



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

MARLY PEDROSO DA COSTA

**PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DA *Conochea scoparioides* Benth-
PLANTAGINACEAE**

FORTALEZA

2016

MARLY PEDROSO DA COSTA

**PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DA *Conohea scoparioides* Benth-
PLANTAGINACEAE**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Innecco
Coorientador: Dr. Osmar Alves Lameira

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C874p Costa, Marly Pedroso da.
Protocolo de micropropagação da *Conobea scoparioides* Benth.- Plantaginaceae / Marly Pedroso da Costa. – 2016.
57 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Renato Innecco.
Coorientação: Prof. Dr. Osmar Alves Lameira.
1. Cultura de tecidos. 2. Pataqueira. 3. Planta aromática . 4. Espécie medicinal. 5. micropropagação. I. Título.

CDD 630

MARLY PEDROSO DA COSTA

PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DA *Conobea scoparioides* Benth.-
Plantaginaceae

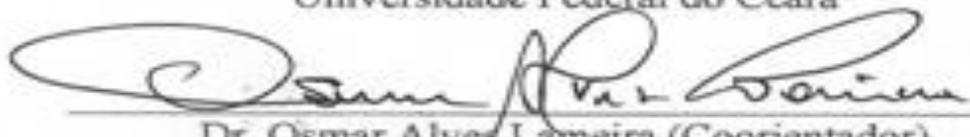
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia.

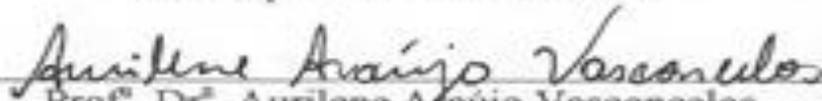
Orientador: Prof. Dr. Renato Innecco

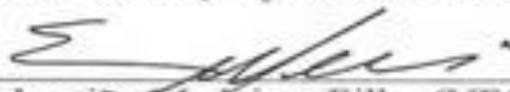
Aprovada em: 08/09/2016.

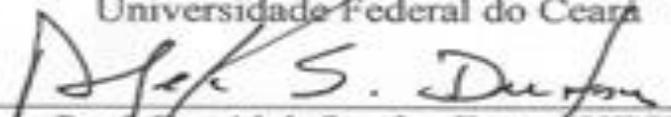
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Renato Innecco (Orientador)
Universidade Federal do Ceará


Dr. Osmar Alves Lameira (Coorientador)
Embrapa Amazônia Oriental


Prof. Dr. Aurilene Araújo Vasconcelos


Prof. Dr. Sebastião Medeiros Filho (UFC)
Universidade Federal do Ceará


Prof. Dr. Alek Sandro Dutra (UFC)
Universidade Federal do Ceará

A Deus, pai em todos os tempos.

Aos meus pais, Walter e Severa (*In memoriam*), amor eterno.

À Doutrina Espírita, esclarecimento e reforma íntima.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À NATURA empresa de perfumes e cosméticos, pelo apoio financeiro.

À Embrapa Amazônia Oriental - Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos pelo local da realização da pesquisa.

Aos doutores Osmar Alves Lameira e Renato Inneco, pela orientação e dedicação.

Aos profissionais e amigos Evaristo M. Castro, Ilmarina Menezes e Marco Antônio M. Neto pelo incentivo profissional.

As amigas Ruth e Lígia Pantoja pela amizade incondicional e fundamental.

Aos profissionais de saúde Dr. Guilherme Barros e Dra. Hima Koury pelo suporte emocional.

As solidárias pessoas Rosália, Ieda, Beth e Andréa pela ajuda nas moradias em Fortaleza.

Ao doutorando Gledson Salgado por compartilhar experiências referentes à elaboração de artigos científicos.

As pós-graduandas Gleyce Kelly e Rosana Corpes pela solidariedade em ambiente de trabalho.

Ao graduando Orlando Maciel, ser humano ímpar, com quem aprendi inúmeras e variadas coisas. Em especial agradeço a boa vontade e disponibilidade nas traduções dos trabalhos científicos e formatações.

Aos funcionários da Embrapa Amazônia Oriental, Paulo Guaraná e Gilberto pela valiosa contribuição no local de trabalho.

Aos pesquisadores Sebastião Lopes e Paulo Albuquerque pelo apoio na elaboração do projeto.

Aos colegas de curso Conceição, Suzana e Jean, pela disponibilidade em cooperar com importantes informações sobre a confecção da Tese.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental em Belém: Surama, Lu, Lana, Iracema, Camila, Dávia, Meici, Fabrícia, Suzana, Marlon, Ruany, Helaíne, Ana Paula, Rafael, Diene, Fernanda, Jamile, Raíssa, Danielle e Fernandinha.

À minha família pela constante torcida!

“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Considerações Gerais

RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A espécie.....	4
2.2 Distribuição	5
2.3 Características ecofisiológicas	5
2.4 Importância econômica	6
2.5 Cultivo.....	7
2.6 Cultura de tecidos	7
REFERÊNCIAS	10

CAPÍTULO II - Micropropagação in vitro de *Conobea scoparioides* Benth.

RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 I Experimento: multiplicação in vitro.....	18
2.2 II Experimento:rizogênese in vitro	18
2.3 Condições dos meios nutritivos e da sala de crescimento.....	19
2.4 Análises estatísticas.....	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1 Multiplicação in vitro	20
3.2 Rizogênese in vitro	22
4 CONCLUSÃO.....	26

REFERÊNCIAS	27
-------------------	----

CAPÍTULO III - Efeito do subcultivo in vitro na formação de plântulas de *Conobea scoparioides* Benth.

RESUMO.....	29
-------------	----

ABSTRACT	30
----------------	----

1 INTRODUÇÃO	31
--------------------	----

2 MATERIAL E MÉTODOS	33
----------------------------	----

2.1 Plantas matrizes	33
----------------------------	----

2.2 Estabelecimentos in vitro	33
-------------------------------------	----

2.3 Multiplicação in vitro	33
----------------------------------	----

2.4 Experimento: número de subcultivos	34
--	----

2.4.1 Condições dos meios nutritivos e da sala de crescimento	34
---	----

2.4.1 Análises Estatísticas	34
-----------------------------------	----

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
--------------------------------	----

3.1 Número de subcultivos	35
---------------------------------	----

4 CONCLUSÃO.....	39
------------------	----

REFERÊNCIAS	40
-------------------	----

CAPÍTULO IV - Efeito dos substratos na aclimatização e formação de mudas de *Conobea scoparioides* Benth.

RESUMO.....	43
-------------	----

ABSTRACT	44
----------------	----

1 INTRODUÇÃO	45
--------------------	----

2 MATERIAL E MÉTODOS	47
----------------------------	----

2.1 Identificação da espécie vegetal estudada.....	47
--	----

2.2 Enraizamento in vitro.....	47
--------------------------------	----

2.2.1 Condições dos meios nutritivos e da sala de crescimento	47
---	----

2.3 Experimento: aclimatização ex vitro.....	48
--	----

<i>2.3.1 Material vegetal</i>	48
<i>2.3.2 Condições experimentais</i>	48
<i>2.3.3 Material em aclimatização ex vitro</i>	48
<i>2.3.4 Análise estatística</i>	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1 Aclimatização ex vitro	50
4 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

RESUMO GERAL

A *Conochea scoparioides* Benth., popularmente conhecida como pataqueira, é uma planta herbácea semi-aquática com propriedades aromáticas e medicinais, pertencente a família Plantaginaceae, sendo seu local de origem a Amazônia. No estado do Pará é muito utilizada no tratamento de beribéri e na formulação de uma água de cheiro de grande interesse econômico, causando assim uma exploração indiscriminada. Atualmente, não há um sistema de propagação eficiente para atender o mercado. Objetivou-se com esse trabalho desenvolver um protocolo de micropropagação in vitro para a pataqueira. Nesse sentido, três etapas foram realizadas: 1- Multiplicação de brotos, 2- Efeito do subcultivo na formação de plântulas e 3- Efeito de substratos na aclimatização e formação de mudas. A fonte de explante para cultivo in vitro foi obtida a partir de plântulas micropropagadas e do campo. Os cultivos in vitro ocorreram em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 16, enquanto a aclimatização se deu em telado com sombrite a 70% e temperatura média de 30 ± 2 °C. Na primeira etapa, obtiveram-se brotos viáveis no meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) através de segmentos caulinares apicais e nodais na ausência e na presença de 1 mg.L^{-1} de 6-Benzilaminopurina (BAP). A percentagem de enraizamento e número de raízes foram superiores no meio de cultivo MS 1/1 líquido, suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Ácido indol butírico (AIB). A pataqueira se micropropagada através do meio de cultura MS, sendo otimizada na presença dos reguladores de crescimento, BAP e AIB, utilizando os segmentos apicais e/ ou nodais. Na etapa seguinte, o quarto subcultivo mostrou maiores médias em todas as variáveis com exceção da altura do maior broto e apresentou taxa média de brotos/explante de 24, enquanto que a quinta repicagem induziu maior percentagem de senescência, menor percentagem de brotos e raízes e altas médias para número de brotos com altura $\geq 1 < 2$ cm e $\geq 2 < 3$ cm. Os subcultivos, do primeiro ao quarto em intervalos até trinta dias são viáveis para formação de plântulas de pataqueira in vitro. Em relação à terceira fase, em todos os substratos a sobrevivência das mudas foi de 100%. A mistura de terra preta+pó de serragem+esterco bovino apresentou os maiores valores médios na maioria das variáveis avaliadas, enquanto que o substrato constituído somente por terra foi o que promoveu o menor crescimento nas plantas. Os substratos testados são adequados para a aclimatização. Em destaque, o substrato terra preta+pó de serragem+esterco bovino curtido como mais indicado dentro dos estudados para formação de mudas viáveis.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Pataqueira. Propagação vegetativa.

GENERAL ABSTRACT

The *Conocloca scoparioides* Benth., popularly known as pataqueira, is a semi-aquatic herbaceous plant with aromatic and medicinal properties. It belongs to the Plantaginaceae family and it was originated in the Amazon. In the State of Pará it is very used for treating beriberi and in the formulation of an eau de cologne of great economic interest, therefore causing its indiscriminate exploitation. Currently, there is no efficient propagation system to meet the market demands. The aim of this work was to develop an in vitro micropropagation protocol for pataqueira. Within this purpose, three steps were conducted: 1- shoot multiplication; 2- the effect of subcultivation in the plantling formation; and 3- the effect of substrates in the acclimatization and seedling formation. The explant source for the in vitro culturing was obtained from micropropagated and field-grown plants. In vitro cultivation occurred in growth rooms with a 25 ± 3 °C temperature and 16 hour photoperiod, while the acclimatization was conducted under a screen of 70% shade, with an average temperature of 30 ± 2 °C. In the first step, viable shoots were obtained in the Murashige & Skoog (MS) culture medium through apical and nodal stem segments in the absence and in the presence of $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 6-Benzilaminopurina (BAP). The percentage of rooting and the number of roots was superior in the liquid 1/1 MS medium supplemented with $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of Indol butyric acid (AIB). The pataqueira is micropropagated through the MS culture medium, being optimized in the presence of growth regulators BAP and IBA, using the apical and/or nodal segments. In the next step, the fourth subculture presented higher means for all variables with the exception of height of the highest shoot and presented a mean rate of shoot/explant of 24, while the fifth subculture induced the highest senescence percentage and the smallest percentage of shoots and roots, but presented high means in the number of shoots with height $\geq 1 < 2$ cm, number of shoots $\geq 2 < 3$. The first to fourth subcultures are viable in a span of thirty days to the formation of pataqueira seedlings in vitro. Regarding the third step, the survival of seedlings in all substrates was 100%. The mixture of soil, sawdust and bovine manure presented the highest mean values for most of the evaluated variables, while the substrate consisting of only soil promoted the least increase in the plants. The tested substrates are adequate for acclimatization. Highlighted the soil+sawdust+matured bovine manure substrate as most suitable within the studied mixtures for the formation of viable seedlings.

Keywords: Pataqueira . Tissue culture. Vegetative propagation.

1 INTRODUÇÃO

A *Conobea scoparioides* Benth., conhecida popularmente no Brasil como “pataqueira”, é uma espécie herbácea genuína da Amazônia. No estado do Pará, é muito utilizada em forma de banhos na aromaterapia cabocla, principalmente nos meses de junho durante a festa de São João e em outubro durante o Círio de Nazaré, quando ocorre a escassez da planta na região devido à alta procura (MAIA; ZOGHBI; ANDRADE, 2001). Durante o período de menor precipitação pluviométrica (que se estende em média de setembro a dezembro) a planta também tende a faltar no mercado, uma vez que se desenvolve em locais alagados.

A pataqueira é matéria-prima de óleos essenciais para formulação de perfume, sendo citada como principal fonte de timol (MAIA; ANDRADE, 2009). Aliado a isto, tradicionalmente na região norte, esta planta é usada para combater a doença beribéri através da generosa quantidade de vitamina B1 presente em seu metabolismo (CHOI et al., 2000). O autor relata que a espécie possui compostos terpenóides, que tem ação acaricida e anti-fúngica, muito usados na apicultura. Além disso, possui propriedades anticancerígenas por conter a substância cucurbitacina E (MUSZA et., 1994), efetiva no rompimento de tumores de próstata (DUNCAN et al., 1996).

No entanto, devido à exploração indiscriminada e a falta de um sistema adequado de propagação visando o cultivo, muitas vezes a quantidade de plantas existentes não é suficiente para abastecer o mercado. Os estudos referentes a métodos de propagação ainda são escassos. Deste modo, González Mina e Hurtado Montano (2011) estudaram o cultivo da *C. scoparioides* e relatam que, tradicionalmente, a propagação é feita por sementes, com baixo índice de germinação e de difícil manejo agrônômico. Segundo os autores a propagação vegetativa via estaquia, obteve 37% de vigamento com raízes não funcionais. Neste contexto, percebe-se que os métodos de propagação apresentam limitações, sendo nenhum deles capaz de solucionar a questão da falta de plantas de pataqueira no ávido mercado brasileiro.

Para tanto, a cultura de tecidos vegetais através da micropropagação pode ser uma alternativa de propagação para a pataqueira, uma vez que, variadas espécies de interesse econômico usam a propagação in vitro como método sistemático de obtenção de mudas, como a artemísia (HAILU; ABERA; MARIAM, 2013); o abacaxizeiro (BARBOZA et al., 2009); bastão-do-imperador (COLOMBO et al., 2010); e ipê-amarelo (PEREIRA; NAVROSKI; REINIGER, 2015). Assim, Objetivou-se com esse trabalho desenvolver um protocolo de micropropagação in vitro para a pataqueira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A espécie

A *Conobea scoparioides* pertence tradicionalmente a família Scrophulariaceae (POTT; POTT, 2000), porém, por meio de estudos de filogenia (APGII 2003) considerando vinte e cinco gêneros e mil e duzentas espécies nativas do Brasil, Souza e Lorenzi (2008) sinalizaram seu enquadramento na família Plantaginaceae. Segundo Souza e Giuliatti (2009), trata-se de uma família botânica de distribuição cosmopolita e não monofilética, que no total apresenta duzentos e setenta gêneros e cinco mil e cem espécies (MABBERLEY, 1997). No Brasil é chamada popularmente de “pataqueira” ou “vassourinha-do-brejo” (CHOI et al., 2000).

A planta é herbácea, atingindo no máximo 1,0 m de altura (MAIA, 2007). As folhas são lanceoladas, opostas e ricas em óleos essenciais. O caule é ereto com abundante tecido aerenquimático que se estende por toda a planta, o que permite seu cultivo em locais alagados. Os frutos se apresentam em forma de capsulas esféricas e contém muitas e diminutas sementes (GONZÁLEZ MINA; HURTADO MONTANO 2011). De acordo com Corrêa (1984) exibem flores solitárias, hermafroditas e de azul intenso, localizadas axilarmente (Imagem 1).

1-Imagem da planta *Conobea scoparioides* Benth.

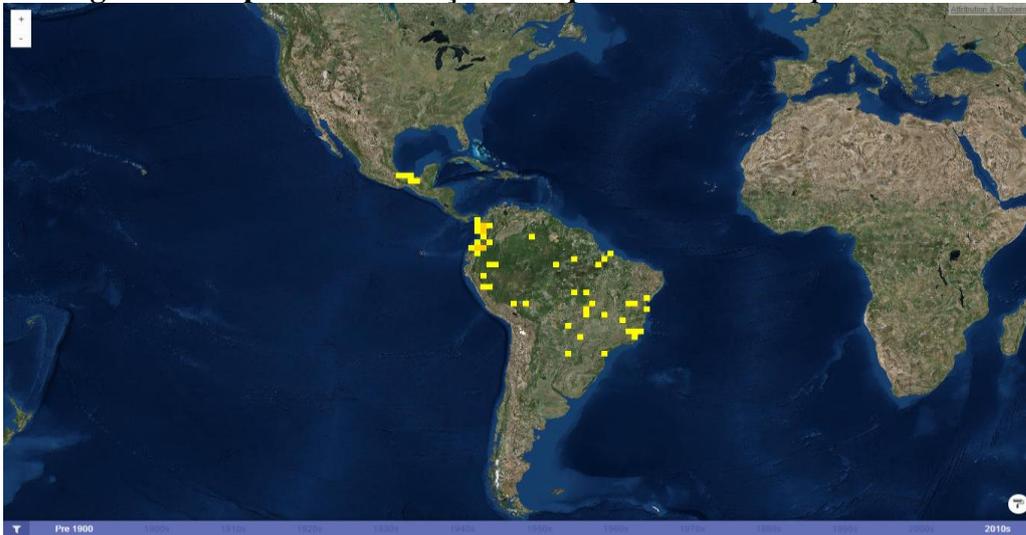


Fonte: **Manual ilustrado: Pataqueira**. 1. Ed. [s.l.]: NATURA COPYRIGHT, 2015. 29p.

2.2 Distribuição

Pode ser encontrada em maior concentração nos países da América do Sul: Colômbia, Peru, Equador, Paraguai, Venezuela e Bolívia. No Brasil, a planta aparece nas regiões Norte: Pará, Amapá, Amazonas e Acre; Nordeste: Maranhão, Pernambuco, Bahia e Alagoas; região Sul: Paraná; Sudeste: Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro e no Centro Oeste: Mato Grosso, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul. É encontrada também no México (GBIF, 2016), como mostra a Imagem 2. Contudo, seu centro de origem é a Amazônia (REVILLA, 2002).

2- Imagem do Mapa de distribuição da espécie *Conobea scoparioides* Benth.



Fonte: Global Biodiversity Information Facility (2016) – GBIF

2.3 Características ecofisiológicas

Planta anual subaquática, emergente ou anfíbia que habita solos arenosos, semi-inundados e terras baixas de rios e riachos (MAIA et al., 2001). Segundo POTT & POTT (2000) também pode ser encontrada em pastagens degradadas. Estes pesquisadores citam a espécie como “efêmera” por completar seu ciclo de vida rápido. Vegeta, floresce, frutifica para em seguida entrar em senescência e morrer dentro de seis meses.

A pataqueira é uma espécie heliófita, cujas pequenas sementes são dispersas através das plumagens de pássaros migratórios (CHOI et al., 2000), e são fotoblásticas positivas (GONZÁLEZ MINA; HURTADO MONTANO 2011). A floração ocorre nos meses de abril a maio (POTT; POTT, 2000). Especificamente, a fase reprodutiva inicia-se com

quatro meses de idade e pode se estender até o sétimo mês. Após este período ocorre a frutificação e posteriormente senescência dos ramos mais velhos (GONZÁLEZ MINA; HURTADO MONTANO 2011).

Sua perfeita adaptação e desenvolvimento em locais alagados se devem a organização anatômica, sendo permanente a presença do tecido aerenquimático que se estende das raízes até as folhas, favorecendo assim a difusão do oxigênio. Isto permite seu cultivo em locais alagados por um período de um ano, tempo em que pode haver mais de duas colheitas e rebrotas. No entanto, após a floração o cilindro vascular cresce em espessura e oblitera os espaços vazios do tecido aerenquimático. Isto afeta negativamente a difusão gasosa e, conseqüentemente, induz a senescência funcional e posterior morte do vegetal. (GONZÁLEZ MINA; HURTADO MONTANO 2011).

2.4 Importância econômica

A folha, o órgão mais explorado da pataqueira, contém em maior quantidade as substâncias aromáticas e medicinais que lhe dão destaque. A pataqueira metaboliza três óleos essenciais: Timol, Metyltimol e α -felandreno, que em proporções equilibradas exalam dos tecidos macerados um odor agradável. Por isso, empresas brasileiras relacionadas ao ramo de perfumaria e de cosméticos têm demonstrado grande interesse na espécie. Contudo, atualmente estes óleos não são comercializados (COSTA et al., 2014).

A síntese significativa de vitamina B pela planta, a indica como erva medicinal no tratamento da doença beribéri ou vitaminose B (CHOI et al., 2000). Existem relatos da sua utilidade no combate a malária, febres e leishmaniose (WENIGER et al., 2001). Na Colômbia é usada como purgante e abortiva (GONZÁLEZ MINA; HURTADO MONTANO 2011). Todavia, chama atenção por ser citada como anticancerígena, por conter a substância triterpênica cucurbitacina E em quantidade significativa (MUSZA et al., 1994). Segundo Duncan et al. (1996), esta substância é ativa no combate de células tumorais de próstata. Devido à importância do efeito anti-proliferativo da cucurbitacina E, Kaya e Melzig (2008) identificaram a presença deste terpeno na espécie *Gratiola officinalis* L. da mesma família da *Conobea scoparioides*.

2.5 Cultivo

No estudo mais recente sobre o cultivo da espécie (OLIVEIRA. L, 2015), relata que a pataqueira se propaga naturalmente através de sementes e por estacas de ramos de 10 a 15 cm de comprimento com 2 a 3 nós em locais bem irrigados a pleno sol, de preferência no início do inverno, que na região Norte ocorre nos meses de dezembro e janeiro. Segundo González Mina e Hurtado Montano (2011), a germinação ocorre no período de 10 dias, porém o transplante das plântulas é realizado com 60 dias, pois antes se torna inviável o manejo agrônomico em função do pequeno tamanho das mesmas. Eles relatam ainda que nesta fase o crescimento da espécie é lento, acelerando somente após o transplante e então alcançando o ponto de colheita aos quatro meses de cultivo. Estes dois autores comentam que a propagação vegetativa realizada por estacas obteve 37% de vigamento e, seu desenvolvimento até a fase reprodutiva foi considerado lento, atingindo a colheita somente com sete meses. Assim, eles constataram limitações no cultivo em tais condições, já que também ocorre ausência de pelos absorventes nas raízes adventícias das estacas.

Existem plantas hidropônicas sendo obtidas através das ramificações naturais dentro deste sistema de cultivo. Mas é citado que estas plantas apresentam umidade acima de 91%, dificultando o processo de destilação e extração dos óleos, resultando em um produto com menos odor. O aspecto positivo é que o tempo de colheita foi reduzido para quatro meses (COSTA et al., 2014).

2.6 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais está intimamente ligada a ação dos fitohormônios e tem facilitado a compreensão do crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições controladas. Desde 1934, quando ocorreu o primeiro sucesso com a cultura de órgão *in vitro* livre de reguladores de crescimento, entendeu-se que algumas células são capazes de sintetizar fitohormônios necessários aos processos de divisão e diferenciação celular (DAGLAS, 2012). Recentemente, a multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo na ausência de citocinina foi observado por Pereira et al. (2015). Por outro lado, foi verificada a necessidade de citocinina e auxina sintética na indução de brotos e enraizamento de *Cassia angustifolia* (SIDDIQUI; ANIS, 2007).

Fisiologicamente, a importância do uso das citocininas situa-se no fato de estimularem a divisão e a diferenciação celular, resultando na formação de brotos (TAIZ;

ZEIGER, 2004). Além disso, esta classe de fitohormônio diminui a ação dominante das auxinas, que impedem a emergência de gemas axilares e dormentes (FURTADO et al., 2007). Entre as citocininas, a mais usada no processo de indução de brotos *in vitro* é a 6-benzilaminopurina (BAP). De acordo com Moreira et al. (2011) este regulador de crescimento é de maior eficiência, além de ser de menor custo. Deste modo, algumas espécies medicinais já estabeleceram o protocolo de multiplicação de brotos usando o BAP. É o caso da *Vernonica condensata* Baker (VICENTE et al., 2009), *Calendula officinalis* (VICTÓRIO et al., 2012) e *Euphorbia cotinifolia* L. (PERVEEN et al., 2013). De acordo com Oliveira et al. (2007) a morfogênese *in vitro* de brotos está na dependência do balanço fitohormonal promovido pelas quantidades de citocininas endógenas e exógenas no explante.

As auxinas são também reguladoras de crescimentos rotineiramente encontradas nos estudos *in vitro*. Estas substâncias na forma sintética têm sido utilizadas para estimular o alongamento celular e induzir ou otimizar o enraizamento em explantes de muitas espécies em condições controladas e também *ex vitro*. Desta maneira, Hussain et al. (2014) observaram que o ácido indolbutírico (AIB) potencializou o enraizamento de mudas de amoreira-preta. Neste aspecto, Cid e Texeira (2010) e Mercier (2012) explicam que o alongamento celular é consequência da modificação plástica na parede celular provocada pelas auxinas. Em relação a organogênese de raízes, ainda está incompreendido o mecanismo de ação desta classe fitohormonal (FUKAKI; TASAKA, 2009). Para tanto, o AIB apresenta uso generalizado em concentrações que dependerão da espécie estudada, o que ocorre também com outros hormônios. Segundo Salisbury e Ross (2006), o AIB no metabolismo vegetal é facilmente metabolizado durante a finalização da rizogênese. Desta forma, a presença de AIB no meio de cultivo otimizou o enraizamento *in vitro* de mamoeiro (SCHMILDT et al., 2010), porém nas microestacas de *Lavandula angustifolia* Miller ocorreu redução no enraizamento (MACHADO et al., 2013).

Sabendo-se que todos os explantes são totipotentes, fazem-se necessários estudos *in vitro* para determinação do melhor órgão doador. Assim, nos diversos protocolos de micropropagação foram usados como fontes de explante segmentos de caule apicais, nodais, internodais e também folhas e raízes. Dibax et al., (2013) otimizou o protocolo de regeneração *in vitro* de cana-de-açúcar usando segmentos de folhas, enquanto Vidal et al., (2013) e Resende et al. (2015) usaram o tecido nodal para propagarem *in vitro* de mamoeiro e *Lippia rotundifolia*, respectivamente. No entanto, o segmento internodal foi o mais eficiente para propagação de alfavaca (AMARAL et al., 2007) e laranja-azedada (SILVA et al., 2010). Já o segmento apical foi amplamente usado na micropropagação das plantas de menta (TONIETO

et al., 2008), lavanda (MACHADO et al., 2011) e cerejeira (GOLLE et al., 2012). De acordo com Lima-Brito et al. (2011), a maior quantidade de tecidos meristemáticos nos explantes favorecem o processo de morfogênese, o que explica o fato do segmento apical apresentar vantagens em relação ao nodal, principalmente em espécies herbáceas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Tanto na fase de proliferação de brotos quanto na fase de enraizamento, além dos fitohormônios a escolha do meio nutritivo e a consistência influenciam nos resultados esperados. Na literatura consultada foi encontrada quase unanimidade no uso do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), na sua concentração original e modificada, na consistência líquida e semi-sólida, atendendo assim as necessidades dos diferentes vegetais.

Desta maneira, gemas de abacaxizeiro foram cultivadas em meio MS líquido (BARBOZA et al., 2009), o mamoeiro enraizou em meio MS sólido (SCHMILDT et al., 2010), a micropropagação de bananeira foi realizada em meio MS líquido (ANDRADE et al., 2011), a proliferação in vitro de bromélias ocorreu em meio MS líquido (MENGARDA et al.; 2009), a multiplicação in vitro de bastão-do-imperador utilizou o meio MS sólido (COLOMBO et al., 2010), e a indução de brotação in vitro de curauá obteve sucesso no meio MS líquido (MOREIRA et al., 2011). O uso da consistência líquida do meio nutritivo é um atrativo nas pesquisas in vitro, haja vista que a ausência de um agente solidificante traz praticidade e diminuição de custo neste processo de propagação assexuada.

Outras vantagens de ordem física e química é que a água presente no meio, por não ter ágar, fica com o potencial hídrico mais alto, facilitando a diluição uniforme dos minerais e reguladores de crescimento e os tornando mais disponíveis aos explantes no meio de cultura, podendo assim haver maior absorção dos nutrientes e provavelmente interferir de forma positiva na formação dos órgãos. Contudo, segundo Ivanova e Staden (2009), o alto potencial hídrico e osmótico do meio líquido pode ser uma desvantagem, uma vez que promovem ao tecido alto conteúdo de água, deixando-o fragilizado, vitrificado ou hiperhídrico. Para George (1993) a hiperhidricidade no tecido vegetal é consequência da carência de oxigênio, comprometimento nas trocas gasosas e na respiração. Taiz e Zeiger (2004) complementam esta explicação, afirmando que durante o processo de anoxia ou hipoxia nas raízes ocorre prejuízo na produção de adenosina-trifosfato (ATP) prejudicando o crescimento e desenvolvimento dos órgãos.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, C. L. F. et al. Indução de organogênese em alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) cultivados *in vitro*: Efeito da posição dos explantes e dos agentes gelificantes do meio. **Diálogos & Ciência**, Salvador, ano. V, n. 12, p. 1-8, 2007.
- ANDRADE, R. A. et al. Micropropagação de mudas de bananeira em meio líquido. **Comunicata Scientiae**, Planalto Horizonte, v. 2, n. 3, p.156-159. 2011. Disponível em:<<https://goo.gl/LHMhuo>>. Acesso em: 03 nov. 2015.
- BARBOZA, S. B. S. C. et al. Cultivo inicial in vitro de gemas axilares de *Ananas comosus* (L.) Merr., em meio líquido/sólido, na presença/ausência de luz. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. spe, p. 1832-1836, 2009. Disponível em:<<http://goo.gl/2y1VEq>>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- CHOI, H. S.; SONG, H. S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical scavenging activities of Citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v. 48, n. 9, p. 4156-4161, Sept. 2000. Disponível em:<<http://goo.gl/Rcvvho>>. Acesso em: 11 jan. 2015.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de Plantas**. Brasília: Embrapa, 2010. p. 15-49.
- COLOMBO, L, A. et al. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de Bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 696-700. 2010. Disponível em:< <http://goo.gl/C8hDC1>>. Acesso em: 22 fev. 2016.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Colaboração de Leonan de A. Penna. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. 6 v. il.
- COSTA, R. G. et al. Essential oil of pataqueira (*Conobea scoparioides* Benth.): from natural occurrence and produced by hydroponics. **Advances in Plants & Agriculture Research**, Oklahoma, v. 1, n. 3, p. 1-5, 2014. Disponível em:<<http://goo.gl/A5POCW>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- DAGLA, H. R. Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. **Resonance**, Índia, v. 17, n. 08, p. 759-767, 2012. Disponível em:<<http://goo.gl/k51PJa>>. Acesso em: 13 mar. 2016.
- DIBAX, R. et al. Protocol optimization and histological analysis of *in vitro* plant regeneration of ‘RB92579’ and ‘RB93509’ sugarcane cultivars. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 1, p. 49-54, Nov. 2012. Disponível em : <<http://goo.gl/Nyw5SF>>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- DUNCAN, K. L. et al. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate Carcinoma Cells. **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v. 52, n. 10, p. 1553-1560, Nov. 1996. Disponível em: <<http://goo.gl/IvfF1e>>. Acesso em: 22 jul. 2015.
- FUKAKI, H; TASAKA, M. Hormone interactions during lateral root formation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 437-49, Mar. 2009. Disponível em:<<http://goo.gl/p4dkrc>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

FURTADO, C. M. et al. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hypogaea* L.), utilizando diferentes citocininas. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, v.1, n. 1, p. 51-58, 1^o sem. 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/pNL3uu>>. Acesso em: 07 set. 2015.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY - GBIF Secretariat: **GBIF Backbone Taxonomy**. *Conobea scoparioides* Benth. Disponível em: <<http://goo.gl/TUQb6v>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

GEORGE, E .F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2.ed. England: Exegetics, 1993. 574p.

GOLLE, D.P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/pVYjtQ>>. Acesso em: 09 jun. 2015.

GONZÁLEZ MINA, R. T.; HURTADO MONTAÑO, A. M. Primeros ensayos para El cultivo y caracterización Del aceite esencial de *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltld.) Benth. Para El Pacífico colombiano. **Entramado**, Cali, v. 7, n. 2, p. 174-185, July./Dec. 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/i13kXn>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

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

HAILU, T; ABERA, B; MARIAM, E. G. *In vitro* mass propagation of Artemisia (*Artemisia annua* L.) cv: Anamed. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Bangladesh, v. 23, n. 2, p. 165-176, 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/yaqjs4>>. Acesso em: 14 jul. 2015.

HOUSSAIN, I. et al. Indol butyric acid and substrates influence on multiplication of blackberry ‘Xavante’. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1761-1765, Oct. 2014. Disponível em : <<http://goo.gl/VM6cMX>>. Acesso em: 13 out. 2015.

IVANOVA, M; STANDEN, J.V. Nitrogen source, concentratio, and NH₄⁺:NO₃⁻ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue culture *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 167-174, Nov. 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/znWWNN>>. Acesso em: 05 mai. 2015.

KAYA, G.I; MELZIG M. F. Quantitative determination of cucurbitacin E and cucurbitacin I in homoeopathic mother tincture of *Gratiola officinalis* L. **En** : HPLC. **Pharmazie**, Eschborn, v. 63, n. 12, p. 851-853, Dec. 2008. Disponível em: <<https://goo.gl/s4RDQi>>. Acesso em: 09 out. 2015.

LIMA-BRITO, A. et al. *In vitro* Morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* GIUL. SUBSP. *Mucugensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 502-503, May./June. 2011. Disponível em : <<http://goo.gl/D2eMNV>>. Acesso em: 11 abr. 2015.

MACHADO, M. P. et al. Application of IBA on in vitro and ex vitro rooting microcutting of *Lavandula angustifolia* Miller. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 2, p. 153-161, May. 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/4LJunb>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

- MABBERLEY, D. J. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants**. 2. ed. Cambridge University Press, 1997. 852p.
- MAIA, J. G. S. Química e atividade biológica de óleos essenciais da Amazônia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, IV. 2007, Fortaleza. **Palestras...**Fortaleza: PADETEC/UFC, 2007. Disponível em:<<http://goo.gl/G2lGR4>>. Acesso em: 03 jul. 2015.
- MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Belém: MPEG, 2001. 173p.
- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 595–622, 2009. Disponível em:<<http://goo.gl/V3Im6p>>. Acesso em: 08 set. 2015.
- MENGARDA, L. H. G. et al. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de bromeliaceae. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 10, n. 6, p. 469-474, Nov./Dec. 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/ieuDif>>. Acesso em: 05 fev. 2015.
- MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431p.
- MOREIRA, C.M. et al. Indução de brotação *in vitro* em curauá: sistema de cultivo e concentrações de BAP. **Horticultura brasileira**, Vitória da Conquista, v. 29, n. 2, (suplemento – CD ROM), jul. 2011. Disponível em:<<http://goo.gl/QjY4A8>>. Acesso em: 02 ago. 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Hudson, v. 15, p. 473-497, July. 1962. Disponível em: <<http://goo.gl/UYfn0>>. Acesso: 16 set. 2015.
- MUSZA, L.L. et al. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conocarpus scoparioides*. **Journal of Natural Products**, Washington, v.57, n.11, p.1498-1502, 1994. Disponível em:< <http://goo.gl/EYKecs>>. Acesso em: 02 mar. 2015.
- OLIVEIRA, L. M. et al. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 025-030, Apr. 2007. Disponível em:<<http://goo.gl/Oz6Pra>>. Acesso em: 15 jun. 2015.
- OLIVEIRA, D. **Manual ilustrado: Pataqueira**. 1. Ed. [s.l.]: NATURA COPYRIGHT, 2015. 29p.
- PEREIRA, M. O; NAVROSKI, M. C; REINIGER, L. R. S. Multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). **NATIVA**, Sinop, v. 03, n. 01, p. 59-63, jan./mar. 2015. Disponível em: <<http://goo.gl/P4jc7j>>. Acesso em: 22 abr. 2015.
- PERVEEN, S. et al. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* establishment of Caribbean copper plant (*Euphorbia cotinifolia* L.): an important medicinal shrub. **Acta Physiologiae Plantarum**, Hudson, v. 35, n.12, p. 3391-3400, Dec. 2013. Disponível em:<<https://goo.gl/FwO2hh>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

POTT, V. J; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: Centro de Pesquisas Agropecuárias do Pantanal, 2000. 404p. il.

RESENDE, C.F. et al. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos rupestres. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p. 582-589, July./Sept. 2015. . Disponível em:<<http://goo.gl/qmGT7N>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: INPA/SEBRAE, 2002. 2 v.

SALISBURY, F.; ROSS, C. **Fisiología de las plantas - Desarrollo de las Plantas y Fisiologia Ambiental**. Madrid, Thomson Edited Spain Paraninfo, v. 3, 2006, 460p.

SCHMILDT, E.R. et al. Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro ‘Tainung 01’. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 125-129, Jan./Mar. 2010. Disponível em:<<http://goo.gl/ckyjLD>>. Disponível em: 07 out. 2015.

SIDDIQUE, I; ANIS, M. *In vitro* shoot multiplication and plantlet regeneration from nodal explants of *Cassia angustifolia* (Vahl.): a medicinal plant. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 29, n.3, p. 233-238, June. 2007. Disponível em:< <http://goo.gl/MHYelH> >. Acesso em: 29 set. 2015.

SILVA, R.P. et al. Sour Orange bud regeneration and *in vitro* plant development related to culture medium composition and explants type. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 001-008, Mar. 2010. Disponível em:<<http://goo.gl/Y7jq4f>>. Acesso em: 11 out. 2015.

SOUZA, V. C.; GIULIETTI, A. M. Levantamento das espécies de scrophulariaceae sensu lato nativas do Brasil. **Pesquisas, Botânica**, São Leopoldo, n. 60, p. 7-288, 2009. Disponível em: <<https://goo.gl/tSRFrT>>. Acesso em: 05 dec. 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII**. 2. ed. Nova Odessa. Inst. Plantarum, 2008. 704p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TONIETTO, S.M; PERINI, C. B; TONIETTO, A. Concentrações e composição do meio de Murashige & Skoog na micropropagação da menta. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 42-47, 2008. Disponível em: <<http://goo.gl/E2AtC8>>. Acesso em: 27 jul. 2015.

VICENTE, M. A. A; ALMEIDA, W. A. B; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/NjO63a>>. Acesso em: 04 jul. 2015.

VICTÓRIO. C. P.; LAGE, C. L. S.; SATO, A. Tissue culture techniques in the proliferation of shoot and roots of *Calendula officinalis*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 3, p. 539-545, Jul./Set. 2012. Disponível em:<<http://goo.gl/izdV3G>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 64-70, jan./mar. 2013. Disponível em:<<http://goo.gl/dOKr1Y>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.78, v. 2-3, p. 193-200, Dec. 2001. Disponível em:<<http://goo.gl/TdqbSK>>. Acesso em: 09 dec. 2015.

CAPÍTULO II - Micropropagação in vitro de *Conobea scoparioides* Benth.

RESUMO

A *Cononobeia scoparioides* é uma planta herbácea e aromática. Não possui sistema de propagação sistemático eficiente. Objetivou-se com este trabalho identificar um processo de micropropagação. Foi observado o comportamento de três tipos de explantes (apical, nodal e internodal) em quatro doses de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹) no meio MS sólido na proliferação de brotos; já na fase de enraizamento foram estudadas duas concentrações do MS (1/1 e 1/2) líquido com quatro doses de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 0,75 mg.L⁻¹). A obtenção de brotos viáveis ocorreu através dos segmentos caulinares apicais e nodais na ausência e na presença de 1 mg.L⁻¹ de BAP. A percentagem de enraizamento e número de raízes foi superior no meio de cultivo líquido MS 1/1, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB. A pataqueira se micropropagada através do meio de cultura MS, sendo otimizada na presença dos reguladores de crescimento, BAP e AIB, utilizando os explantes apicais e/ou nodais.

Palavras-chave: Organogênese direta. Pataqueira. Reprodução assexuada.

ABSTRACT

Conobea scoparioides is an aromatic herbaceous plant. It did not have an efficient propagation system. The aim of this work was to identify a micropropagation process. The behavior of three explant types was investigated (apical, nodal and internodal) in four BAP doses (0.0; 1.0; 2.0 and 3.0 mg L⁻¹) in solid MS medium in shoot proliferation; in the rooting stage, though, two concentrations of liquid MS medium (1/1 and 1/2) with four IBA (0.0; 0.25; 0.5 and 0.75 mg L⁻¹) doses were studied. The obtaining of viable shoots occurred through shoot apex and nodal segments in the absence and in the presence of 1 mg.L⁻¹ de of BAP. The percentage of rooting and the number of roots were superior in the 1/1 liquid MS + 0.5 mg.L⁻¹ IBA. Pataqueira can be micropropagated through MS culture medium, being optimized in the presence of growth regulators, BAP and IBA, using the apical and/or nodal explants.

Key words: Asexual reproduction. Direct organogenesis. Pataqueira.

1 INTRODUÇÃO

Cono-bea scoparioides Benth., conhecida como “pataqueira”, erva de grande utilidade, é matéria-prima de óleos essenciais para formulação de perfume industrializado no Brasil (OLIVEIRA, 2015). Devido à exploração indiscriminada, muitas vezes não há quantidade suficiente para abastecer o mercado com plantas. Assim, tem-se desenvolvido pesquisas na tentativa de encontrar um método de propagação sistemático para a espécie.

González Mina e Hurtado Montano (2011) estudaram a propagação de pataqueira por semente, obtendo em média 51% de germinação, e por via de estaquia apenas 37% de vigamento. Percebe-se que os métodos de propagação apresentam limitações.

Para tanto, a cultura de tecidos vegetais pode ser uma alternativa, já que está intimamente ligada a ação dos fitohormônios e tem facilitado a compreensão do crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições controladas. Entre as substâncias reguladoras de crescimento, a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é a mais usada no processo de indução de brotos. Rotineiramente também se encontra a auxina, ácido indolbutírico (AIB), nos estudos de rizogênese in vitro. Em decorrência disto, algumas espécies medicinais como *Artemisia annua* L. (HAILU; ABERA; MARIAM, 2013) e *Calendula officinalis* (VICTÓRIO et al., 2012) estabeleceram o protocolo de micropropagação in vitro.

Para elaboração de um protocolo de propagação em condições controladas, outros fatores influenciam; entre eles o tipo do explante, a concentração dos sais e a consistência do meio de cultura. O segmento apical foi amplamente usado pelos pesquisadores Tonieto; Perini e Tonieto (2008) na micropropagação da menta. A concentração do nitrogênio pela ½ no meio nutritivo de consistência líquida obteve sucesso no enraizamento de *Phyllanthus tenellus* Roxb (VICTÓRIO et al., 2010), enquanto que o meio de cultivo sólido promoveu maiores médias de proliferação e de enraizamento de brotos de teca (FERMINO JÚNIOR; NAGAO; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009).

Desta maneira, a técnica de cultura de tecidos vegetais através da micropropagação pode ser promissora como método de propagação para a pataqueira. Assim, neste trabalho teve-se como objetivo identificar um processo de micropropagação para a pataqueira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 I Experimento: multiplicação in vitro

Os explantes utilizados foram obtidos a partir de plantas de pataqueira estabelecidas in vitro. Em câmara de fluxo laminar horizontal (Pressão 0,22 mm H₂O), segmentos caulinares apical, nodal e internodal com tamanhos de 1,0 cm de comprimento foram inoculados em frascos de 200 mL contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado com 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e solidificado com phytigel a 0,2%. Em seguida, os frascos foram mantidos em sala de crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 3x4 (segmentos caulinares x concentrações de BAP) totalizando 12 tratamentos, representados por dez repetições e cada repetição representada por um frasco contendo três segmentos. Após 30 dias da inoculação, foi avaliada a percentagem de sobrevivência, o número de brotos e altura dos brotos.

2.2 II Experimento: rizogênese in vitro

Os explantes utilizados foram obtidos a partir de plantas de pataqueira estabelecidas in vitro e mantidas no meio de cultura MS sólido na ausência de regulador de crescimento. Segmentos caulinar apical de $\pm 1,5$ cm de comprimento e com um par de folhas foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura líquido em duas concentrações (1/2 e 1/1) de sais minerais do meio MS, suplementados com 0,0; 0,25; 0,50 e 0,75 mg.L⁻¹ de Ácido indol butírico (AIB). Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio (2,5 x 2,5 x 8 cm) contendo pontes de papéis filtro como base para o meio líquido. O material foi mantido em sala de crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 2x4 (duas concentrações de sais MS x quatro concentrações de AIB), totalizando oito tratamentos com 10 repetições e cada repetição representada por um explante/tubo. Após trinta dias de incubação foram avaliados a percentagem de enraizamento, número de raízes/broto e porcentagem de sobrevivência dos brotos.

2.3 Condições dos meios nutritivos e da sala de crescimento

O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$. Posteriormente foram autoclavados a 120°C , 1 atm, por 20 minutos. A sala de crescimento manteve a temperatura média de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro, irradiância de fótons de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilização de lâmpadas Silvania F40 W T10.

2.4 Análises estatísticas

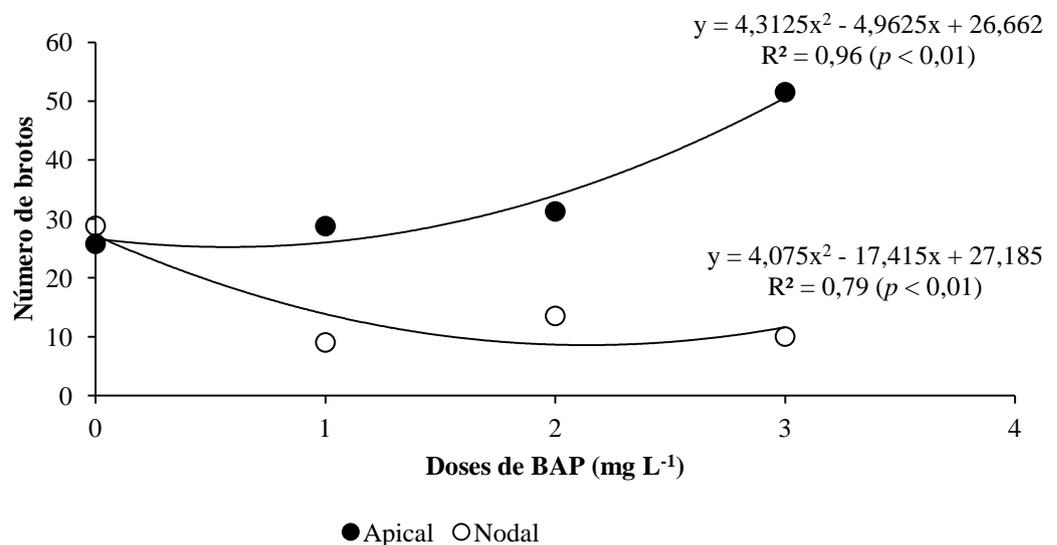
Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para verificar o comportamento das variáveis números de brotos e percentagem de enraizamento em função das doses de BAP e AIB foram avaliadas pela análise de regressão ($P < 0,05$) utilizando o software estatístico ASSISTAT Versão 7.7.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Multiplicação in vitro

No Gráfico 1, observa-se que os números de brotos dos segmentos apicais e nodais se diferenciam de forma crescente a partir da menor dose de BAP (1 mg.L^{-1}). Enquanto o segmento apical aumenta o número de brotos com o aumento das concentrações de BAP, o segmento nodal diminui o número de brotos com o aumento das dosagens de BAP. A relação positiva de indução de brotos entre o BAP e o segmento apical foi de 96% de acordo com o comportamento de tendência quadrática. Entende-se que o estímulo do BAP exógeno depende do tecido em que está atuando e da concentração adequada. Segundo Fermino Junior; Nagao e Scherwinski (2009) existe uma menor quantidade de receptores de BAP e/ou menor concentração endógena em tecidos mais velhos. Vicente; Almeida e Carvalho (2009) indicam a dose de 1 mg.L^{-1} BAP para melhor multiplicação de brotos de *Vernonia condensata*.

Gráfico 1 - Número de brotos de pataqueira cultivados em meio de cultura MS com adição de doses de BAP.



Fonte: Elaborada pela autora.

Verifica-se nos resultados da Tabela 1, que ocorreu interação com diferenças significativas entre as concentrações de BAP e o tipo de explante para número de brotos. O maior valor significativo foi obtido na presença de 3 mg.L^{-1} de BAP + segmento caulinar

apical com a média de 51,5 brotos/explante e o menor valor com 1 mg.L⁻¹ de BAP + o segmento caulinar nodal com a média de 9,0 brotos/explante. Foi observado que o aumento da concentração de BAP na presença do segmento caulinar apical aumentava o número médio de brotos em forma de roseta. A formação de rosetas pode ser uma consequência negativa do determinismo da citocinina sobre a formação de brotos. Isto ocorre quando há excesso de citocinina, provocado pela soma da fonte endógena mais exógena (NOGUEIRA et al., 2007). Assim, foi observado na interação que a maior média do número de brotos de 34,31 ocorreu na presença do segmento caulinar apical quando comparada com a média do segmento caulinar nodal (15,32).

Tabela 1 - Percentagem de sobrevivência (SOB), número (NB) e altura (cm) de brotos (ALT), de pataqueira cultivados in vitro em meio MS com adição de doses de BAP.

	Explante								
	Apical	Nodal				Apical	Nodal		
BAP (mg.L ⁻¹)	SOB	\bar{x} BAP	NB	\bar{x} BAP	ALT	\bar{x} BAP			
0	90	80	56,67a	25,75bA	28,80aA	27,44b	3,07	2,42	2,77a
1	80	20	33,33b	28,75bA	9,00bB	22,17b	2,65	1,29	2,26a
2	70	20	30,0b	31,25bA	13,50bB	25,33b	1,13	0,84	1,05b
3	80	20	33,33b	51,50aA	10,00bB	37,67a	1	0,7	0,89b
\bar{x} de Explantes	80,0A	35,0B		34,31A	15,32B		1,96A	1,53A	
C.V (%)	29,04		21,9			31,16			

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Vale destacar que na ausência do regulador de crescimento as médias dos números de brotos provenientes dos segmentos caulinares apicais e nodais não diferiram entre si e apresentaram brotos bem definidos em médias de 25,7/explante e 28,8/explante, respectivamente. Sugerindo que os dois segmentos de pataqueira apresentam capacidade morfogênica na formação de brotos independente da presença de citocinina exógena. O mesmo correu com ipê-roxo in vitro, que quando na ausência de citocinina obteve os maiores valores de produção de brotos (MARTINS et al., 2009). Segundo este autor, a citocinina endógena é o suficiente para induzir alta proliferação de brotos.

Não houve interação entre as concentrações de BAP e os tipos de explantes para as variáveis de percentagem de sobrevivência e altura dos brotos. Assim, para a percentagem

de sobrevivência a maior média (80 %) foi obtida na presença do segmento caulinar apical, enquanto o segmento caulinar nodal obteve uma média de 35 % de sobrevivência. Não houve sobrevivência para o segmento caulinar intermodal, a menor quantidade de tecido meristemático presente nesse tipo de explante deve ter influenciado no resultado.

Segundo Erig e Fortes (2002) todos os tecidos vegetais apresentam totipotência, mas se tratando de micropropagação os explantes mais eficientes são aqueles que possuem maior quantidade de tecido meristemático, como as gemas e meristemas. Essa resposta vai depender também da espécie, pois Amaral et al. (2007) obtiveram através do segmento internodal de *Ocimum selloi* uma frequência de organogênese de 93,33%, em meio de cultivo MS. Na micropropagação da ipecacuanha o explante mais eficiente na multiplicação de brotos tem sido o segmento caulinar internodal (LAMEIRA et al., 1994). Por outro lado, Golle et al. (2012) afirmaram que os segmentos apical e nodal são os mais promissores no estabelecimento de *Eugenia involucrata* DC.

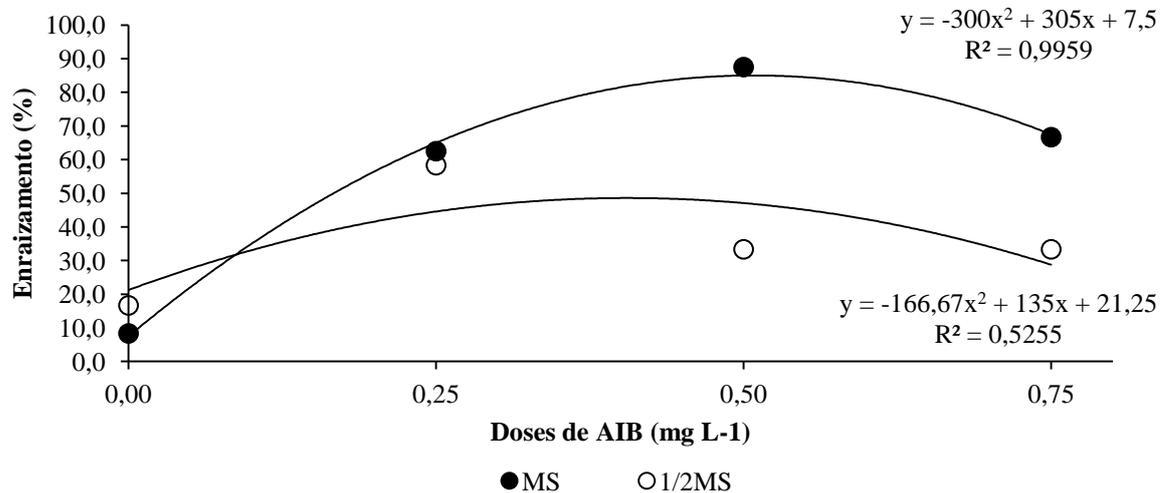
Para altura dos brotos as maiores médias foram obtidas na ausência e com 1 mg.L⁻¹ de BAP, respectivamente 2,77 cm e 2,26 cm, sem ocorrer diferença significativa. Pode-se observar que à medida que a concentração de BAP aumentava, o tamanho dos brotos era reduzido, originando brotos em forma de rosetas. Estes resultados corroboram com os de Vicente; Almeida e Carvalho (2009), quando *Vernonia condensata* Baker esteve na ausência de BAP apresentou maior altura média.

3.2 Rizogênese in vitro

Nos resultados apresentados no Gráfico 2, pode ser observado que as maiores porcentagens de enraizamento são promovidas pela interação entre o AIB e os dois meios MS, e que eles apresentam picos máximos em diferentes concentrações de AIB, o MS (1/2) em 0,25 mg.L⁻¹ e o MS (1/1) em 0,50 mg.L⁻¹, sendo a média do MS (1/1) superior ao do MS (1/2). Entende-se que a maior indução de raiz nos brotos de pataqueira está na dependência da ação ótima do AIB, e este depende da concentração de nutrientes do meio. De forma que Bielach et al. (2012) relatam que uma concentração excessiva de AIB (0,75 mg.L⁻¹) no meio nutritivo pode ser tóxica. Assim, o maior enraizamento nos brotos de *Menta sp* foi observado na ausência de auxina exógena no meio MS 1/1 (TONIETTO; PERINI; TONIETO, 2008). Percebe-se que o nível de ocorrência da rizogênese também é influenciado pela quantidade

interna de hormônios, ou seja, a espécie é um fator determinante no processo organogênico de raiz in vitro.

Gráfico 2- Percentagem de enraizamento em função das doses de AIB.



Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se na Tabela 2 que houve interação entre meio MS líquido com AIB para as porcentagens variáveis de enraizamento e número de raiz, mas não para percentagem de sobrevivência. A maior percentagem de enraizamento (87,50%) ocorreu no meio MS líquido 1/1 na presença de AIB a 0,5 mg.L⁻¹ e a menor percentagem foi de (8,33%) na ausência de regulador. No MS líquido ½ + 0,25 mg.L⁻¹ de AIB foi verificado o máximo de 58,33% de enraizamento enquanto o mínimo de 16,67% ocorreu no controle.

Tabela 2- Avaliação da sobrevivência (%) =SOB , enraizamento (%) = ENR, número de raiz = NR, dos brotos de Pataqueira cultivados in vitro em meio MS Líquido (1/1= concentração original) e (1/2 = concentração modificada) com adição de doses de AIB.

AIB (mg.L ⁻¹)	Meio MS Líquido											
	(1/1)			(1/2)			(1/1)			(1/2)		
	SOB	\bar{x} AIB	ENR	\bar{x} AIB	NR	\bar{x} AIB						
0,00	76,67	75,00	75,83b	8,33Ab	16,67Aa	12,50b	2,081Ab	1,614Ab	1,841b			
0,25	100,0	100,0	100,0a	62,50Aa	58,33Aa	60,42a	3,749Aa	3,187Aa	3,468a			
0,50	100,0	93,33	96,67a	87,50Aa	33,33Ba	60,42a	4,953Aa	2,547Bab	3,749a			
0,75	100,0	86,67	93,33a	66,67Aa	33,33Ba	50,00a	4,521Aa	2,329Bab	3,425a			
\bar{x} de Meios	94,17A	88,75A		56,25A	35,42B		3,826A	2,329B				
C.V (%)	17,74			34,38			30,21					

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pelo autor

Assim, pode-se dizer que para indução de maior percentagem de enraizamento, os brotos de pataqueira necessitam de maior concentração de sais (1/1) e presença de AIB. Desta forma, potencializou-se a rizogênese numa escala de 10 vezes mais. Este comportamento corrobora com os de Victório et al. (2010), nos quais a rizogênese de *Phyllanthus tenne* Roxb foi intensificada na presença de AIB. Segundo Friend; Coleman e Berbrands (1994), durante a fase de enraizamento in vitro o metabolismo das plântulas encontra-se acelerado e produzindo novos compostos, precisando assim da adição de maiores concentrações de nutrientes e da presença de reguladores que proporcionem melhor aproveitamento deste estado metabólico em que se encontra o vegetal.

O número de raízes/broto seguiu a mesma tendência da percentagem de enraizamento, ou seja, a interação do meio MS 1/1 + 0,50 mg.L⁻¹ de AIB também potencializou esta variável, promovendo 5 raízes/broto; já o tratamento controle apresentou 2 raízes por broto. Enquanto no MS 1/2 + 0,25 mg.L⁻¹ de AIB foi observado 3 raízes/explante e o controle apresentou aproximadamente 2 raízes por explante. Este contexto é semelhante ao verificado em orquídea, quando o maior número de raízes foi promovido pelas menores concentrações de AIB (1 e/ou 2 mg.L⁻¹) no meio MS (SILVA et al., 2013). Segundo Salisbury e Ross (2006), a eficiência do AIB no processo da rizogênese é devida a rápida metabolização, principalmente na fase final de formação do órgão.

A sobrevivência dos brotos de pataqueira independe da concentração de nutrientes do meio MS propostos neste estudo. Logo, podemos inferir que as duas concentrações de sais

suprem as necessidades nutricionais de forma semelhante. Este resultado corrobora com os de Tonietto; Perini e Tonieto (2008), no qual a menta in vitro cresceu de forma semelhante nos meios MS 1/3 e 1/1 de sais.

As percentagens de sobrevivência nos tratamentos com auxina não se diferenciaram entre si e foram superiores ao controle. A presença de AIB ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$) garantiu 100% enquanto o controle apresentou 75,83%. É de conhecimento geral que as auxinas induzem o enraizamento e este aumenta a capacidade de absorção dos nutrientes, o que explica haver quantidade superior de brotos vivos nos meios com o regulador de crescimento. Contudo, existem espécies que não precisam de auxina exógena para induzir positiva e significativamente o enraizamento e a sobrevivência. Machado et al. (2013), ao estudar o enraizamento da *Landula angustifolia* Miller, verificaram que a presença de AIB no meio MS não é vantajosa para a sobrevivência nem para o enraizamento dos brotos in vitro. O AIB promoveu diferenças significativas nas três variáveis, entendendo-se que a ação desta auxina é essencial para promover mudanças no desenvolvimento dos brotos de pataqueira in vitro.

4 CONCLUSÃO

A pataqueira se micropropagada através do meio de cultura MS, sendo otimizada na presença dos reguladores de crescimento, BAP e AIB, utilizando os segmentos apicais e/ou nodais.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, C. L. F. et al. Indução de organogênese em alfavaca (*Ocimum selloi* Benth) cultivados *in vitro*: Efeito da posição dos explantes e dos agentes gelificantes do meio. **Diálogos & Ciência**, Salvador, ano. V, n. 12, p. 1-8, 2007.
- BIELACH, A. et al. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, biological sciences**, v. 367, n. 1595, p. 1469-78, Jun. 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/lfRLzC>>. Acesso em: 21 de agosto de 2015.
- COSTA, R. G. et al. Essential oil of pataqueira (*Conohea scoparioides* Benth.): From natural occurrence and produced by hydroponics. **Advances in Plants & Agriculture Research**, Oklahoma, v.1, n. 3, p. 1-5, July. 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/A5POCW>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- ERIG, A. C.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, Ciência Rural, v. 32, n. 4, p. 577-582, 2002. Disponível em: <http://goo.gl/DeKRkn>. Acesso em: 03 set. 2015.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P; NAGAO, E. O; Scherwinski-Pereira, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f) a partir de genótipos da Amazônia Sul - Ocidental. **Scientia Forestais**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/fo5qJ9>>. Acesso em: 22 abr. 2015.
- FRIEND, A.L; COLEMAN, M.D; BERBRANDS, J. G. Carbon allocation to root and shoot systems of woody plants. In: DAVIS, T.D; HAISSIG, B.E. (Eds.). **Biology of adventitious root formation**. New York: Plenum, 1994. V. 1, p. 249.
- GOLLE, D.P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012. Disponível em:<<http://goo.gl/pVYjtQ>>. Acesso em: 09 jun. 2015.
- GONZÁLEZ MINA, R. T.; HURTADO MONTAÑO, A. M. Primeros ensayos para El cultivo y caracterización Del aceite esencial de *Conohea scoparioides* (Cham. & Schltl.) Benth. Para El Pacífico colombiano. **Entramado**, Cali, v. 7, n. 2, p. 174-185, July./Dec. 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/i13kXn>>. Acesso em: 20 mar. 2015.
- HAILU, T; ABERA, B; MARIAM, G. *In vitro* mass propagation of Artemisia (*Artemisia annua* L.) cv: Anamed. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Bangladesh, v. 23, n. 2, p. 165-176, 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/yaqjs4>>. Acesso em: 14 jul. 2015.
- LAMEIRA, O. A. et al. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after threes subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 523-526, Sept./Dec. 1994. Disponível em: <<http://goo.gl/VYUI21>>. Acesso em: 01 out. 2015.

- MACHADO, M.P. et al. Application of IBA on in vitro and ex vitro rooting microcutting of *Lavandula angustifolia* Miller. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 2, p. 153-161, May. 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/4LLunb>>. Acesso em: 11 jun. 2015.
- MARTINS, J. P. R. et al. Multiplicação *in vitro* de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9, 2009, São Lourenço, Minas Gerais. **Anais....**São Lourenço: SBE, 2009. Disponível em:< <https://goo.gl/9rXu6o>>. Acesso em: 22 abr. 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Hudson, v. 15, p. 473-497, July. 1962. Disponível em: <<http://goo.gl/UYfn0>>. Acesso: 16 set. 2015.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de muruci-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, Mar./Abr. 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/g8oy1o>>. Acesso em: 02 jun. 2015.
- OLIVEIRA, D. **Manual ilustrado: Pataqueira**. 1. Ed. [s.l.]: NATURA COPYRIGHT, 2015. 29p.
- SALISBURY, F.; ROSS, C. **Fisiología de las plantas - Desarrollo de las Plantas y Fisiologia Ambiental**. Madrid, Thomson Edited Spain Paraninfo, v. 3, 2006, 460p.
- SILVA, D. M. et al. Efeito das Auxinas ácido naftaleno acético e indol butírico no desenvolvimento in vitro de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerium* Rchb. F. (ORCHIDACEAE). **Enciclopedia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 852-860, 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/sf2vaA>>. Acesso em: 12 jun. 2015.
- TONIETTO, S.M; PERINI, C. B; TONIETTO, A. Concentrações e composição do meio de Murashige & Skoog na micropropagação da menta. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 42-47, 2008. Disponível em: <<http://goo.gl/E2AtC8>>. Acesso em: 27 jul. 2015.
- VICENTE, M. A. A; ALMEIDA, W. A. B; CARVALHO, Z. S. Multiplicação in vitro e aclimatação de *vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/NjO63a>>. Acesso em: 04 jul. 2015.
- VICTÓRIO, C. P. et al. Standardized production of *Phyllanthus tenellus* Roxb. By plant tissue culture. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 272-278, Apr./June. 2010. Disponível em: <<http://goo.gl/TysMGK>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

**CAPÍTULO III – Efeito do subcultivo in vitro na formação de plântulas de
Conobea scoparioide Benth.**

RESUMO

O Brasil é mundialmente o terceiro maior consumidor de perfumes. A planta pataqueira é produtora de óleos essenciais (timol, metiltimol e α -felandreno), cujo balanceamento produz um agradável aroma. A exploração predominante da espécie é extrativista. Objetivou-se com esse trabalho determinar o número de subcultivos viáveis na formação de plântulas de pataqueira. Para tanto, cinco subcultivos no meio MS adicionado com 1 mg.L^{-1} de BAP foram avaliados a cada trinta dias, levando em conta a porcentagem de senescência, brotos responsivos, enraizamento, o número de brotos com altura $\geq 1 < 2 \text{ cm}$, número de brotos $\geq 2 < 3 \text{ cm}$, número total de brotos e altura do maior broto. Os dados coletados foram estatisticamente avaliados através da ANOVA e teste de média. O quarto subcultivo mostrou maiores médias em todas as variáveis com exceção da altura do maior broto e apresentou taxa média de brotos/explante de 24, enquanto que a quinta repicagem induziu maior porcentagem de senescência, menor porcentagem de brotos e raízes e altas médias para número de brotos com altura $\geq 1 < 2 \text{ cm}$ e $\geq 2 < 3 \text{ cm}$. Os subcultivos do primeiro ao quarto em intervalos de até trinta dias são viáveis para formação de plântulas de pataqueira in vitro.

Palavras-chave: Pataqueira. Propagação clonal in vitro. Sucessivas repicagens.

ABSTRACT

Brazil is the world's third largest perfume consumer. The pataqueira plant produces essential oils (thymol, methylthymol and α -phellandrene), and when balanced those produce a lovely aroma. The exploration of this species is extractive. The aim of this work was to determine the number of viable subcultures in the pataqueira plantlings formation. For this purpose, five subcultures in MS medium supplemented with 1 mg L^{-1} of BAP were evaluated every 30 days, taking into account the percentage of senescence, responsive shoots and rooting, as well as the number of shoots with height $\geq 1 < 2$ cm, number of shoots with $\geq 2 < 3$ cm, total number of shoots and height of the highest shoot. The collected data were statistically evaluated through ANOVA and test of means. The fourth subculture presented higher means for all variables with the exception of height of the highest shoot and presented a mean rate of shoot/explant of 24, while the fifth subculture induced the highest senescence percentage and the smallest percentage of shoots and roots, but presented high means in the number of shoots with height $\geq 1 < 2$ cm, number of shoots $\geq 2 < 3$ cm. The subcultures from the first to the fourth in intervals of up to thirty days are viable for the in vitro formation of pataqueira plantlings.

Key words: Clonal propagation in vitro. Pataqueira. Successive pricking out.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é mundialmente o terceiro maior consumidor de perfumes, ficando atrás dos Estados Unidos e da China (ABIHPEC, 2015). Com isto, segundo Barata (2012), a busca por novas tecnologias é crescente, estimulando as indústrias de perfumaria no Brasil a se aliarem as universidades e centros de pesquisas.

A *Conobea scoparioides* é uma erva aromática e faz parte da biodiversidade da floresta amazônica. Na região norte do Brasil, habita terras úmidas de beira de rios e igarapés; é herbácea de pequeno porte (MAIA; ANDRADE, 2009); pertencente à família Plantaginaceae (SOUZA; LORENZI, 2008). Entre suas características mais marcantes, destaca-se por conter óleos essenciais como timol, metiltimol e α -felandreno que expelem odores agradáveis (COSTA et al., 2014) e atualmente geram produtos finais no ávido mercado brasileiro de perfumes e cosméticos (OLIVEIRA, 2015). Além disso, possui princípio ativo cucurbitacina E (MUSZA et al, 1994) usado no tratamento de câncer de próstata (DUNCAN et al., 1996), avitaminose B1 e malária (GONZÁLEZ MINA; HURTADO MONTANO, 2011). Em decorrência de a exploração extrativista ser predominante, ocorre temporariamente falta da planta no mercado.

A técnica de cultura de tecidos vegetais é amplamente usada para produção em escala industrial de plantas que possuem produtos naturais de alto valor. Para tanto, segundo DAGLA (2012), é essencial o conhecimento da biologia da planta, uma vez que cada espécie tem necessidades diferentes e, portanto, distintos padrões de crescimento e desenvolvimento. O estabelecimento de plantas assépticas e a multiplicação *in vitro*, são fundamentais para o sucesso da propagação a nível comercial.

A micropropagação de plantas através da organogênese direta é o método mais rápido e com menor variação genética ao longo do tempo. Entretanto, D'amato (1986) referencia que em decorrência dos sucessivos subcultivos na presença de fitoreguladores pode haver a indução de variações somaclonais no material cultivado, o que é indesejável à propagação clonal. Por outro lado, as repicagens são importantes para efeito de maior segurança do material vegetal asséptico, otimização da taxa de multiplicação e conservação do germoplasma *in vitro*. Por outro lado, a presença constante de reguladores de crescimento – como as citocininas nas subculturas – pode influenciar negativamente a taxa de multiplicação assim como o enraizamento de brotos, dificultando a aclimatização das

plântulas e conseqüentemente inviabilizando a propagação em larga escala. Desta forma, como cada espécie vegetal possui peculiaridades metabólicas, se torna necessária a elaboração de protocolos de micropropagação específicos a fim de atingir respostas eficientes (VIDAL; DINIZ; SILVA, 2013).

Um protocolo de micropropagação é composto de várias etapas que em linhas gerais são: fase de assepsia e estabelecimento do explante; multiplicação de brotos; enraizamento das brotações; e aclimatização (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A possibilidade de compactar o protocolo, fazendo com que as morfogêneses dos órgãos ocorram simultaneamente e de forma eficiente, com vistas à aclimatização, é de suma importância, pois torna o protocolo resumido, prático e econômico. Deste modo, o objetivo do trabalho foi determinar o número de subcultivos viáveis na formação de plântulas de pataqueira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Plantas matrizes

Plantas de *Conobea scoparioides* foram coletadas na área experimental e cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental em Belém-PA (latitude 01° 26' S; longitude 48° 26' W e altitude 23m). O cultivo se deu em telado com sombrite a 70%, com temperatura média de 30±2°C, umidade relativa do ar 90% e fotoperíodo natural. Exemplares da espécie estão depositados no Herbário do Museu Emílio Goeldi (MPEG), Belém-PA, sob a identificação n^o 08, voucher: MG 177411.

2.2 Estabelecimentos in vitro

Segmentos caulinares apicais com ± 2 cm de comprimento foram seccionados das plantas mantidas no Horto. No Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, os segmentos em câmara de fluxo laminar (pressão 0,22 mm H₂O) receberam tratamento de assepsia com álcool 70% (v/v) por três minutos e posteriormente hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1,5% (v/v) por cinco minutos, em seguida foram lavados em água autoclavada por três vezes. Posteriormente, foram incisados à ± 1,5 cm de comprimento e inoculados na posição vertical em tubos de ensaio (2,5 x 2,5 x 8 cm) contendo 10 mL do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem regulador, solidificado com Phytigel^{Sigma®} 0,2%, fechados com tampas plásticas e vedados com filme PVC. Após o desenvolvimento em plantas assépticas, serviram como fonte de explantes.

2.3 Multiplicação in vitro

Das plântulas assépticas, foram retirados os segmentos apicais com tamanho de 1,5 cm de comprimento, inoculados em frascos de vidro de 200 mL contendo 30 mL de meio MS adicionado com 1,0 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP), solidificado com Phytigel^{Sigma®} em seguida mantidos em sala de crescimento. Após trinta dias os brotos produzidos, em média 25,75 brotos/explante, foram utilizados no primeiro subcultivo.

2.4 Experimento: número de subcultivos

Foi instalado o experimento em uma seqüência de cinco subcultivos, de forma semelhante à multiplicação *in vitro*. A cada trinta dias, de um subcultivo para o outro, foram avaliados os percentuais de sobrevivência; senescência; frequência de brotos; o número total de brotos; altura do maior broto; número de brotos $\geq 1,0 < 2,0$ cm (tipo 1, com tamanho ideal à fase de multiplicação); e número de brotos $\geq 2,0 < 3,0$ cm (tipo 2, com tamanho ideal à otimização de enraizamento). Consideraram-se brotos aptos à aclimatização os que alcançaram altura $\geq 3,0$ cm (tipo 3).

2.4.1 Condições dos meios nutritivos e da sala de crescimento

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8. Posteriormente foram autoclavados a 120°C, 1 atm, por 20 minutos. A sala de crescimento manteve a temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de escuro, irradiância de fótons de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilização de lâmpadas Sylvania F40 W T10.

2.4.1 Análises Estatísticas

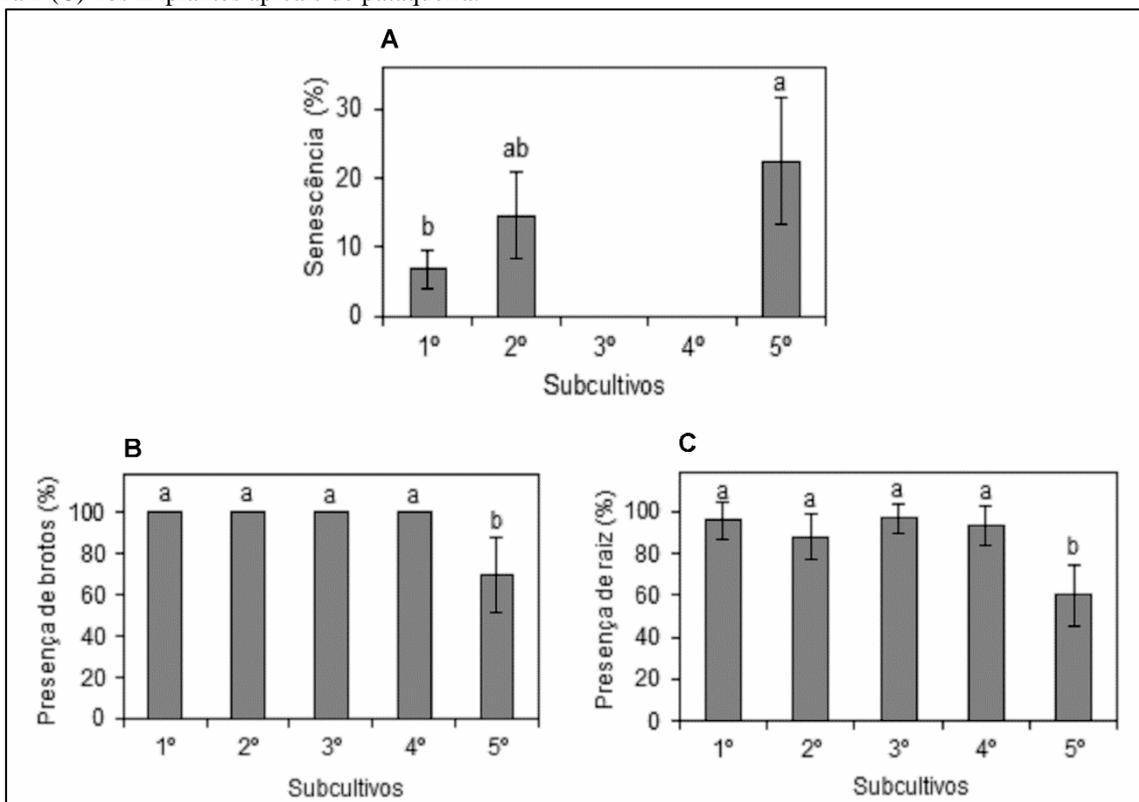
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Constituído por cinco tratamentos (cinco subcultivos) e cinco repetições, cada uma composta de dois frascos, cada frasco contendo três explantes apicais, totalizando seis explantes/repetição e trinta por subcultivo. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Número de subcultivos

A senescência observada na Figura 1A nos brotos apicais ocorreu de forma diferente entre os subcultivos, alcançando maior proporção no quinto subcultivo e ausência no terceiro e quarto ciclos de cultivo. Victório; Lage e Sato (2012) também observaram a presença de senescência quando subcultivaram *calendula officinalis* no sexto ciclo. Sabe-se que as citocininas normalmente retardam a senescência, porém em níveis supra-óticos estimulam a produção de etileno (CARY; LUI; HOWELL, 1995); este promove a degradação das clorofilas, instalando o processo de senescência. A partir disso, considera-se uma possível explicação para a senescência dos brotos in vitro de pataqueira. As outras variáveis qualitativas, presença de brotos e raízes (Figuras 1B e 1C) não apresentaram diferenças significativas até o quarto ciclo de subcultivo e mantiveram maiores médias em relação ao quinto subcultivo, o qual teve menor valor médio.

Figura 1- Influência dos subcultivos nas percentagens de senescência (A), presença de brotos (B) e presença de raiz (C) nos Explantes apicais de pataqueira.



Fonte: Elaborada pela autora.

Este contexto demonstra que o processo próximo de 100% de morfogênese de broto e raiz não foi afetado pelo acúmulo de citocinina até certa concentração. Um possível efeito tóxico residual de BAP nos tecidos pode ter ocorrido a partir do quinto subcultivo, culminando em menor valor médio de explantes responsivos para ambos os órgãos, 70% e 60%, respectivamente. De acordo com Placková et al. (2015), o subcultivo com citocinina eleva seu nível a um excesso, inibindo o enraizamento de *Pisum sativum*, fato este prejudicial à fase de aclimatização. Smykal et al. (2007) relatam que brotos de repicagens mais antigas têm maior dificuldade no enraizamento do que os de culturas mais novas. Por outro lado, esta classe de regulador de crescimento, quando em adequadas concentrações, induz a divisão e a diferenciação celular, acelerando o desenvolvimento tanto de raízes quanto de brotos in vitro.

As variáveis quantitativas serviram para apoiar os resultados anteriores e especificar melhor a situação. Assim, observando as Figuras 2A, 2B e 2C, percebe-se que as subseqüentes repicagens agiram diferentemente sobre o número total de brotos; altura do maior broto (Broto com vistas à aclimatização – tipo 3); número de brotos $\geq 1 < 2$ cm de altura (adequados a um novo subcultivo – tipo 1); e número de brotos $\geq 2 < 3$ cm de altura (adequados à fase de otimização de enraizamento – tipo 2).

A perspectiva acima refletiu um provável desbalanço na proporção de auxina: citocinina nos brotos de pataqueira, porém em nenhuma destas situações foi observado formação de calo e nem somaclones diferenciados a nível mutagênico ou epigenético. Já em muruci-pequeno, segundo Nogueira et al. (2007), a predominância de citocinina vinda da soma endógena mais exógena pode ter influenciado a formação de calos.

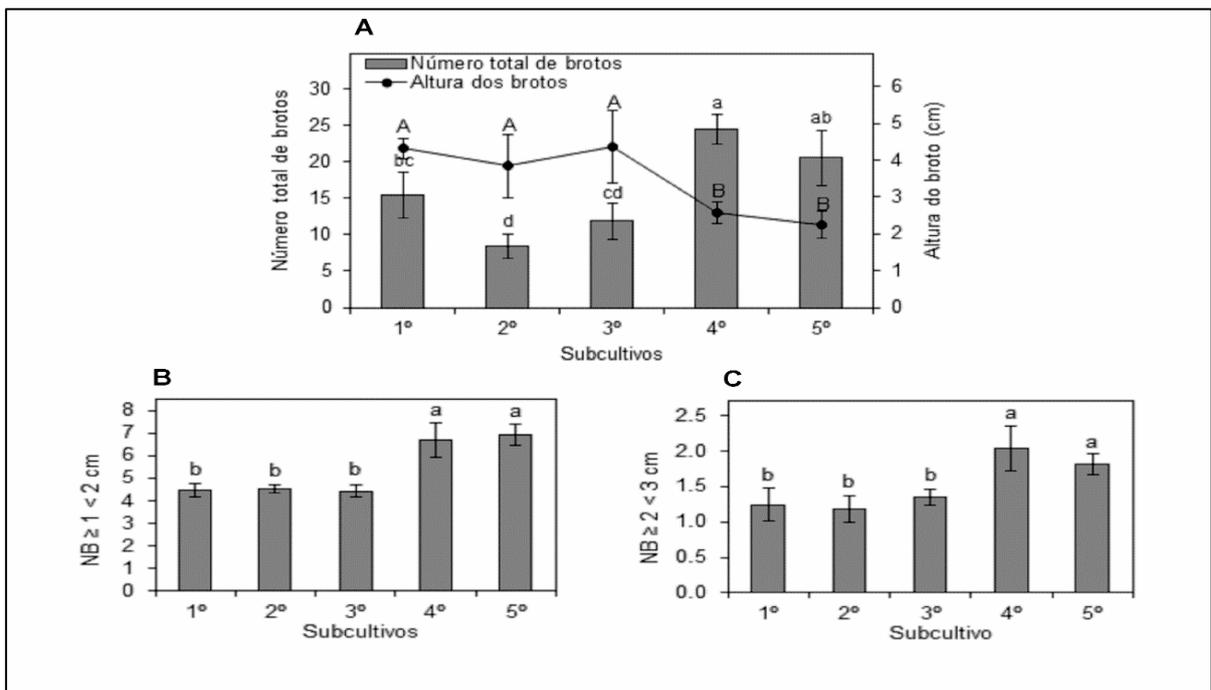
As maiores médias de alturas de brotos tipo 3, altura >3 cm (Figura 2A) foram encontradas nos três primeiros subcultivos de forma estaticamente semelhantes, enquanto que no quarto e quinto ciclos ocorreram às menores médias sem diferirem entre si. Deste modo, pode-se inferir novamente que o efeito tóxico do acúmulo de citocinina às menores alturas dos brotos pode ter ocorrido diretamente por ação do etileno que teve sua síntese estimulada. De acordo com Colli e Purgatto (2008), o etileno em excesso age negativamente no ciclo celular, afetando o alongamento das células, resultando em menor crescimento em altura da parte aérea.

Exemplo disto ocorreu com as brotações de *Annona glaba*, que quando expostas a níveis elevados de citocinina tiveram o comprimento negativamente afetado (SANTANA et

al., 2009). Em relação ao número total de brotos (Figura 2A) os dois últimos subcultivos induziram as maiores médias sem diferença estatística, porém com destaque à superior média para o quarto ciclo e a sinalização do quinto ciclo para a diminuição. Este resultado corrobora com os de Perveen et al. (2013), pois na quarta repicagem de *Caribbean copper* houve aumento na taxa de brotos/explante seguida de declínio no quinto cultivo. Neste aspecto, a citocinina acumulada manteve a ação inerente desta classe de regulador de crescimento, ou seja, induziu a proliferação da parte aérea a partir de uma adequada concentração que, quando ultrapassada, passou a ser inibitória.

Em relação ao número de brotos (Figura 2B e 2C) do tipo 1 (altura $\geq 1 < 2$ cm) e tipo 2 (altura $\geq 2 < 3$ cm), as maiores médias foram promovidas por ação do quarto e quinto subcultivos, semelhantes entre si. Já as menores e uniformes médias foram induzidas pelos três primeiros subcultivos. Estes dois distintos comportamentos podem ter ocorrido por ação dos subcultivos, que segundo Perveen et al. (2013) promovem a diferenciação de gemas dormentes logo após a quebra da dominância apical, fato ocorrido neste trabalho a partir do quarto subcultivo.

Figura 2 - Influência dos subcultivos nas médias do número total e altura dos brotos (A), NB - Número de brotos $\geq 1 < 2$ cm (B) e NB $\geq 2 < 3$ cm (C).



Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto à heterogeneidade representada pelos diferentes tipos de brotos em todos os ciclos, supõe-se de que todos sejam drenos e que uns conseguem carrear para si maior quantidade de nutrientes, de acordo com as diferentes quantidades de citocininas endógenas nos distintos brotos. Segundo Taiz e Zeiger (2009), as citocininas são capazes de direcionar os nutrientes no momento do descarregamento dos fotoassimilados aos órgãos consumidores. Por outro lado, considerando que os explantes usados tenham sido segmentos apicais, sendo estes locais de síntese de auxina (VICTÓRIO; LAGE; SATO, 2012), as diferentes alturas dos brotos de pataqueira – assim como as distintas taxas de enraizamento – podem ser decorrentes das diferentes quantidades de auxina endógena produzidas pelos mesmos e somadas à auxina exógena do meio de cultura. Segundo Furtado et al. (2007), no cultivo in vitro as citocininas e auxinas agem de forma antagônicas; assim, quando a quantidade de citocinina é predominante, haverá a quebra da dominância apical, seguida de maior taxa de proliferação de brotos com menor altura. Contudo, se simultaneamente ocorre senescência, entende-se que outro tipo de fitohormônio pode estar em ação afetando a altura, como por exemplo o etileno.

Considerando que para a produção em escala comercial seja necessária a alta produção de brotos e alongamento adequado (VICTÓRIO et al., 2010), no estudo com pataqueira foi demonstrado que a taxa média de multiplicação (25,75 brotos/explante/mês) obtida no primeiro cultivo foi aproximadamente reproduzida no quarto e quinto subcultivo. Somado a isto, a taxa de aproximadamente 100% de enraizamento dos brotos ocorrida até o quarto subcultivo reflete que todas as brotações, após atingirem a altura de 3,0 cm, serão capazes de ir direto para a fase de aclimatização, assim como os brotos responsivos ao enraizamento (60%) da quinta repicagem. Logo, de um modo geral para a micropropagação de pataqueira não houve necessidade da fase de indução de enraizamento.

Werbrouck et al. (1996) afirmam a existência de uma relação direta entre o enraizamento inadequado in vitro e a reduzida taxa de aclimatização. No estudo com pataqueira foi demonstrado que plântulas enraizadas nos subcultivos obtiveram 100% de sobrevivência na aclimatização, além de formarem mudas viáveis ao cultivo no campo.

4 CONCLUSÃO

Os subcultivos, do primeiro ao quarto, em intervalos de até trinta dias são viáveis para a formação de plântulas de pataqueira in vitro.

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. (ABIHPEC):** Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. São Paulo, v. 31, p. 1–22, 2015. Disponível em: <<https://goo.gl/ESQ4n6>>. Acesso em: 17 mar. 2016.
- BARATA, L. E. S. A economia verde – Amazônia. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 31-35, 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/LR7JaL>>. Acesso em: 27 abr. 2015.
- CARY, A. J.; LUI, W.; HOWELL, S. H. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyls elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**, Nebraska, v. 107, n. 04, p. 1075-1082, Apr. 1995. Disponível em: <<http://goo.gl/oVUhl>>. Acesso em: 14 abr. 2016.
- COLLI, S.; PURGATTO, E. Etileno. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 13, p.271-295.
- COSTA, R. G. et al. Essential oil of pataqueira (*Conohea Scoparioides* Benth.): from natural occurrence and produced by hydroponics. **Advances in Plants & Agriculture Research**, Oklahoma, v. 1, n. 3, p. 2-5, 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/A5POCW>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- D' AMATO, F. Spontaneous mutations and somaclonal variation. In: **Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement: International Symposium on Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement**. 1985. Vienna, Austria: International Atomic Energy Commission, 1986. p. 03-10.
- DAGLA, H. R. Plant Tissue Culture: Historical Developments and Applied Aspects. **Resonance**, Índia, v. 17, n. 08, p. 759-767, 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/k5IPJa>>. Acesso em: 13 mar. 2016.
- FURTADO, C. M. et al. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea* L.), utilizando diferentes citocininas. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, v.1, n. 1, p. 51-58, 1^o sem. 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/pNL3uu>>. Acesso em: 07 set. 2015.
- GONZÁLEZ MINA, R. T.; HURTADO MONTAÑO, A. M. Primeros ensayos para El cultivo y caracterización Del aceite esencial de *Conohea scoparioides* (Cham. & Schldl.) Benth. Para El Pacífico colombiano. **Entramado**, Cali, v. 7, n. 2, p. 174-185, July./Dec. 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/i13kXn>>. Acesso em: 20 mar. 2015.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa –SPI / Embrapa – CHPH, 1998, p. 183-260.
- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 595–622, 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/V3Im6p>>. Acesso em: 08 set. 2015.
- MUSZA, L.L. et al. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conohea*

scoparioides. **Journal of Natural Products**, Washington, v.57, n.11, p.1498-1502, 1994. Disponível em:< <http://goo.gl/EYKecs>>. Acesso em: 02 mar. 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hudson, v. 15, n. 3, p. 473-97, 1962. Disponível em: <<http://goo.gl/12FHvQ>>. Acesso em: 16 set. 2015.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de muruci-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, Mar. 2007. Disponível em:<<https://goo.gl/ZwmgY2>>. Acesso em: 03 out. 2015.

OLIVEIRA, D. **Manual ilustrado: Pataqueira**. 1. Ed. [s.l.]: NATURA COPYRIGHT, 2015. 29p.

PERVEEN, S. et al. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* establishment of Caribbean copper plant (*Euphorbia cotinifolia* L.): an important medicinal shrub. **Acta Physiologiae Plantarum**, Hudson, v. 35, n.12, p. 3391-3400, Dec. 2013. Disponível em:< <https://goo.gl/FwO2hh>>. Acesso em: 05 jun. 2015.

PLAČKOVÁ, L. et al. Cytokinin profiling of long-term *in vitro* pea (*Pisum sativum* L.) shoot cultures. **Plant Growth Regulation**, Hudson, v. 77, n. 2, p. 125–132, 28, 2015. Nov. Disponível em:<<http://goo.gl/Yw4ab6>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

SANTANA, J. R. F. et al. Morfogênese *in vitro* em segmentos nodais de *Annona glaba* L. na presença de diferentes citocininas, **Magistra**, Cruz das Almas, v. 21, n. 3, p. 139-145, jul./set. 2009. Disponível em: <<https://goo.gl/OE2f8c>>. Acesso em: 17 jul. 2015.

SMYKAL, P. et al. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 26, n. 11, p.1985-1998, Nov. 2007. Disponível em:<<http://goo.gl/vrkGJp>>. Acesso em: 09 nov. 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII**. 2. ed. Nova Odessa. Inst. Plantarum, 2008. 704p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

VICTÓRIO, C. P. et al. Standardized production of *Phyllanthus tenellus* Roxb. By plant tissue culture. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.41, n. 2, p. 272-278, Apr./June. 2010. Disponível em:<<http://goo.gl/TysMGK>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; SATO, A. Tissue culture techniques in the proliferation of shoot and roots of *Calendula officinalis*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 3, p. 539-545, Jul./Set. 2012. Disponível em:<<http://goo.gl/izdV3G>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 64-70, jan./mar. 2013. Disponível em:<<http://goo.gl/dOKr1Y>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

WERBROUCK, S. P. O. et al. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 98, n. 2, p. 291-297, 1996. Disponível em:< <http://goo.gl/Ya96G1>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

**CAPÍTULO IV - Efeito dos substratos na aclimatização e formação de mudas de
Conobea scoparioides Benth.**

RESUMO

A *Conobea scoparioides* é uma espécie medicinal de habitat alagado. Atualmente não há um adequado sistema de formação de mudas para atender a demanda. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar o substrato mais adequado à aclimatização de plântulas de pataqueira e formação de mudas viáveis para cultivo. Foram utilizados os substratos terra preta; terra preta+pó de serragem; e terra preta+pó de serragem+esterco bovino curtido. Ao final de vinte e um dias de experimentação foram coletados: percentagem de sobrevivência; comprimentos (cm) da parte aérea e sistema radicular; números de brotos e de folhas, os quais foram estatisticamente avaliados através da ANOVA e teste de média. Em todos os substratos a sobrevivência das mudas foi de 100%. A mistura de terra preta+pó de serragem+esterco bovino apresentou os maiores valores médios na maioria das variáveis, enquanto o substrato constituído somente por terra preta foi o que promoveu menor crescimento nas plantas. Os substratos testados são adequados para a aclimatização. Em destaque, o substrato terra preta+pó de serragem+esterco bovino curtido como o mais indicado dentro dos estudados para formação de mudas viáveis.

Palavras-chave: Adaptação ex vitro. Crescimento. Micropropagação. Pataqueira.

ABSTRACT

Conobea scoparioides is a medicinal species of wetland habitat. Currently, there is no proper seedling formation system to meet the demand. Therefore, the aim of this study was to identify the most suitable substrate for the acclimatization and formation of viable pataqueira seedlings for the cultivation. The applied substrates were soil, soil + sawdust, and soil + sawdust + matured bovine manure. After twenty-one days of experimentation, the collected data were: the survival rate, the length of aerial part and root system and the number of shoots and leaves, which were all statistically analyzed through ANOVA and test of means. In all substrates the survival was 100%. The soil + sawdust + matured bovine manure mixture presented the highest mean values for most of the variables, while the substrate consisting of only soil promoted the lowest growth in the plants. The tested substrates are suitable for acclimatization. Highlighted here the soil+sawdust+matured bovine manure mixture as the most appropriate within the studied substrates for the formation of viable seedlings.

Keywords: Ex vitro adaptation. Growth. Micropropagation. Pataqueira.

1 INTRODUÇÃO

A *Conobea scoparioides*, pertencente à família Plantaginaceae (SOUZA; LORENZI, 2008), popularmente conhecida como pataqueira, habita terras úmidas do Brasil, Argentina, Colômbia e México (GONZÁLEZ MINA; HURTADO MONTANO, 2011), sendo a Amazônia seu local de origem. Destaca-se por conter princípios ativos de alto valor para a indústria farmacêutica. A substância triterpênica cucurbitacina E está presente na espécie (MUSZA et al., 1994) e, de acordo com Duncan et al. (1996), pode degenerar tumores da próstata. A planta é de ciclo anual, se propaga por sementes e por estacas caulinares (GONZÁLEZ MINA; HURTADO MONTANO, 2011). Atualmente, nenhum destes sistemas de propagação está sendo utilizado a nível comercial. Segundo Lameira e Pinto (2008), é de grande importância a existência de um método de cultivo programável que viabilize a extração de produtos naturais medicamentosos. Em relação às plantas medicinais, transformar espécies selvagens em cultivadas por meio de técnicas adequadas permite expressar todo seu potencial produtivo (LAMEIRA; OLIVEIRA, 2012).

Costa, M. et al. (2014) sinalizaram a propagação em larga escala da pataqueira através do cultivo in vitro, obtendo-se 20 brotos/explante. Porém, as plantas originadas da cultura de tecidos, são normalmente frágeis por possuir um metabolismo baseado em condições ambientais controladas, sem submissão a variação de qualquer ordem, além de terem a sua disposição fonte de energia e nutrientes adequados, tornando qualquer organismo vegetal heterotrófico (GEORGE, 1993). Além disso, contém pouca cera na cutícula foliar e aparato fotossintético não funcional, acarretando baixa taxa de sobrevivência na aclimatização (CHANDRA et al., 2010). Existem relatos do desconforto destas plantas através da sobrevivência abaixo de 100% durante o transplante. Lédo et al. (2007) obtiveram apenas 23% de sobrevivência das plântulas de coqueiro-anão. Neste sentido, há necessidade de estudos que viabilizem a resistência das pataqueiras durante a aclimatização.

Novas condições ambientais impostas durante a aclimatização podem promover ao vegetal incômodo com grau de gravidade variado, podendo chegar ao nível máximo e levá-lo à morte. Barboza et al. (2006) citam necessários empenhos fisiológicos e morfológico a fim de evitar tal situação. Para tanto, segundo Pádua et al. (2014), as plantas precisam absorver rapidamente água e sais minerais, contrapondo a alta taxa de transpiração foliar, daí a importância da presença de raízes nas plantas no início desta etapa.

Segundo Grave et al. (2007), as espécies reagem diferentemente a um novo substrato devido as suas próprias peculiaridades genéticas e fisiológicas. Embora lenta, a efetiva capacidade de fotossíntese destas plantas é um indicativo de adaptação (VILLALOBO et al., 2012). Portanto, a porosidade de um substrato pode definir a viabilidade da aclimatização de uma espécie (STEFANELLO et al., 2009), haja vista que a mistura de partículas com diferentes tamanhos tende a aumentar a porosidade, melhorando o crescimento de mudas. Para isto, é primordial que haja um balanceamento entre a capacidade de reter água e a difusão gasosa. Existem suportes que são péssimos na retenção hídrica, é o caso da areia (SODRÉ; CORA; SOUZA JÚNIOR, 2007). Quando isto ocorre, altera-se inadequadamente o alongamento, a divisão e a diferenciação celular, e os parâmetros que demonstram o crescimento e desenvolvimento são negativamente afetados (PEREIRA et al., 2002). Entretanto, outros substratos com maior capacidade de campo (CC) e nutricional – como a terra, pó de serragem e húmus – têm mostrado maior eficiência no cultivo de planta herbácea durante o processo de formação de muda (TERRA et al., 2014). Conforme as orientações de Muniz, Barbosa e Orbes (2010) a porosidade de 85% é a ideal em um substrato. Estes pesquisadores constataram valores de porosidade e capacidade de retenção de água (CRA) próxima ao ideal para os substratos Esterco bovino e Esterco bovino+Pó de serragem (1:1).

A *Conobea scoparioides* é uma espécie de ambiente alagado e a adaptação ex vitro é um momento de desidratação. Deste modo, o objetivo desta pesquisa foi identificar o substrato mais adequado à aclimatização de plântulas de pataqueira e formação de mudas viáveis para cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação da espécie vegetal estudada

No presente estudo, utilizaram-se plantas inteiras de *Conobea scoparioides* Benth.-Plantaginaceae, coletadas e identificadas pelo parataxonomista Ferdinando Cardoso do Nascimento, na área experimental da EMBRAPA Amazônia Oriental em 28/07/2005, identificada sob o nº 08, voucher: MG 177411, depositadas no herbário do Museu Emílio Goeldi (MPEG), Belém-PA.

2.2 Enraizamento in vitro

Foram utilizadas plântulas de pataqueiras previamente estabelecidas *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental em Belém-PA. Em bancada de fluxo laminar (Pressão de 0,22 mm H₂O) as plântulas foram excisadas, retirados os segmentos apicais de $\pm 1,5$ cm de comprimento com um par de folhas e inoculados em posição vertical em frascos de vidro (200 ml) contendo 30 ml de meio MS 1/1 dos sais, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB (Figura 1a). Posteriormente, incubou-se em sala de crescimento.

2.2.1 Condições dos meios nutritivos e da sala de crescimento

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8. Posteriormente foram autoclavados a 120°C, 1 atm, por 20 minutos. A sala de crescimento manteve a temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de escuro, irradiância de fótons de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilização de lâmpadas Sylvania F40 W T10.

2.3 Experimento: aclimatização ex vitro

2.3.1 Material vegetal

Trezentos brotos enraizados in vitro foram utilizados nos tratamentos para aclimatização. Este material vegetal foi retirado dos frascos e em seguida lavado cuidadosamente em água corrente e uniformizado em altura de 3,0 cm; os sistemas radiculares foram seccionados para 1,0 cm de comprimento. Todos os brotos continham quatro folhas, cuja área foliar foi reduzida a metade (Figura 1b).

2.3.2 Condições experimentais

O estudo ocorreu no Horto de Plantas Medicinais da Embrapa Amazônia Oriental em Belém-Pa (latitude 01° 26' S; longitude 48° 26' W e altitude 23m), por vinte e um dias durante maio de 2014. Utilizaram-se três bandejas de polipropileno com tubetes de 14,5 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, contendo três substratos: Terra preta, Terra preta + Pó de serragem (1:1) e Terra preta + Pó de serragem + Esterco bovino curtido (1:1:1). Após o transplântio os substratos foram hidratados próximo à capacidade de campo (CC). Em seguida as bandejas foram envolvidas com plástico transparente. A fim de manter uniformidade granulométrica, todos os componentes das misturas de substratos foram previamente peneirados em malha de 5 mm. A aclimatização se deu em telado com sombrite a 70%, com temperatura média de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar 90% e fotoperíodo natural. A terra preta foi proveniente dos primeiros 20 cm de um solo tipo Latossolo Amarelo Distrófico típico, textura média (EMBRAPA, 2006).

2.3.3 Material em aclimatização ex vitro

Após o preparo do material vegetal, as plântulas de pataqueira foram transplantadas para os tubetes com os diferentes substratos, em seguida foram envolvidas com plástico transparente, manteve-se uma plântula/tubete (Figura 1c). Após cinco dias o plástico foi retirado e as mudas continuaram em aclimatização por mais dezesseis dias, com irrigação

por duas vezes ao dia, totalizando vinte e um dias de aclimatização (Figura 1d). Após, o experimento foi desmontado, e as plantas foram avaliadas quanto ao crescimento: percentagem de sobrevivência; altura da planta (medido a partir da superfície do substrato à marca de inserção do último par de folhas); comprimento do sistema radicular (cm) tomando por base a maior raiz (Figuras 1e, 1f); as percentagens de incremento de crescimento (IC) da altura e do comprimento da raiz, utilizando-se a fórmula $IC = (MF - MI) / MI * 100$, sendo MF-MI a diferença entre os valores mensurados das médias final e inicial. Como variáveis de desenvolvimento se usou os números de brotos e de folhas. As plantas sobreviventes foram consideradas como aclimatizadas.

Figura 1- Seqüência da manipulação do material vegetal de pataqueira no experimento de aclimatização de pataqueira. (a) Brotos enraizados *in vitro*, (b) Brotos enraizados com a área foliar reduzida, (c) Plântulas em aclimatização *ex vitro*, (d) Muda após 21 dias de aclimatização e (f) Mudanças em avaliação.



Fonte: Elaborada pela autora

2.3.4 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), composto por três tratamentos: terra preta, terra preta + pó de serragem (1:1 v/v) e terra preta + pó de serragem + esterco bovino curtido (1:1:1 v/v/v). Foram usadas dez repetições, cada uma com dez plantas, totalizando cem plantas por tratamento e trezentas no experimento. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Aclimatização ex vitro

Obteve-se 100% de sobrevivência das plantas em todos os substratos no período de aclimação de vinte e um dias (dados não apresentados). Entretanto, na aclimatização de plântulas de coqueiro-anão, Léo et al. (2007) obtiveram baixas percentagens de sobrevivência: 58,3% no substrato areia+ pó de casca de coco (1:1) e 23% em areia. De outro modo, Girardi e Pescador (2010), obtiveram 80% de sobrevivência ao aclimatizarem plântulas de gengibre no substrato constituído por areia+casca de arroz carbonizado+plantmax[®] na proporção de (1:1:1). Sob este aspecto, Pimenta (2008) explana sobre a influência positiva de uma adequada estrutura de solo no desenvolvimento das plantas, levando-se em consideração a promoção do equilíbrio entre as características de retenção de água e aeração.

Podem-se observar nos resultados da Tabela 1 diferenças significativas entre os tratamentos nas demais variáveis. Os resultados mostraram que a combinação de substratos terra preta+pó de serragem+esterco bovino curtido foi mais eficiente, promovendo maiores valores em todas as características morfológicas avaliadas, com exceção para o número de folhas, apresentando assim maiores médias atingidas para a altura das plantas de 7,7 cm, comprimento radicular de 15 cm e 2,9 brotos/planta. Em contrapartida, o substrato constituído somente por terra preta demonstrou os menores valores médios: altura da planta de 5,2 cm, comprimento radicular 6,3 cm e 0,8 broto/planta de pataqueira, porém com alta média para número de folhas. O substrato formado por terra preta+pó de serragem indica através das médias das variáveis citadas ser o segundo mais eficiente, portanto uma alternativa na escolha do substrato para formação de mudas viáveis. Além disto, apresentou uma das maiores médias do número de folhas (9,7). Conforme Arenas-de-Souza; Silva e Karsburg (2014) a utilização de substratos com mais de um constituinte modifica positivamente as características físicas e químicas do solo, o que fez melhorar o desenvolvimento vegetal de orquídeas aclimatadas em musgo do Chile + carvão + bolinhas de isopor (1:1:1). Percebe-se a importância da nutrição, no que explicam Grave et al. (2007) sobre a disponibilidade de nutrientes nos substratos favorecer acentuadamente o desempenho do organismo vegetal, uma vez que, participam na composição de compostos orgânicos e moléculas vitais, como a clorofila.

Neste sentido, foi verificado que em todos os tratamentos, as novas folhas das plantas de pataqueira apresentaram ausência de clorose, deformidades, necrose, senescência, muita e/ou abscisão foliar, além de apresentarem excelentes condições fitossanitárias. Somado a isto, foi generalizada a duplicação no número de folhas. Pimenta (2008) relata que a sobrevivência também está relacionada à condição foliar e a transpiração inerente a espécie, a qual induzirá maior ou menor absorção de água e nutrientes.

Assim, deduz-se que as características físicas dos substratos em estudo diferenciaram-se bastante quanto à porosidade, permitindo maior ou menor capacidade de retenção hídrica e condutividade hidráulica e que a espécie possui habilidade à adaptação ao estresse ambiental imposto pelo experimento.

De acordo com Taiz e Zeiger (2009), o uso de substâncias orgânicas no substrato, como o húmus, tende a formar “torrões” que auxiliam na aeração, aumentam a capacidade de campo e afetam consideravelmente o desenvolvimento das plantas. Este efeito benéfico da presença de matéria orgânica foi constatado por Freire et al. (2011) durante a aclimatização de plântulas de mangaba quando cultivadas no composto de areia lavada + pó de casca de coco seco (1:1), apresentando melhor taxa de crescimento.

Tabela 1- Efeito dos substratos na altura, comprimento radicular, número de brotos e de folhas em plântulas de pataqueira obtidas *in vitro* e submetidas à aclimação *ex vitro* por vinte e um dias.

Tratamentos	Altura da planta (cm)	Comprimento radicular (cm)	Número de brotos	Número de folhas
terra preta (tp)	5,27 b	6,38 c	0,89 c	9,1 ab
tp+pó de serragem (ps)	6,08 ab	14,23 b	1,6 b	9,7 a
tp+ps+esterco bovino curtido (ebc)	7,76 a	15,01 a	2,94 a	8,2 b
CV%	29,90	4,72	30,29	15,2

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em todos os substratos (Tabela 2) as plantas tiveram maiores incrementos de comprimento (%) locados à raiz do que à parte aérea. Pode-se inferir que na condição experimental a raiz manteve-se como um forte dreno, independente do substrato. É possível

que a pataqueira, tratando-se de uma espécie naturalmente adaptada ao ambiente alagado, quando cultivada em qualquer um dos três substratos aqui estudados fique passível a graus diferentes de estresse hídrico. Isto explica o menor crescimento em comprimento do caule em comparação ao da raiz da pataqueira. Marschner (1999) sintetiza que ocorre uma paralisação no crescimento da parte aérea quando o vegetal está sendo cultivado em solo com déficit hídrico e pouca aeração. Explicam Li e Li (2007) que o conteúdo de citocininas produzidas na raiz e seu transporte à parte aérea diminuem em condições de secura. Já as auxinas em condições moderadas de secura não mudam sua concentração na parte aérea e transporte à raiz (XU et al., 2013). Deste modo, Han et al. (2015) afirmam que a morfologia da raiz estará na dependência do balanço entre citocinina/auxina promovido pelos gradientes hídricos dos solos, e o aumento no comprimento do órgão em condições de estresse hídrico seria um indicativo de plasticidade fenotípica. Kano et al. (2011) completam dizendo que estas respostas podem se diferenciar de acordo com o vegetal estudado, duração e nível da umidade no solo. Exemplos foram observados nas espécies feijoeiro (GOMES et al., 2000) e pupunheira (PRIVATELLI, 2007), que quando em estresse hídrico aumentaram o crescimento da raiz e diminuíram o crescimento da parte aérea.

TABELA 2- Incrementos (%) na altura e no comprimento radicular de plantas de pataqueira aclimatadas por vinte e um dias em distintos substratos.

Substratos	INCREMENTO (%)	
	Altura	Comprimento da raiz
terra preta	75,76%	538%
tp+pó de serragem	102,67%	1323%
tp+ps+esterco bovino	158,67%	1401%

*tp(terra preta), ps (pó de serragem).

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante o transplântio pode ocorrer um estresse hídrico nas plantas, mas o novo substrato, uma vez bem hidratado, possibilita o restabelecimento e o crescimento das raízes e pêlos absorventes, aumentando assim a área de contato raiz-solo, o que promoverá maior hidratação e desenvolvimento do órgão (TAIZ; ZEIGER, 2009). Este efeito foi constatado com maior intensidade nas plantas de pataqueira na mistura com os três tipos de partículas, no qual a retenção hídrica pode ter sido maior. Contudo, plantas de pataqueira normalmente têm

dificuldades de crescimento em solo pouco úmido devido a desenvolverem poucos pelos absorventes e serem ricas em aerênquimas, o que lhe confere a capacidade de difusão de oxigênio e melhor crescimento em solos com maior retenção de água (GONZÁLEZ MINA; MONTANO, 2011).

A pataqueira é uma espécie de rápido crescimento e, portanto, requerente de adequada nutrição. Para tanto, a quantidade de nutrientes presentes nos três substratos estudados foi o suficiente para manter 100% das plantas vivas e estas terem duplicado a altura inicial e o número de folhas. Estes resultados corroboram com os de Costa, R. et al. (2014), quando plântulas de pataqueira duplicaram a altura sob o cultivo em condição hidropônica.

Nesta pesquisa, o tempo para a completa formação de plantas de pataqueira e posterior plantio no campo foi em torno de sessenta dias. González Mina e Montano (2011) este tempo usaram para iniciar o transplante de *C. scoparioides* seminais com 51% de germinação. Por outro lado, em plantas provenientes de estacas de caule o índice de pagamento é baixo, em torno de 37%. Nesse sentido, a obtenção de mudas de pataqueira através da micropropagação pode ser uma alternativa tecnológica de produção para a espécie. Segundo Aoyama et al. (2012), o tempo de formação de mudas está intimamente relacionado ao custo-benefício para a produção comercial.

4 CONCLUSÃO

Os substratos testados são adequados para a aclimatização. Em destaque, o substrato terra preta+pó de serragem+esterco de curral curtido como o mais indicado dentro dos estudados para formação de mudas viáveis.

REFERÊNCIAS

- AOYAMA, E. M. et al. Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 2, p. 321-331, 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/NnRtos>>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- ARENAS-DE-SOUZA, M.D; SILVA, M. S. A; KARSBURG, I. V. Aclimação *ex vitro* de plântulas de *Oncidium baueri* Lindl. em diferentes substratos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 102-108, 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/BbEBqW>>. Acesso em: 11 abr. 2015.
- BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 2, p. 185-194, jan. 2006. Disponível em: <<https://goo.gl/5y0u5m>>. Acesso em: 10 ago. 2015.
- CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, p. 1199–1205, Apr. 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/IR9uLv>>. Acesso em: 03 jan. 2016.
- COSTA, M. P. et al. Produção de mudas *in vitro* para a indústria de perfumaria. In: SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, II 2014, Belém. **Artigo expandido**. CD-ROM. Disponível em: <<http://goo.gl/HLSaMg>>. Acesso em: 13 jan. 2016.
- COSTA, R. G. et al. Essential oil of pataqueira (*Conochea Scoparioides* Benth.): from natural occurrence and produced by hydroponics. **Advances in Plants & Agriculture Research**, Oklahoma, v. 1, n. 3, p. 1-5, 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/A5POCW>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- DUNCAN, K. L. et al. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate Carcinoma Cells. **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v. 52, n. 10, p. 1553-1560, Nov. 1996. Disponível em: <<http://goo.gl/IvfF1e>>. Acesso em: 22 jul. 2015.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro : Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2006. 306 p.: il.
- FREIRE, K. C. S. et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de mangaba oriundas da cultura de embriões (*Hancornia speciosa* Gomes). **Scientia Plena**, Sergipe, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2011. Disponível em: <<https://goo.gl/RDnN7H>>. Acesso em: 05 jul. 2015.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2.ed. England: Exegetics, 1993. 574p.
- GIRARDI, C. G.; PESCADOR, R. Aclimação 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. Disponível em: <<http://goo.gl/9BhGyx>>. Acesso em: 05 dez. 2015.
- GOMES, A. A. et al. C. Acumulação de fitomassa, características fisiológicas e rendimento de grãos em cultivares de feijoeiro irrigado e sob sequeiro. **Pesquisa Agropecuária**

Brasileira, Brasília, DF, v. 35, n. 10, p. 1927-1937, out. 2000. Disponível em: <<http://goo.gl/K3V6Ch>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

GONZÁLEZ MINA, R. T.; HURTADO MONTAÑO, A. M. Primeros ensayos para El cultivo y caracterización Del aceite esencial de *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. Para El Pacífico colombiano. **Entramado**, Cali, v. 7, n. 2, p. 174-185, July./Dec. 2011. Disponível em:<<http://goo.gl/i13kXn>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

GRAVE, F. et al. Crescimento de plantas jovens de açoita-cavalo em quarto diferentes substrates. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 4, p. 289-298, out./dez. 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/JNC0BJ>>. Acesso em: 11 set. 2015.

HAN, H. et al. Water-deficit treatment followed by re-watering stimulates seminal root growth associated with hormone balance and photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, Hudson, v. 77, p. 201-210, 2015. Disponível em: <<http://goo.gl/8Z0JOs>>. Acesso em: 27 mar. 2015.

KANO, M. et al. Root plasticity as the key root trait for adaptation to various intensities of drought stress in rice. **Plant and Soil**, Amsterdã, v.342, n.1-2, p.117-128, May. 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/Sn2oDR>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

LAMEIRA, O. A.; PEREIRA PINTO, J. E. B. Plantas Medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. **Embrapa Amazônia Oriental**, Belém, PA: CPATU, p. 27-48, 2008.

LAMEIRA, O.A; OLIVEIRA, E.C.P. Domestication and breeding of amazonian medicinal species. BORÉM, A. et al. (Ed.). **Domestication and breeding**: Viçosa, MG: FUV, 2012, p.437-454.

LÉDO, A. S. et al. Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimatação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 2. p. 147-154, fev. 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/TPVG3G>>. Acesso em: 11 out. 2015.

LI, T; LI, S. Leaf responses of micropropagated apple plants to water stress: changes in endogenous hormones and their influence on carbohydrate metabolism. **Agricultural Sciences in China**, Holanda, v. 6, n. 1, p. 58-67, Jan. 2007. Disponível em:<<http://goo.gl/982fc8>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

MARSCHNER, H. Yield and the source-sink relationships. In: **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd Edition, Academic Press, London, 1999. p. 129-183.

MUNIZ, M; BARBOSA, J.G; ORBES, M. Y. Efeito de diferentes substratos no enraizamento de estacas apicais de tango. In: Encontro Nacional de Substratos para Plantas, 7, 2010, Goiânia. **Artigos**. Goiânia: VII ENSub, 2010. p. 1-14. Disponível em: <<https://goo.gl/Xi2OdA>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

MUSZA, L.L. et al. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conobea scoparioides*. **Journal of Natural Products**, Washington, v.57, n.11, p.1498-1502, 1994. Disponível em:<<http://goo.gl/EYKecs>>. Acesso em: 02 mar. 2015.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hudson, v. 15, n. 3, p. 473-97, 1962. Disponível em: <<http://goo.gl/12FHvQ>>. Acesso em: 16 set. 2015.

PÁDUA, M. S. S. et al. In vitro development and acclimatization of dendezeiro (*Elaeis guineensis*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 6, p. 1095-1102, 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/qmLNz2>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

PEREIRA, A. R. et al. **Agrometeorologia: fundamentos e aplicações**. Guaíba: Agropecuária, 2002. p. 152-154.

PIMENTA, J. A. Relações hídricas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 1, p.1-32.

PREVITALI, Rafael Von Zuben. **Crescimento de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) em substrato compactado**. 2007. 101p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Produção Agrícola) – Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

SODRÉ, G.A; CORA, J. E; SOUZA JÚNIOR, J. O. Caracterização de substratos à base de serragem e recipientes para crescimento de mudas de cacaueteiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 339-344, ago. 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/L3bn9H>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII**. 2. ed. Nova Odessa. Inst. Plantarum, 2008. 704p.

SOUZA, A.V; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/swzgbS>>. Acesso em: 11 abr. 2015.

STEFANELLO, S. et al. Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. Propagadas *in vitro*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 2, n. 3, p. 467-476, set./dez. 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/LOzrRV>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TERRA, M. A. et al. Cinza vegetal na germinação e no desenvolvimento da alface. **Revista Agroambiental**, Pouso Alegre, v. 6, n. 1, p. 11-17, abr. 2014. Disponível em: <<https://goo.gl/zkuAbl>>. Acesso em: 09 set. 2015.

VILLALOBO, A. et al. Morpho-physiological changes in pineapple plantlets (*Ananas comosus* (L.) Merr.) during acclimatization. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 6, p. 624-630, nov./dez. 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/d1MrWM>>. Acesso em: 08 set. 2015.

XU, W. et al. Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. **New Phytologist**, London, v. 197, p. 139-150, Jan. 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/lhhSil>>. Acesso em: 09 set. 2015.