas é amplamente utilizado para arbustos e árvores em laboratórios comerciais. Para complementar as substâncias biossintetizadas pela planta, são adicionados vários compostos orgânicos para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS et al., 1998).

Para Souza et al., (2006) basicamente, os meios consistem de uma mistura balanceada de macronutrientes e micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento. Os macronutrientes são fornecidos ao meio em forma de sais, contendo nitrogênio na forma de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-), fósforo com íons fosfato (HPO_4^{2-} e H_2PO_4^-), enxofre como íon sulfato (SO_4^{2-}), e os que são absorvidos pelas células vegetais como cátions (Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^+). Os micronutrientes são Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, Co e I, sendo que estes são utilizados no meio B5 (GAMBORG et al., 1968) ou em misturas mais concentradas no meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

2.7.3 Reguladores de crescimento vegetal

Os fitormônios vegetais podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas (fitorreguladores) que são adicionados ao meio de cultura, com a finalidade de induzir

modificações nos padrões de crescimento e desenvolvimento do explante (TERMIGNONI, 2005).

Os reguladores vegetais são amplamente utilizados na suplementação dos meios de cultura para suprir deficiências hormonais, e também estimular o desenvolvimento da planta durante todo o processo de micropropagação (WERBROUCK e DEBERGH, 1994).

As principais classes de hormônios são as citocininas e auxinas responsáveis pela indução e multiplicação de gemas na maioria das espécies de vegetais, com variações nas concentrações exógenas necessárias (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). A alta relação citocinina-auxina promove a formação de brotos, e o oposto ocasiona a diferenciação da raiz (GUERRA e NODARI, 2006; MORAES et al., 2007). Entretanto, as concentrações mais utilizadas destes hormônios, normalmente, giram em torno de 0,1 e 5,0 mg/L (AYUB e GEBIELUCA, 2003).

Peixoto (2010) descreve que as auxinas são produzidas principalmente nas regiões apicais (gema apical) e translocadas de modo polar para a raiz. Esse transporte ocorre preferencialmente nas células do parênquima associadas ao tecido vascular (TAIZ e ZEIGER, 2009). Para Dixon e Gonzáles (1994) as auxinas mais utilizadas na técnica de cultura de tecidos são: AIA (Ácido 3-indol-acético), o IBA (Ácido 4-indol-butírico), o 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético), o *ApCFA* (Ácido *p*clorofenexiacético) e o ANA (Ácido 1-naftalenoacético).

A ação das auxinas é verificada na indução do alongamento celular e diferenciação de raízes em culturas *in vitro*, entre muitas outras ações como: indução de embriogênese, o aumento da friabilidade de calos, o alongamento de entrenós etc, (QUISEN et al., 2008). Os principais efeitos podem ser resumidos em: a) alongamento celular por mitose e vacuolização; b) dominância apical; c) inibição do crescimento da raiz principal, d) diferentes concentrações atingem órgãos diferentemente; e) estimula a partenocarpia (frutos sem sementes); f) o efeito depende do tecido alvo, do meio químico e da concentração (PEIXOTO, 2010).

As citocininas constituem um grupo de reguladores indispensáveis à divisão celular, quebra de dormência apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias, indução de parte aérea em calos (QUISEN et al., 2008; TAIZ e ZEIGER, 2009).

A concentração de citocinina nas plantas pode variar em função do órgão considerado, do estado de desenvolvimento da planta, bem como das condições ambientais. De modo geral,

as maiores concentrações de citocininas são encontradas em regiões meristemáticas ou em órgãos em crescimento com altas taxas de divisão celular, como folhas jovens, sementes em desenvolvimento, frutos e raízes.

No entanto, o meristema apical da raiz é o principal local de síntese de citocininas em plantas e estas são translocadas via xilema para a parte aérea da planta; quando se encontram nas folhas, são relativamente imóveis (COLL et al., 2001; VIEIRA e CASTRO, 2004; TAIZ e ZEIGER, 2009).

Dixon e Gonzáles (1994) descrevem que as citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a KIN (6-furfurilaminopurina, também conhecida como cinetina), o BAP (6-Benzilaminopurina), o 2ip (N-Isopentilaminopurina), Zea (Zeatina) e TDZ (Thidiazuron).

3. OBJETIVOS

3.2 Objetivo geral

Estabelecer um protocolo para produção de plântulas de *C. ferrea in vitro*, visando futuros programas de melhoramento genético, produção de metabólitos secundários assim como montagem de um banco de germoplasma da espécie.

3.2 Objetivos específicos

- Elaborar um protocolo de assepsia e germinação *in vitro* de sementes de *C. ferrea*.
- Avaliar o melhor tipo e concentração de citocinina para indução de maior taxa de multiplicação *in vitro* de explantes de *C. ferrea*;
- Determinar qual a melhor posição da gema na haste para produzir a maior taxa de multiplicação *in vitro* de explantes de *C. ferrea*;
- Avaliar o melhor meio de cultura e sua diluição para a multiplicação *in vitro* de *C. ferrea*;
- Avaliar o melhor tipo e concentração de auxina que induzirá a maior taxa de enraizamento de *C. ferrea*;
- Estabelecer metodologia para aclimação das plântulas em viveiro.

CAPÍTULO I**MICROPROPAGAÇÃO DE *Caesalpinia ferrea* Martius**

Resumo

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação do Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart) espécie nativa da Amazônia com potencial medicinal, ornamental e madeireiro. As sementes foram coletadas do Banco de Sementes do Laboratório de Microbiologia e Fertilidade do Solo do INPA e, após o beneficiamento, foram submersas por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,0%, 0,10%, 0,25%, 0,50% e 1,0% e inoculadas em meio de cultura de MS basal. O tratamento com 0,25% do agente desinfestante possibilitou 90% de germinação *in vitro* de sementes. Os explantes germinados *in vitro* foram segmentados e inoculados no meio de cultura MS suplementado com 0,1 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de IBA. Os resultados indicam que 100% de explantes apresentaram brotações e 32,21% desenvolveram sistemas radiculares e ausência total de calos. Foi observado que 90% dos explantes originados das gemas desenvolveram brotos com 2,73 cm de altura e maior taxa de multiplicação (10,21%). A aclimação de explantes de *C. ferrea* foi possível sem a presença de raízes desenvolvidas *in vitro* e, que o substrato terra é o mais indicado para a aclimação, apresentando 63,33% de plantas vivas. Concluímos que esta espécie pode ser propagada *in vitro*, entretanto, é necessário aprofundar os estudos sobre a aclimação das plantas multiplicadas *in vitro* na casa de vegetação.

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia possui uma flora riquíssima com imenso potencial terapêutico. Dentre as numerosas famílias de plantas encontradas no Amazônia destaca-se a Fabaceae e em especial a espécie *Caesalpinia ferrea* conhecida popularmente como Jucá (LORENZI, 2002). É uma planta medicinal utilizada pela população da região do nordeste do Brasil, na forma de chás a partir do pó da casca de Jucá que é usado para o tratamento de feridas cutâneas, febre, aívio da tosse crônica, afecções homoptísicas pulmonares, no combate a anemia e diabetes apresentando bons resultados, o que desperta grande interesse nos estudos biotecnológicos e farmacológicos dessa espécie (XIMENES 2004; ROQUE et al., 2010).

Estudos com *C. ferrea* realizados por Nozaki et al. (2007) e Ohira et al. (2013), identificaram atividade cancerígena contra a topoisomerase II humana, e inibição do crescimento das células por meio da indução de apoptose, podendo ser utilizado como importante ferramenta no tratamento da leucemia HL60 humana (mieloide aguda). Entretanto, é necessário aprofundar os estudos farmacológicos visando a obtenção de produtos a serem utilizados em seres humanos.

O extrativismo praticado nas populações naturais da *C. ferrea* contribuiu para a erosão genética e a perda de valiosos genótipos da espécie (BENEDITO, 2012). Logo, é necessário aperfeiçoar os métodos de propagação visando programas de melhoramento genético ou plantios comerciais. A técnica de micropropagação possibilita a multiplicação de propágulos

de alta qualidade e rejuvenescidos fisiologicamente em curto espaço de tempo e com garantia fitossanitária e de estabilidade genética das mudas (CHAVES et al., 2006; TONIETTO et al., 2008).

Desse modo, este trabalho objetivou estabelecer uma metodologia de propagação *in vitro* de *C. ferrea*, visando corroborar informações relevantes e inéditas que possam ser utilizadas para a conservação e multiplicação da espécie, tornando possível no futuro, o desenvolvimento de fitoterápicos a partir desta espécie de maneira sustentável.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola Superior de Tecnologia – EST/UEA. As sementes de Jucá utilizadas foram coletadas do Banco de Sementes do Laboratório de Microbiologia e Fertilidade do Solo do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em janeiro de 2014. Esta espécie da família Fabaceae foi identificada pelo Prof. Dr. Luiz Augusto Gomes de Souza e a excicata encontra-se depositada no Herbário do INPA sob o número 228.022.

Os explantes tipo segmento nodal de *C. ferrea* utilizados nos experimentos de multiplicação foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\pm 5\%$ de umidade relativa e 16h de fotoperíodo com intensidade luminosa de $2.0\times 10^7 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$, provenientes de duas lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W).

Os meios MS, B5 e WP foram constituídos pelos sais e concentrações mencionados na Tabela 3. Estes meios foram suplementados com reguladores de crescimento vegetal especificados em cada experimento, acrescido de 30,0 g/L de sacarose e o pH foi acertado para 6,0.

2.1 Experimento 1: Assepsia e germinação *in vitro* de sementes de *C. ferrea*

Foram utilizadas 150 de sementes de *C. ferrea* que foram submetidas ao método de escarificação mecânica, de acordo com o seguinte procedimento: as sementes foram escarificadas em pedra de esmeril para produzir uma pequena abertura para entrada de água na semente. Após a escarificação, preferencialmente do lado oposto ao hilo (ponto onde a semente se prende ao fruto), as sementes foram submetidas à assepsia conforme descrito abaixo.

As sementes foram lavadas com detergente ODD[®] neutro e enxaguadas em água corrente por um minuto. Em seguida, foram imersas em solução de Derosal[®] 2,0% (v/v) por 1 hora sob agitação constante a 100 rpm. E logo após, as sementes foram imersas em álcool 70% durante 1 minuto e depois mergulhadas, respectivamente em diferentes soluções de hipoclorito de sódio: 0,0%; 0,10%; 0,25%; 0,50% e 1,0% (v/v) por 30 minutos, também sob a mesma agitação. Posteriormente, as sementes foram lavadas por 4 vezes com água destilada estéril e então, inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS basal, acrescentado de 30,0 g/L de sacarose e 7,0 g/ L de agar-agar, e o pH foi aferido para 6,0. Estas sementes foram mantidas em sala de crescimento, e após 30 dias, foram avaliadas

quanto à presença ou ausência de microorganismos, taxa de sobrevivência e porcentagem de germinação.

Tabela 3. Composição dos meios basais MS de Murashige & Skoog (1962), B5 de Gamborg et al. (1968) e WPM de Lloyd & McCown (1980).

Concentração dos Componentes para 1 Litro de Meio de Cultura			
Componentes	Meio MS	Meio B5	Meio WP
Macronutrientes (mg/L)			
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556
NH ₄ NO ₃	1,650	-	400
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-
KNO ₃	1,900	2,500	2,500
CaCl ₂ .H ₂ O	440	150	96
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	300
KH ₂ PO ₄	170	-	170
KCl	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150	-
K ₂ SO ₄ .4H ₂ O	-	-	990
Micronutrientes (mg/L)			
MaSO ₄ .4H ₂ O	22,3	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	10	22,3
ZnSO ₄ .7.H ₂ O	8,6	2,0	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	6,2
KI	0,83	0,75	0,83
MoO ₃	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,25	0,25	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	-
FeEDTA (mg/L)			
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	-	37,7
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	-	27,8
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-
Vitaminas e Aminoácidos (mg/L)			
Ácido nicotínico	0,5	1,0	0,5
Piridoxina.HCl	0,5	1,0	0,5
Tiamina.HCl	0,1	1,0	1,0
Glicina	2,0	-	2,0
Mio-inositol (mg/L)			
Mio-inositol	100	100	100
Sacarose (g/L)			
Sacarose	30	30	20
Ph			
pH	6,0	6,0	6,0

2.2 Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de *C. ferrea*.

Para este experimento foram utilizados 390 segmentos nodais retirados de plântulas de *C. ferrea* axênicas crescidas *in vitro* e foram inoculados em meio de cultura MS suplementados com BAP, KIN e TDZ nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 3,0 e 5,0 mg/L. Após 30 dias de crescimento nesses meios de cultura, os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de explantes com brotação, ao número de brotos por gema, ao número de gemas por haste, à taxa de multiplicação, à altura dos brotos e à presença de calos e raízes.

2.3 Experimento 3: Efeito de diferentes posições da gema na haste quanto ao número médio e altura média das brotações de *C. ferrea*.

Foram utilizadas 150 plântulas de *C. ferrea* obtidas a partir de explantes desenvolvidos *in vitro* em meio de cultura MS utilizadas neste experimento.

Gemas localizadas em diferentes posições no caule foram seccionadas e inoculadas em meio de cultura MS suplementado com 0,1 mg/L de BAP como mostra a Figura 4. Os explantes foram mantidos nesse meio de cultura por 30 dias e então avaliados quanto à porcentagem de explantes com brotação, ao número de brotos por gema, ao número de gemas por haste, à taxa de multiplicação, à altura dos brotos e à presença de calos e raízes.

Figura 4: Localização das gemas em uma plântula de *Caesalpinia ferrea*



Fonte: Daniel da Silva

2.4 Experimento 4: Efeito de diferentes diluições dos meios basais no número médio e na altura média das brotações de *C. ferrea*

Foram utilizados 180 explantes obtidos a partir de plântulas crescidas *in vitro* em meios de cultura MS, foram inoculados em meio de cultura WP, MS e B5 nas concentrações

originais, bem como em suas concentrações diluídas pela metade e por quarto, todos suplementados com 0,1 mg/L de BAP. Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de explantes com brotação, ao número de brotos por gema, ao número de gemas por haste, à taxa de multiplicação, à altura dos brotos e à presença de calos e raízes.

2.5 Experimento 5: Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxinas no enraizamento nodais de *C. ferrea*.

Para este experimento foram utilizado 390 segmentos nodais de 7,0 cm de altura foram retirados de plântulas de *C. ferrea* axênicas crescidas *in vitro* e então inoculadas no meio de cultura MS na concentração original, acrescido de 0,1 mg/L de BAP e suplementado com ANA, AIA e IBA nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 3,0 e 5,0 mg/L. Após 30 dias de crescimento nesses meios de cultura, os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de explantes com brotação, ao número de brotos por gema, ao número de gemas por haste, taxa de multiplicação, a altura dos brotos e a presença de calos e raízes.

2.6 Experimento 6: Aclimatação

Para este experimento foram utilizados 150 plântulas multiplicadas *in vitro* sem raízes e com parte aérea aproximadamente de 7 cm de altura, e então, foram lavadas com água destilada até a retirada total de resíduos de meios de cultura e posteriormente foram plantadas em bandejas de polietileno com divisória com as dimensões de 41x27x8 cm (comprimento, largura e altura), compostas, respectivamente, pelos seguintes substratos: húmus de minhoca[®], vermiculita[®], 100% terra vegetal, 100% areia e 1:1:1 terra+areia+vermiculita. Os substratos foram autoclavados por 1 hora a 120°C.

Estas plântulas foram mantidas cobertas por frascos de vidro transparente durante 30 dias, no Viveiro do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola Superior de Tecnologia EST-UEA, quando após esse período, os vidros foram retirados. Após 30 e 60 dias do plantio, as plântulas foram avaliadas quanto a sua sobrevivência ou não em ambiente *ex vitro*.

2.7 Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e foram utilizados três repetições compostas de 10 explantes por tratamento (N = 30). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com o nível de 5% de significância, utilizando o programa ASSISTAT[®] versão 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *C. ferrea*.

A assepsia do material vegetal é de fundamental importância na micropropagação e, sendo efetuada com sucesso, evitará contaminação no meio de cultura por fungos e bactérias, que ocasionam perdas do material vegetativo e do meio de cultura e, por isso, é necessário enorme cautela em relação a esta etapa, desde o corte do material no campo até o manuseio na câmara de fluxo laminar (XAVIER et al., 2009).

Os tratamentos de assepsia realizados em sementes de *C. ferrea* com a utilização do hipoclorito de sódio foram eficazes, uma vez que promoveram sementes vivas e axênicas (Tabela 4). A assepsia indicada para as sementes desta espécie é o tratamento com 0,25% de hipoclorito de sódio, uma vez que este proporcionou 96,67% de sementes vivas e axênicas, e, além disso, obtiveram-se as menores porcentagens de contaminação: 6,67% por fungos e ausência total de bactérias, comparado com os demais tratamentos, o que representa uma excelente taxa de descontaminação, indicando que concentrações muito baixas desta substância são eficazes para a desinfestação destes explantes. Nos demais tratamentos, houve baixa contaminação por fungos (entre as concentrações de 0,10%; 0,25%; 0,50% e 1,0% NaOCl), sem diferença significativa entre as concentrações de hipoclorito de sódio. Esse fato pode ser atribuído ao grande potencial do hipoclorito de sódio, que penetra na parede celular das bactérias, e desativa uma enzima essencial à sobrevivência dos microorganismos (MEYER, 1994).

Assim como constatado neste trabalho, Silva et al., (2012) obtiveram bons resultados na desinfestação de sementes de *Myrciaria dúbia* (camu-camu), expostas às baixas concentrações de hipoclorito de sódio, sendo estes os que apresentaram maiores taxas de desinfestação ao final de 35 dias após a inoculação, alcançando 0% de contaminação.

Resultados semelhantes foram encontrados por RIBAS et al., (2005) os quais observaram que o uso do hipoclorito de sódio na concentração de 0,25% foi satisfatório para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa, tendo em vista que este tratamento proporcionou 70% de sobrevivência.

Por outro lado, maiores porcentagens de contaminações foram obtidas nos tratamentos utilizados como controle em que não se utilizou hipoclorito de sódio e/ou Derosal[®], ou seja, as sementes ficaram imersas em água destilada. Nascimento et al., (2007) testando a desinfestação de sementes de *Parapiptadenia rigida*, verificaram 100% de

contaminação quando as sementes não eram submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. Esse resultado evidencia a eficiência do hipoclorito de sódio na desinfestação e controle da sanidade do material introduzido *in vitro*.

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação de sementes de *Caesalpinia ferrea*

Tratamento com NaOCl	Explantos		Contaminação		Germinação
	Mortos (%)	Vivos (%)	Fungos (%)	Bactérias ^(*) (%)	Sementes (%)
0,0%	100,00 a	0,00 b	100,00 a	23,67	0,00 b
0,10%	30,00 b	70,00 a	20,00 b	*	70,00 a
0,25%	3,33 c	96,67a	6,67 b	*	90,00 a
0,50%	20,00 bc	80,00 a	10,00 b	*	80,00 a
1,0%	20,00 bc	80,00 a	10,00 b	*	73,33 a

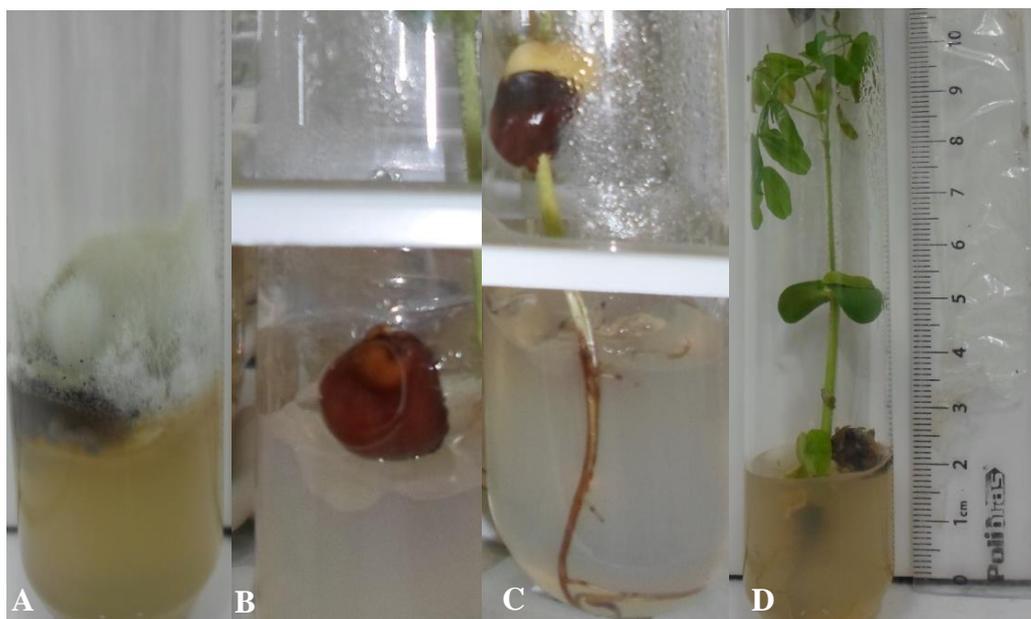
Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

^(*) Nesta tabela não foi feito o teste de Tukey da presença de bactérias, porque apenas o controle induziu esta característica. NA= não avaliado.

Os resultados relativos quanto ao percentual total de plântulas germinadas em meio MS basal encontra-se na Tabela 4. Observou-se que as concentrações de 0,25%, 0,50%, 1,0% e 0,10%, de hipoclorito de sódio, promoveram 90%, 80%, 73% e 70% de germinação *in vitro* de sementes de *C. ferrea*, respectivamente. Estes percentuais de germinação sugerem alto poder germinativo *in vitro* de *C. ferrea*, quando comparada com a germinação dessa espécie em campo variando entre 50-60% (Lorenzi, 1992) e com outras espécies medicinais, como é o caso do Pé-de-perdiz (OLIVEIRA et al., 2011) e da Copaíba (NOLETO e SILVEIRA, 2004) que não apresentam boa germinação *in vitro* ou necessitam de período mais longo para germinar.

Portanto, esta espécie possui uma alta e rápida taxa de multiplicação, que é o número de brotos por gema multiplicado pelo número de gemas por haste (SANTOS et al., 2006), de modo que, após um mês de inoculação *in vitro*, uma única plântula é capaz de dar origem a 10 novos segmentos nodais em média (Figura 5-D), tornando possível assim, a proposta de desenvolver um protocolo de micropropagação para este vegetal a partir desta assepsia.

Figura 5. Sementes de *Caesalpinia ferrea*, cultivadas em tubos de ensaios com meio MS basal, suplementado com sacarose e ágar®: (A) contaminada, (B) não germinada, (C) germinada e (D) plântula.



Fonte: Daniel da Silva

3.2 Experimento 2: Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de *C. ferrea*.

Os reguladores apresentaram diferença significativa nas concentrações em todas as características analisadas conforme é mostrado na Tabela 5. Através dos experimentos realizados com diferentes concentrações das citocininas BAP, KIN e TDZ, fica indicado, para a multiplicação *in vitro* de *C. ferrea*, o tratamento com 0,1 mg/L de BAP, uma vez que este proporcionou a maior taxa de explantes com brotações (100%), bem como os maiores números de brotos gemas (3,37), gemas por haste (2,70), altura do broto (1,52cm), além de não ter induzido calos, e principalmente por promover 9,09 de taxa de multiplicação (n° brotos x n° gema), sendo o maior valor em relação a todos os outros fitorreguladores. Segundo Santos et al. (2006) a taxa de multiplicação é um parâmetro importante por que permite verificar a velocidade do processo de propagação *in vitro*. Isso vem comprovar a importância do genótipo na diferenciação celular. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), BAP é a citocinina mais potente para promover proliferação de brotações de parte aérea, com a vantagem de apresentar um menor custo econômico.

Estes resultados foram semelhantes ao encontrados por Saha et al. (2012) e Diniz (2014) respectivamente, que ao avaliarem diferentes citocininas na multiplicação *in vitro* de *Ocimum gratissimum* e *Rosa chinensis*, ambos constataram que o maior número médio de brotos e gemas foram produzidos em meio de cultura contendo baixas concentrações de BAP.

O mesmo fitorregulador foi também o que mais induziu a maior taxa de explantes com brotações, bem como a formação de brotos e gemas em explantes de *Eugenia uniflora* (SOUZA et al., 2008), *Croton antysphiliticus* (OLIVEIRA et al., 2011), *Stevia rebaudian* (THIYAGARAJAN e VENKATACHALAM, 2012) e *Mandevilla moricandiana* (CORDEIRO et al., 2012).

Convém ressaltar que esta citocinina pode responder de maneira não favorável ao desenvolvimento *in vitro* de outras espécies, como exemplos disso foram relatados com explantes de *Copaifera langsdorfii* e *Byrsonima intermedia* que não apresentaram nas concentrações avaliadas de BAP o aumento de múltiplas brotações como o esperado (NOLETO e SILVEIRA, 2004; NOGUEIRA et al., 2004).

Quanto a presença de calos na base dos explantes, as citocininas BAP e KIN (5,0 mg/L), TDZ (1,0; 3,0; e 5,0 mg/L) foram as que promoveram as maiores porcentagens de calos 90%, 58,89%, 6,67% e 20% e 100%, respectivamente. Porém, foi observado durante o estudo que a formação de calos na base dos propágulos de *C. ferrea* interferiu no desenvolvimento dos explantes *in vitro*, uma vez que o TDZ, juntamente com o KIN, mostraram-se menos efetivos na taxa de multiplicação e altura de brotações desta espécie (Tabela 5).

Assim como nos resultados obtidos em *C. ferrea*, Santos et al. (2013), ao estudar Erva-baleeira (*Varronia curassavica*), Silva et al. (2010,) em seu estudo com Sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn), e Torres et al., (2005) ao trabalhar com *Heliconia rostrata*, observaram que tais plantas também não responderam eficazmente aos tratamentos com TDZ e KIN. Porém, conforme Ribeiro et al. (2010), Moreira (2011) e Bertoni et al. (2013), estes reguladores de crescimento vegetal proporcionaram melhor capacidade organogênica com satisfatória proliferação de brotos em Mamoneira (*Ricinus communis*), Curauá (*Ananas comosus*) e Bolsa de pastor (*Zeyheria montana*), respectivamente.

De acordo com Rezende et al., (2011) os tratamentos acrescidos de pequenas concentrações de citocininas, além de menos onerosos, apresentam ainda menor probabilidade de indução de variação somaclonal, que é uma característica imprópria para um protocolo de micropropagação, processo este que produz clones elite de uma determinada espécie e, alterações genéticas nestes indivíduos podem levar à perda justamente da característica desejada.

Tabela 5. Efeitos de diferentes concentrações e tipos de citocininas no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Caesalpinia ferrea*.

Regulador Vegetal	Explantes com Brotações (%)	Nº de Brotos por Gema (*)	Nº de Gema por Haste (**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do Broto (cm)	Presença de Calo (%)	Presença de Raiz (a) (%)
Controle	76,67 a	1,13 cd	2,06 ab	2,32	0,37c	0,00 d	---
BAP (mg/L)							
0,1	100,00 a	3,37 a	2,70 a	9,09	1,52a	0,00 d	---
1,0	93,00 a	2,66 a	1,76 ab	6,37	1,20 ab	0,00 d	---
3,0	93,00 a	2,56 ab	2,15 ab	4,68	1,29ab	0,00 d	---
5,0	20,00 bc	1,00 cd	1,20 bc	1,20	0,15 c	90,00 a	---
KIN (mg/L)							
0,1	90,00 a	1,43 c	1,73 ab	2,47	1,21 ab	0,00 d	---
1,0	86,00 a	1,40 c	2,23 ab	3,12	0,70 bc	0,00 d	---
3,0	83,33 a	1,36 c	2,06 ab	2,80	0,80 abc	0,00 d	---
5,0	56,67 ab	1,46 bc	1,07 bc	1,56	0,79 abc	58,89 b	---
TDZ (mg/L)							
0,1	86,67 a	1,28 c	1,61 ab	2,06	0,63 bc	0,00 d	---
1,0	86,67 a	1,23 cd	1,56 ab	1,91	0,73 bc	6,67 cd	---
3,0	83,33 a	1,03 cd	1,56 ab	1,60	0,65 bc	20,00 c	---
5,0	3,33 c	0,13 d	1,30 bc	0,16	0,13 c	100,00 a	---

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (*) x (**): Taxa de multiplicação obtida pelo do número de brotos por gema multiplicado pelo número gema por haste (SANTOS et al., 2006).

(a) Nesta tabela não foi feito o teste de Tukey da presença de raiz, porque nenhum tratamento induziu esta característica. NA= não avaliado.

Com este experimento foi possível verificar que nenhum dos tratamentos de citocininas induziu a formação de raízes (Tabela 5). Conforme Assis e Teixeira, (1998) o mecanismo de iniciação radicular em tecidos caulinares, principalmente no aspecto da fisiologia da diferenciação, é ainda pouco compreendido, pois os reguladores de crescimento apresentam efeitos diversos no metabolismo, no crescimento e na diferenciação, afetando outros processos fisiológicos (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

As citocininas participam ativamente dos processos de divisão, alongamento e diferenciação celular, principalmente quando interagem com as auxinas (TAIZ e ZEIGER, 2009; PEIXOTO, 2010). Vale ressaltar que a adição de citocininas é favorável, ou em alguns casos é essencial para o desenvolvimento de explantes *in vitro* e, a

concentração utilizada depende da espécie e tipo de explante (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

3.3 Experimento 3: Efeito de diferentes posições da gema no desenvolvimento *in vitro* de *C. ferrea*.

Para a propagação *in vitro* os explantes mais indicados são ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados, por terem crescimento vegetativo determinado e apresentarem capacidade de se desenvolverem normalmente quando supridas suas necessidades nutricionais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os experimentos realizados com diferentes posições da gema de *C. ferrea* avaliados aos 30 dias apresentaram diferença estatística significativa ao nível de 5% quanto ao número de brotos por gema, gema por haste e altura do broto (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito das diferentes posições da gema no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Caesalpinia ferrea*.

Posição da Gema	Explantes com Brotações (%)	Nº de Brotos por Gema (*)	Nº de Gema por Haste (**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do Broto (cm)
1	76,67 a	2,70 b	1,93 ab	5,11	1,65 b
3	83,00 a	2,66 b	1,63 b	4,33	2,25 ab
5	90,00 a	4,66 a	2,33 a	10,85	2,73 a
7	90,00 a	3,10 ab	2,00 ab	6,20	2,18 ab
9	80,00 a	3,03 ab	1,76 ab	5,33	2,49 ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (*) x (**):

Taxa de multiplicação obtida pelo do número de brotos por gema multiplicado pelo número de gema por haste (SANTOS et al., 2006).

Gemas coletadas em diferentes posições da haste foram avaliadas quanto à capacidade de regenerar novas brotações e, com este experimento, verificou-se que as gemas de posição intermediária (5) induziram uma maior porcentagem de explantes com brotação (90%), e maior taxa de multiplicação (10,85%), e, além disso, promoveram o maior número de brotos (4,66) e gemas na haste (2,33) quando comparada com as demais gemas, embora não haja diferença estatística quanto à porcentagem de explantes com brotações observadas em todas as posições (1, 3, 5, 7 e 9) da gema de *C. ferrea* (Tabela 6).

Respostas semelhantes foram encontradas em estudo realizado com a micropropagação de Jambu (*Acmella oleracea*), cujas gemas intermediárias induziram a maior porcentagem de explantes com brotação. Isso demonstra que nem todas as posições das

gemas na haste são potencialmente úteis, e não devem ser usadas indistintamente no processo de repicagem, pois não fornecerão explantes uniformes quanto ao desenvolvimento *in vitro* (MALOSSO et al., 2008). No entanto, na prática procura-se utilizar explantes com maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Em culturas *in vitro* de quatro variedades de *Prunus spp* (Mr. S. 2/5, Nemared, Flordaguard, Nemaguard) foi constatado que as gemas basais promoveram maior porcentagem de brotações (ROCHA et al., 2005). Os mesmos resultados foram obtidos em culturas de *Prunus spp* ‘GxN-9’ por RADMANN et al., (2009). Porém, em estudos realizados com a micropropagação de *Croton antysphiliticus* (OLIVEIRA et al. 2011) e *Macrosyphonia velame* (MARTINS et al. (2011), verificou-se que as gemas apicais promovem a maior porcentagem de explantes com brotações e, além disso, maior altura das brotações e maior número de gemas por haste (6,15), o que possibilitou a obtenção de um maior índice de multiplicação *in vitro* para estas espécies. E com os trabalhos realizados por Reis et al. (2004) e Malosso et al. (2012), observou-se que não houve diferença da posição dos explantes para a multiplicação de Ipeca e Carobinha, respectivamente.

Trabalhos realizados com outras espécies, a exemplo de *Maytenus ilicifolia* e *Mandevilla velutina*, também mostraram a importância de se investigar a posição da gema para a obtenção de maior número de brotos por explante (PEREIRA et al., 1995; BIONDO et al., 2007).

3.4 Experimento 4: Efeito de diferentes diluições dos meios de cultura no desenvolvimento *in vitro* de *C. ferrea*.

A alta concentração de sais dos meios MS, B5 e WP podem ser inadequadas ao processo morfogênico de algumas espécies, para isso muitas modificações têm sido sugeridas com intuito de melhorar a adaptação das culturas *in vitro* e ao mesmo tempo redução dos custos (JESUS et al., 2003). Explantes de *C. ferrea* foram cultivados em meios de cultura basais MS, B5 e WP e foram avaliados quanto à porcentagem de brotação, à taxa de multiplicação, à altura do broto e presença ou ausência de raiz.

De acordo com a Tabela 7, verifica-se que houve diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade em todos os parâmetros analisados para diferentes diluições dos meios de cultura MS, MS/2, MS/4, B5, B5/2, B5/4, WP, WP/2 e WP/4.

O meio de cultura B5 na concentração original, bem como diluída pela metade e por um quarto dos meios MS e WP, promoveu bom desenvolvimento dos explantes, entretanto,

produziu calos na base das plântulas o que representa um inconveniente para a etapa seguinte que é o enraizamento. O meio de cultura B5 na concentração original ou diluída, bem como os meios WP e MS nas concentrações diluídas pela metade e por um quarto, promoveram as menores taxas de multiplicação desta espécie e as três concentrações destes dois meios de cultura induziram as menores alturas de broto (0,89cm, 0,77cm e 0,32, respectivamente), quando comparadas com os meios de cultura MS e WP na concentração original (Tabela 7). Todos estes resultados evidenciam que a escolha do meio de cultura é extremamente importante para o sucesso de protocolo de micropropagação de *C. ferrea* com a finalidade de proporcionar a multiplicação de um maior número de plantas e deste modo garantir a conservação da espécie.

Tabela 7: Efeito de diferentes diluições dos meios de cultura basais, Murashige e Skoog (MS), Gamborg (B5) e Wood Plant (WP) e suas diluições pela metade e pela quarta parte, no desenvolvimento *in vitro* de explantes *Caesalpinia ferrea*.

Meio de Cultura Basal e Diluições	Explantos com Brotações (%)	Nº de Brotos por Gema (*)	Nº de Gema por Haste (**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do Broto (cm)	Presença de Calo (%)	Presença de Raiz ^(a) (%)
MS	90,00 a	3,36 a	2,90 a	9,74	2,00 a	0,00 b	---
MS/2	66,67 ab	1,56 bc	1,36 bc	3,68	1,02 bc	20,00 a	---
MS/4	86,67 a	1,83 abc	1,56 bc	2,85	0,89 bc	6,77 ab	---
B5	70,00 ab	1,50 bc	1,46 bc	2,19	1,05 bc	6,6 ab	---
B5 /2	73,33 ab	1,50 bc	1,60 bc	2,40	1,09 bc	0,00 b	---
B5 /4	70,00 ab	1,56 bc	1,63 abc	2,54	1,03 bc	0,00 b	---
WP	96,67 a	2,96 ab	2,43 ab	7,19	1,42 ab	0,00 b	---
WP /2	66,67 ab	1,60 bc	1,26 bc	2,01	0,77 bc	0,00 b	---
WP /4	40,00 b	0,56 c	0,50 c	0,28	0,32 c	23,00 a	---

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (*) x (**): Taxa de multiplicação obtida pelo do número de brotos por gema multiplicado pelo número de gema por haste (SANTOS et al., 2006).

^(a) Nesta tabela não foi feito o teste de Tukey da presença de raiz, porque nenhum tratamento induziu esta característica.

Portanto, fica indicado para a multiplicação *in vitro* desta espécie o meio de cultura MS na concentração original, uma vez que este tratamento induziu 90% de explantes com brotação e ausência total de calos, maiores números de brotos por gema (3,36) e gema por haste (2,96) e, além disso, maior taxa de multiplicação (9,74) quando comparado com os demais tratamentos. Entretanto, foi observada diferença estatística significativa ao nível de 5% entre os meios de cultura MS e WP na concentração original (Tabela 7). Esse resultado

corroborar vários trabalhos realizados com plantas da Amazônia a exemplo de *Cissus sicyoides* (ABREU et al., 2003), *Acmella oleracea* (MALOSSO et al., 2008), *Ananas comosus* (MOREIRA et al., 2011) além das espécies *Baccharis tridentata* (KAJIKI e SHEPHERD, 2006) e *Allium sativum* (LONGO, 2009).

Outro fato importante que pode ser observado na Tabela 7 é que nenhum tratamento induziu raízes nos explantes, e de acordo com Nascimento (2007), pode ter ocorrido que as raízes surgidas *in vitro* no experimento foram provenientes de fitoreguladores endógenos dos explantes utilizados e não pela presença do BAP no meio de cultura. Esse dado mostra que os explantes desta espécie podem ser inoculados em meio com BAP, mas que, no entanto, após 30 dias, devem ser transferidos para outro meio de cultura que contenha auxinas para a indução de enraizamento. Dessa forma, se faz necessária a montagem de experimentos para o enraizamento *in vitro* para o Jucá. Além disso, um dos principais fatores que interferem na propagação *in vitro* é a suplementação do meio de cultivo com reguladores de crescimento vegetal (ASMAR et al., 2012).

3.5 Experimento 5: Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxinas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de *C. ferrea*.

Na Tabela 8 pode-se observar que houve diferença estatística significativa para as características explantes com brotações, número de brotos por gema, número de gemas por haste, taxa de multiplicação, altura do broto, presença de calos e raízes para todos os tratamentos analisados com ANA, AIA e IBA. No entanto, os tratamentos com 3,0 e 5,0 mg/L de ANA, AIA e IBA, induziram a formação de calos, o que é indesejável para esta metodologia de cultura de tecidos vegetais, como já dito anteriormente. Os tratamentos com 1,0 mg/L de ANA, 3,0 mg/L de AIA e 5,0 mg/L de IBA não promoveram raízes e, consequentemente apresentaram as piores taxas das demais características analisadas para a elaboração do protocolo de micropropagação. Já nos tratamentos com controle (testemunha), 0,1 mg/L de ANA, 0,1 e 1,0 mg/L de AIA e 1,0 mg/L de IBA induziram a formação de raízes, porém ocorreu uma diminuição da taxa de explantes com brotações (66,67% para controle, 0,1 mg/L de AIA, e 1,0 mg/L de IBA; 56,67% para 0,1 mg/L de ANA; 63,33% para 1,0 mg/L de AIA).

O tratamento com 0,1 mg/L de IBA foi o melhor resultado obtido para enraizamento *in vitro* de *C. ferrea*, uma vez que este proporcionou a maior taxa de explantes com brotações (80%), maior número de brotos por gema (3,20), gemas por haste (2,03), altura do broto

(1,90 cm), ausência de calos, taxa de multiplicação (6,50) e principalmente por ter induzido a maior taxa de enraizamento (30%) quando comparado com os demais (Tabela 8).

Assim, fica indicado para o enraizamento desta espécie o tratamento com 0,1 mg/L de IBA por ser usado em menor quantidade que os demais tratamentos, sendo portanto vantajoso economicamente, pois o uso de uma menor quantidade de reguladores de crescimento torna o protocolo mais barato, além de que menores concentrações deste induzem menores taxas e variação somaclonal. No entanto, como as taxas de enraizamento ainda são muito baixas, sugere-se que novos estudos com outros reguladores de crescimento sejam realizados objetivando o aumento considerável da taxa média de enraizamento.

O enraizamento sob condições *in vitro* depende de vários fatores, entre os principais, encontram-se os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz, como juvenilidade genótipo, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, as condições ambientais de crescimento das plântulas *in vitro*, dentre outros (MORAES, 2007; SOUZA e PEREIRA, 2007).

Carvalho et al. (2006) relatam que as auxinas mais comumente empregadas nos meios de enraizamento *in vitro* são o ANA, IBA e AIA. E, por isso a maior parte dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, utilizam as auxinas ANA e IBA, devido a estabilidade em relação a outros fitorreguladores, como por exemplo o AIA. Mas os resultados quanto ao efeito positivo e/ou negativo destas auxinas, variam de modo significativo entre as espécies (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001).

Embora o presente trabalho não tenha apresentado bons resultados quanto ao desenvolvimento *in vitro* de raízes de *C. ferrea* expostas a diferentes concentrações de auxinas, há trabalhos que mostram a efetividade destes reguladores. Navroski (2011) cita que o IBA tem sido bastante usado por não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração e ser eficiente em uma grande variedade de espécies. Asghari et al. (2013) ao desenvolverem o protocolo de micropropagação para "Biji e Dongkui" cultivares de *Myrica rubra*, utilizando as auxinas AIA e IBA, verificaram que o IBA foi o mais eficiente no enraizamento *in vitro* desta espécie. Por outro lado, Shah et al., (2013) relata que o ANA foi mais eficaz na multiplicação *in vitro* de *Aristolochia indica* L. visto que proporcionou o aumento significativo no número de brotos e raízes.

Tabela 8. Efeitos de diferentes concentrações (mg/L) e tipos de citocininas no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Caesalpinia ferrea*.

Regulador Vegetal	Explantes com Brotações (%)	Nº de Brotos por Gema (*)	Nº de Gema por Haste (**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do Broto (cm)	Presença de Calo (%)	Presença de Raiz ^(a) (%)
Controle	66,67 a	3,10 a	1,90 a	5,89	0,37c	0,00 e	3,33 ab
ANA							
0,1	56,67 ab	2,36 ab	1,86 a	4,38	1,45 ab	0,00 e	16,67 ab
1,0	53,33 abc	1,56 abc	1,10 abc	1,71	0,70 bcd	0,00 e	0,00 b
3,0	13,33 cd	0,30 cd	0,30 bc	0,09	0,25 cde	40,00 cd	3,33 ab
5,0	16,67 bcd	0,33 cd	0,33 bc	0,10	0,11 de	40,00 cd	6,667 ab
AIA							
0,1	66,67 a	2,03 abc	1,70 a	3,45	1,28 abc	0,00 e	6,67 ab
1,0	63,33 a	2,23 ab	1,46 ab	3,25	0,98 abc	0,00 e	20,00 ab
3,0	16,67 bcd	0,53 bcd	0,40 bc	0,22	0,21 cde	66,67 bc	3,33 ab
5,0	3,333 d	0,06 d	0,67 c	0,04	0,05 de	73,33 ab	10,00 ab
IBA							
0,1	80,30 a	3,20 a	2,03 a	6,50	1,90 a	0,00 e	32,21 a
1,0	66,67 a	3,13 a	2,06 a	6,44	1,27 abc	0,00 e	20,00 ab
3,0	53,33 ab	3,16 a	1,93 a	6,09	1,09 abc	20,00 de	0,00 b
5,0	0,00 d	0,00 d	0,00 c	0,00	0,00 e	100,00 a	0,00 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (*) x (**).

Taxa de multiplicação obtida pelo do número de brotos por gema multiplicado pelo número de gema por haste (SANTOS et al., 2006).

Estudos realizados com micropropagação de *Dioscorea alata* L. conduzidos por Das et al. (2013) demonstraram que o meio de cultivo MS suplementado com 2,5 mg/L de AIA, foi mais eficaz na brotação e no enraizamento, quando comparado a baixas concentrações de AIA. Entretanto, as auxinas promovem o enraizamento, mas nem sempre a porcentagem de enraizamento e o número de raízes formadas podem ser maximizados com o aumento na concentração de auxina (NAVROSKI, 2011).

De um modo geral, o desenvolvimento do sistema radicular *in vitro* da Amazônia, representa um grande desafio a ser alcançado no âmbito de protocolos eficientes, com o emprego da técnica de micropropagação em diferentes espécies, entre elas, encontra-se a *C. ferrea*. Sobretudo, a rizogênese *in vitro* apresenta uma complexidade, devido aos vários fatores físicos e bioquímicos que estão diretamente relacionados com a formação de raízes.

3.6 Aclimação

A aclimação é um procedimento crítico de todo protocolo de micropropagação, para diversas espécies já relatadas na literatura. Se as condições ambientais e a elaboração do substrato não forem cuidadosamente controladas, corre-se o risco de perder grande quantidade de plantas e, conseqüentemente frustrar todo o trabalho de meses, obtidos nos estágios I, II e III do processo, como estabelecimento dos explantes, multiplicação dos propágulos e enraizamento das plantas, respectivamente (ROCHA, 2013).

A análise estatística revelou que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os substratos avaliados, quanto à porcentagem de sobrevivência após 30 e 60 dias do transplante (Tabela 9). O substrato terra foi o que proporcionou o maior percentual de sobrevivência (63,33%) de plântulas regeneradas em condições de viveiro, porém o mesmo substrato não diferiu significativamente dos substratos areia (50%) e areia+terra+vermiculita (1:1:1). Ainda na Tabela 9 verificou-se que o menor percentual de sobrevivência ocorreu quando as plântulas foram cultivadas em substrato comercial de húmus de minhoca[®] (10%). Nesta mesma tabela, após este mesmo período pode-se verificar uma queda de plantas aclimatadas nos substratos terra de 90% para 63,33%, areia de 70% para 53,37%, vermiculita de 70% para 30,67% e na combinação (1:1:1) de areia+terra+vermiculita de 80,67% para 50%.

Para a aclimação das plântulas de *C. ferrea* fica indicado o substrato terra, que proporcionou melhor índice de sobrevivência e, após 60 dias de plantio as plântulas permaneceram verdes e vigorosas (Figura 6). Esta planta cresceu e desenvolveu-se rapidamente neste substrato, quando comparada com os demais tratamentos, visto que este é semelhante ao que esta espécie encontra em ambiente natural e sendo mais propício à utilização como recurso nutricional. Deste modo pode-se aferir que esta grande diferença de índices de sobrevivência ocorreram devido à capacidade de retenção de água no solo. Este resultado mostra a possibilidade de aclimação com substrato de baixo custo, corroborando com os resultados encontrados por Vicente et al. (2009) e Silva et al. (2014) que também registraram resultados satisfatórios deste substrato na formação de mudas de alumã (*Vernonia condensata*) e noni (*Morinda citrifolia*).

O sucesso da aclimação pode ser atribuído à associação dos seguintes fatores: uso de solo autoclavado, controle de temperatura e umidade. Esses fatores certamente facilitaram uma passagem da condição heterotrófica para autotrófica.

Tabela 9. Porcentagem de explantes de *Caesalpinia ferrea* que sobreviveram à aclimação em diferentes tipos de substratos.

Substratos	Tempo de Aclimação (%)	
	30 dias	60 dias
Húmus de Minhoca ®	23,33 b	10,00 b
Vermiculita®	70,00 ab	36,67 ab
Terra	90,00 a	63,33 a
Areia	70,00 ab	53,37 ab
Terra+Areia+Vermiculita (1:1:1)	86,67 a	50,00 ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 6. Plântulas de *Caesalpinia ferrea* plantadas em bandejas de polietileno cobertas com vidro transparente durante 30 dias (A) e, após 60 dias (B) de plantio.



Fonte: Daniel da Silva

O procedimento de aclimação das plantas segundo Girardi & Pescador (2010), consiste na adaptação das plantas às condições ambientais após a remoção das condições *in vitro*, antes do transplante para local definitivo, método que por vezes acarreta baixo índice de sobrevivência das mudas em detrimento de baixa taxa fotossintética, deixando o vegetal não completamente autotrófico. Conforme Hartemann et al. (2004) o substrato deve proporcionar adequado equilíbrio de umidade, aeração, consistência, nutrientes, ausência de patógenos e sementes de plantas infestantes para o bom desenvolvimento da muda.

Um dos fatores que influenciou no elevado índice de mortalidade das plantas enraizadas está relacionado à contaminação por fungos que ocorreu em viveiro. Essa contaminação foi observada apenas no substrato de húmus de minhoca utilizado e comprometeu a fitossanidade das plântulas. Quando os frascos de vidro, depositados sobre as plântulas com função de manter a umidade, foram retirados, observou-se grande incidência de fungos no substrato. Os próximos experimentos de aclimação deverão ser realizados a partir em condições de estufa com irrigação pulverizada, o que é mais indicada ao processo de aclimação (MALOSSO, 2007).

Técnicas de aclimação visam proporcionar maior gradualidade na transição entre o ambiente *in vitro* e o externo. Dentre estas técnicas, destacam-se a utilização dos sistemas de “mist” e “fog”, que contribuem para manter o turgor vegetal e diminuir a demanda evaporativa (TAVEIRA, 2011).

Ainda segundo Taveira, (2011) existem outras técnicas que podem auxiliar na aclimação de plântulas, como é o caso do sistema Vitro-Plug™ comercialmente conhecida como Jiffy-Pellet 7C®. O mesmo pode substituir o Estágio III *in vitro*, normalmente feito no laboratório de micropropagação. Além disso, existem outros métodos de sistema que possibilitam o desenvolvimento na aclimação, minimizando o “choque de transplante” tais como Preforma® e Jiffypot®.

Entretanto, durante a fase de aclimação, o estresse hídrico das plantas é geralmente o maior problema, assim como a manutenção da umidade relativa alta, desde a retirada das plantas do meio de cultura até a retomada do crescimento, visto que é um fator crucial para a sua sobrevivência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Diversos estudos realizados reportam que o sucesso da fase de aclimação está diretamente relacionada a plântulas que apresentam raízes bem desenvolvidas *in vitro* (BIONDO et al., 2007; LÉDO et al., 2007; SILVA et al., 2008; SUNGKUMLONG e DEB, 2009) no entanto, mesmo sem a presença de raízes nos propágulos de *C. ferrea* a porcentagem de sobrevivência, ao processo de aclimação, foi elevada.

4. CONCLUSÃO

1. Esta espécie pode ser propagada *in vitro*, entretanto, é necessário aprofundar os estudos sobre a aclimação das plantas multiplicadas *in vitro* na casa de vegetação.
2. A assepsia e a germinação *in vitro* de *C. ferrea* foi eficiente com a utilização dos agentes antimicrobianos.
3. A multiplicação de explantes de *C. ferrea* é dependente de fitorregulador, sendo a citocinina BAP a mais indicada.
4. Explantes em diferentes posições da gema e a presença da citocinina no meio MS basal mostrou que a posição 5 da gema de *C. ferrea* é a mais adequada para multiplicação *in vitro*.
5. Explantes e propágulos desenvolvem-se melhor em meio de cultura MS nutritivo na sua concentração original.
6. Os resultados obtidos com os experimentos de auxinas não foram eficientes para o enraizamento *in vitro* de *C. ferrea*. Desta forma, apontam-se a necessidade de novos estudos e experimentos aprofundados relacionados ao enraizamento *in vitro* desta espécie.
7. A aclimação de plântulas de *C. ferrea* é possível sem a presença de raízes desenvolvidas *in vitro*.

5 REFERÊNCIAS

- ABREU, I.N.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MORAIS, A.R.; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O. A. Propagação in vivo e in vitro de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, v.33, n.1 p. 1-7. 2003.
- ASGHARI, S.; ABBAS, S.J.; GHEN, L.; XINHUA, H.; QIN, Y. Micropropagation of *Myrcia rubra* Sieb. and Zucc. using shoot tips and nodal explant. **African Journal of Agricultural Research**, v.8, n.17, p. 1731-1737. 2013.
- ALZUGARAY, D. **Plantas que Curam**. Sao Paulo: Hemus Press, 1984.
- ASMAR, S.A.; RESENDE, R.F.; ARARUNA, E.C.; MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* [(Mill.)N.E.Brown]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. Botucatu, v.14, n.esp., p.149-153, 2012.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, p. 261-296, 1998.
- AYUB; R.A.; GEBIELUCA, A.N. Embriogênese somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. **Ciências Agrárias Engenharia**, Ponta Grossa, v.9, n.2, p.25-30, 2003.
- BALBACH, A. **As plantas que curam**. Sao Paulo: Tres, p. 302-303, 1988.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v.2. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.
- BENEDITO, C.P.; COELHO, M.F.B.; GUIMARÃES, I.P.; AMARAL JUNIOR V.P.; MAIA, S.S.S.; PATISTA, P.F. Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, n.3, p.508-513, 2012.
- BERTONI, B.W.; MORAES, R.M.; PREVIDELLI, L.L.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.F.; PEREIRA, A.M.S. *In vitro* propagation and conservation of *Zeyhera montana* Mart: and endangered medicinal plant. **American Journal of Plant Sciences**. v. 4, 519-523, 2013.
- BIONDO, R.; SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; SOARES, A.M.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagation, seed propagation and germoplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.). **Scientia Agricola**, v.64, n.3, p.263-268, 2007.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas, 540p, 1976.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, v. 1, p. 87-132, 1998.

CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C.; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.E.P.; SOUZA, F.V.D.; PETERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de culturas de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 7, n.1, p. 30-60, 2011.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; DOS SANTOS, D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p.175-178, 1996.

CARVALHO, J.M.F.; SILVA, M.M.A.S; MEDEIROS, M.J.L. **Fatores Inerentes à Micropropagação**, Embrapa Algodão, Campina Grande-PB, 28p, 2006.

CAVALHEIRO, M.G.; FARIAS D.F.; FERNANDES, G.S; NUNES, E.P.; CAVALCANTI, F.S.; VASCONCELOS, I.M.; MELO, V.M.M.; CARVALHO, A.F.U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2b, p.586-591, 2009.

CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M.W; ERIG, A.C. Efeito do meio de cultura e concentrações de auxinas no enraizamento in vitro de *Prunus cerasifera* cv. MR. S. 1/8. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 2, n. 1, p. 43-47, 2006.

COLL, J.B.; RODRIGO, G.N.; GARCIA, B.S.; TAMÉS, R.S. **Fisiologia vegetal**. Madrid: Ediciones Pirâmide, 662p, 2001.

CORDEIRO, S.C.; SIMAS, N.K.; HENRIQUE, A.B.; LAGE; C.L.S.; SATO, A. Micropropagation of *Mandevilla moricandiana* (A.D.C.) Woodson. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v. 48:620-626, 2012.

COWAN, R.S. Caesalpinioideae. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (Eds.). **Advances in Legume Systematics part..**, p. 57-64, 1981.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CUNHA, H.B. & PASCOALOTO, D. **Hidroquímica dos rios da Amazônia**. Centro Cultural dos Povos da Amazônia – CCPA. Manaus. 147p. 2006.

DAS, S.; CHOUDHURY, M.D.; MAZUMDAR, P.B. Micropropagation of *Dioscorea alata* L. through nodal Segments. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 47, p. 6611-6617, 2013.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ª ed. São Paulo: UNESP, 604p, 2002.

DINIZ. J.D.N; ALMEIDA, J.L.; OLIVEIRA, A.B.; VIDAL, F.R. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Minirosa*. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n. 1, p. 68-73, 2014.

DIXON, R.A; GONZÁLES, R.A. **Plant cell culture: a practical approach**. New York, Oxford University Press, 230p. volume único. Bibliografia: p.1-25, 1994

DUCKE, A. **As leguminosas de Pernambuco e Paraíba**. Memória do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.51, p.417-461, 1953.

FICK, T. A. **Estabelecimento in vitro e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (louro-pardo)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 61p. 2007.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. **Experimental Cellular Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GEORGE, E.F & SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley, Exegetics, 709p. 1984

GIRARDI, C.G.; PESCADOR, Aclimatação de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.12, n.1, p.62-72, 2010.

GONZALES, S.R.; LOZANO, J.G.; ROJAS, H.J. **Propagación asexual de plantas: Conceptos básicos y experiencias con especies amazônicas**. Pronatta: Colombia., 55p., 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI/Embrapa-CNPq, v.1. p.183-260, 1998.

GUERRA, M.P & NODAR I,R.O. **Apostila de Biotecnologia: Material de Apoio - 8º Fase do Curso de Agronomia**. Edição Dast Einmacher - CC A/UFSC, Florianópolis, p.40, 2006.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, JR, GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. New York: Prentice Hall, 8.ed. 880p, 2004.

JESUS, A.M.S; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F; CHAGAS, E.A. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 288, p. 183-189, 2003.

JUNGHANS, T.G.; SOUZA, S.A. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2 ed. rev. Brasília, DF: EMBRAPA, 407p, 2013.

KAJIKI, F.O.; SHEPHERD, S.L.K. Micropropagação da espécie nativa *Baccharis tridentata* Vahl. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.2, p.42-47, 2006.

LÉDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; BARBOZA, S. B.S. C.; VIEIRA, G.S.S.; TUPINAMBÁ, E.A.; ARAGÃO, W.M. Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimatação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.42, n.2, p.147-154, 2007.

LEWIS, G.P. **Legumes of Bahia**. Kew: Royal Botanic Gardens. 1987.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; Lock, J.M. **Legumes of the World**. Kew, Royal Botanic Gardens, 592p, 2005.

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

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Ashville, v.30, p. 412-427, 1980.

LONGO, A.E.O. **Micropropagação de alho e ginogênese *in vitro* de cebola**. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - Instituto Agrônomo, 130p, 2009.

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

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

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: Leitura e Arte, 236p, 2004.

MALOSSO, M.G. **Micropropagação de *Acmella orelacea* (L.) R. K. Jansen e estabelecimento de meio de cultura para conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro***. Tese (doutorado). Manaus, UFAM, 101p, 2007.

MALOSSO, M.G.; BARBOSA, E.P.; NAGAO, E.O. Micropropagação de jambu [*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.10, n.3, p.91-95, 2008.

MALOSSO, M.G.; BERTONI, B.W.; COPPEDE, J.S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.7, p. 1147-1154, 2012.

MARTINS, L.M.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.D.F.; BERTONI, B.W. Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.3, p.454-458, 2011.

MEYER, S.T.O. uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 99-110. 1994.

MORAES, R.M.; CALDAS L.S, SILVEIRA, C.E.S, SOUZA, A.V, BERTONI B.W.; PEREIRA, A.S. Micropropagação e Banco de Germoplasma *in vitro* para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A.M.S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Legis Summa, Ribeirão Preto, SP, Brazil, p. 185-211, 2007.

MOREIRA, C.M; ANDRADE, H.B; MONFORT, L.E.F; PINTO, J.E.B.P; BERTOLUCCI, S.K.V; RIBEIRO, A.S. Indução de brotação *in vitro* em curauá: sistema de cultivo e

concentrações de BAP. **Horticultura Brasileira**. v. 29 : S58-S66, 2011

MOREIRA, C.M. **Biotecnologia aplica ao curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius*): caracterização morfológica, micropropagação e embriogênese somática em segmento foliar**. Dissertação (Mestrado). UFLA, 112p, 2011.

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

NACIMENTO, M.G.A. **Morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana***. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Cruz das Almas, BA: Universidade Federal Recôncavo da Bahia. 42p, 2007.

NASCIMENTO, P.K.V.; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G. Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenan). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007.

NAVROSKI, M.C. **Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria. 101p, 2011.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; CASTRO, A.H.; VIEIRA, C.V.; ABBADE, L.C.; ALVARENGA, A.L. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, 2004.

NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagação de copaíba – propagação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 33, p. 109-120, 2004.

NOZAKI, A.H.; HAYASHI, K.I.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMAE, M.; YAKAO, Y. Paufferol, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity / **Tetrahedron Letters**. v. 48, p. 8290–8292, 2007.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da Atividade cicatrizante fazer Jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em Lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.12 n.3, 2010.

OLIVEIRA, ECP. Estratégias para a conservação e uso dos recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas na Amazônia. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA**, 51. Horticultura Brasileira 29. Viçosa: ABH.S5777-S5789, 2011.

OLIVEIRA, T.G.; PINA, P.S.S.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart. **Ciência Rural**, v. 41, n.10, out, 2011.

OHIRA, S.; TAKAYA, K.; MITSUI, T.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; HAYASHI, K.; KUBOKI, A.; TANI, H.; IKEDA, S.; IINUMA, M.; AKAO, Y.; NOZAKI, H. New chalcone

dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase I. **Tetrahedron Letters**, v.54, 5052–5055I, 2013.

PASQUAL M. **Cultura de Tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

PEIXOTO, C.P. **Curso de Fisiologia Vegetal**. – Cruz das Almas, BA.177f.; il. 2010.

PEREIRA, A.M.S. et al. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p.295-297, 1995.

POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H. **Advances in Legume Systematics part I**. Kew, Royal Botanic Gardens, 1981.

QUEIROZ, M.L.S.; JUSTO, G.Z.; VALADARES, M.C.; SILVA, F.R.R.P. Evaluation. of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, New York, v. 23, n. 3, p. 367-382, 2001.

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

RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J.; SOUZA, T.M.; FACHINELLO, J.C. Influência da composição do meio de cultivo. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.10, n.2, p.095-101, 2009.

REZENDE, J. C.; CARVALHO, C.H.S.; SANTOS, A.C.R.; PASQUAL, M.; MENDES, A.N.G. Influência de auxina e citocinina no desenvolvimento de embriões. **Plant Cellular Culture Micropropagation**. Lavras, v.7, n.1, p. 1-8, 2011.

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

RIBEIRO, C.S.N.; SILVA, H.; SANTOS, J.W.; CARVALHO, J.M.F.C. Efeito do tidiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola**. Ambiental, v.14, n.4, p.366–371, 2010.

RIBEIRO, J.M.; BASTOS D.C.; MELO N.F.; OLIVEIRA E.A.G.; PINTO M.S.T. **Produção de mudas micropropagadas de videira, mangueira e goiabeira**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010.

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

RIZZINI, C.T. Espécies novas da flora brasileira. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.40, n.2, p.231-235, 1968.

ROCHA P,S,G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V.J.; MISTURA, C.C.; Influência da localização da gema no ramo sobre o estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 497-499, out-dez, 2005.

ROCHA, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHAS, T.G.; SOUZA, A. da S. (eds.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p 121-152, 2009.

ROCHA, H.S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T.G & SOUZA, A.S. (eds.) **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2 ed.rev. e amp., Brasília, DF: Embrapa, p. 133-164, 2013.

RODRÍGUEZ, J.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento de plantas. **Sitientibus**, Feira de Santa, v.4, n.7, p. 121-125, 1987.

ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte, (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.31-42, 2010.

SAHA, S.; KADER, A.; SENGUPTA, C. GHOSH, P. In Vitro Propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and Its Evaluation of Genetic Fidelity Using RAPD Marke. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 64-74, 2012.

SANTOS, A.V.; ANTUNES, A.C.; BIZO, H.R.; GIL, R.A.S.; SATO, A. *Varronia curassavia* essential oil. **In Vitro Cell and Development and Biology-Plant**. v. 49, p. 405-413, 2013.

SANTOS, R.B.; PAIVA, R.; NOGUEIRA.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.P.C.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.8, n.2, p. 293-296. 2006.

SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; SOARES, T.L.; SILVA, K.M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUSA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**, Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, p.79-98, 2006.

SHAH, S.N.; HUSAIN, A.M.; SHIRIN, F. Micropropagation of the Indian Birthwort *Arsitolochia indica* L. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**. Vol. 4(6) pp. 86-92, 2013.

SILVA, D; SILVA, M.E.T.; MANRIQUE, J.L.R.; MACIEL, F.O.; MALOSSO, M.G. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n.19, 2014.

SILVA, F.A.B.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.51, n.6, p.1103- 1114, 2008.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEND, C.A.V. P. Principal Componentes Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computer in Agriculture, 7, Reno-NV-USA**: Americam Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, M.L.; CHAGAS, E.A.; ARAÚJO, M.C.R.; BRITO, N.; SOUSA, L. Diferentes concentrações de hipoclorito sódico e tempos de imersão na desinfestação de sementes de

camu-camu cultivadas *in vitro*. In: **XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Livro de Resumos: p535-538. 2012.

SILVA, P.P.; CONTIM, L.A.S. FREITAS, D.V.; ARIDE, P.H.R.; SANTOS, A.L.W. Estabelecimento *in vitro* de ápices... **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.6, p.437-443, 2010.

SOUZA, L.A.G. **Leguminosas para adubação verde na terra firme e na várzea da Amazônia Centra: um estudo em pequenas propriedades rurais em Manacapuru.** – Manaus. Editora INPA, 40p, 2002.

SOUZA, A.V.; PEREIRA M.A.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S; SILVEIRA, D.G; SOUZA, F.V.D; FARIA, G.A; NETO, H.P. S; SANTOS SEREJO, J.S; SILVA, K.M; COSTA, M.A.P.C; SOARES, T.L; JUNGHANS, T. G.; ALMEIDA, W.B. **Introdução à micropropagação de plantas.** Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 38-52, 2006.

SOUZA, J.S.; SCHUCHII, A.W.; DONINII, L.P.; RIBEIRO, M.F. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2046-2048, 2008.

SSYED ASGHARII, S.; ABBAS, S.J.; CHEN, L.; XINHUA, E.; YONGHUA, Q. SUDHAKAR, M. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.77, n. 5, p. 378-380, 2006.

SUNGKUMLONG; DEB, C. R. Regeneration competence of *Tainia latifolia* (Lindl.) Benth ex Hook pseudobulb segments: An *in vitro* study. **Indian Journal of biotechnology**, New Delhi, v. 8, n. 1, p. 121-126, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 819p, 2009.

TAVEIRA, J.A.M. **Novas Tecnologias na Aclimatização, Formação e Manejo de Mud.** In: GERALD, L.T.S. Biofábricas de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. 1ed. São Paulo: Antiqua, p.246-269, 2011.

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

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M. **Micropropagação de plantas ornamentais.** Campina: Instituto Agrônômico, 72p, 1998.

TONIETTO, S. M.; PERINI, C. B.; TONIETTO, A. Concentrações e composição do meio de Murashige & Skoog. **Plant Cellular Culture Micropropagation**, Lavras, v.4, n.1, p. 42-47, 2008.

TORRES, A.C.; DUVAL, F.G.; RIBEIRO, D.G.; BARROS, A.F.F.; ARAGÃO, F.A.D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.789-792, 2005.

ULIBARRI, E.A. Sinopsis de *Caesalpinia* y *Hoffmanseggia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) de Sudamérica. **Darwiniana**, v.34: 299-348. 1996.

VEITCH, N.C., And GRAYER, R.J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Products Reports**. v.28, p.1626–1695, 2011.

VICENTE, M.A.A.; ALMEIDA, W.A.B.; CARVALHO, Z.S. Multiplicação in vitro e aclimatação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.176-183, 2009.

VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. **Ação de bioestimulante na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Cosmópolis: Stoller do Brasil, 2004. 74p.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Editora. UFV, 272 p, 2009.

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