



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE RONDONIA**  
**Núcleo de Ciências e Tecnologia**  
**Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio**  
**Ambiente**

**CULTIVO *IN VITRO* DE SEMENTES IMATURAS DE *Bertholletia***  
***excelsa* H.B.K.**

**SANDRA MIRLÊNÝ DA SILVA CARVALHO**

Porto Velho (RO)  
2012

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA**  
**Núcleo de Ciências e Tecnologia**

**CULTIVO *IN VITRO* DE SEMENTES IMATURAS DE *Bertholletia*  
*excelsa* H.B.K.**

**SANDRA MIRLÊNÝ DA SILVA CARVALHO**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)  
2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

C331c Carvalho, Sandra Mirlêny da Silva.

Cultivo in vitro de sementes imaturas de *Bertholletia excelsa* H.B.K. / Sandra Mirlêny da Silva Carvalho. -- 2012.  
54f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos.  
Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)  
– Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade,  
Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho.

Banca: Dra. Maria das Graças Rodrigues Ferreira, Dr. Alexandre  
Martins Abdão dos Passos, Dra. Carolina Dória.

1. Cultura de Tecidos. 2. Protocolo - indução de calos. 3. Castanha-  
do-brasil. 4. *Bertholletia excelsa*. 5. Desinfestação. 6. Floresta Amazônica. I.  
Título.

CDD (21.ed.) 571.538

Ficha catalográfica elaborada por:  
Daniela Maciel  
CRB 638/11

**SANDRA MIRLENY DA SILVA CARVALHO**

**CULTIVO *IN VITRO* DE SEMENTES IMATURAS DE *Bertholletia excelsa* H.B.K.**

Comissão Examinadora

---

Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos – Orientador

---

Dr. Maria das Graças Rodrigues Ferreira – Titular

---

Dr. Alexandre Martins Abdão dos Passos – Titular

---

Dr. Carolina Dória – Suplente

Porto Velho, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012

Resultado: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho à minha família, que me apoiou  
incondicionalmente em todos os momentos dessa jornada.  
Amo todos vocês.*

## **AGRADEÇO**

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e entenderam as horas de ausência. Meus filhos amados, Anna Clara e Ruy Nathan, isso é por vocês. Ao meu marido Ronildo, obrigada por toda compreensão, apoio e amor. Sem você, teria sido muito difícil. Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim. Aos meus irmãos queridos, por todo o apoio. A minha irmã linda, pelo incentivo e torcida;

À Universidade Federal de Rondônia e Embrapa Rondônia, pela oportunidade do exercício científico e apoio pela realização deste trabalho;

Ao professor Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos, pela orientação e estímulo ao meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal. Obrigada por acreditar sempre e me ensinar o caminho certo;

À Dra. Maria das Graças Rodrigues Ferreira, pelo profissionalismo e apoio;

Ao técnico de laboratório Tiego Costa, pelo apoio técnico;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Rondônia, Josilene Félix, Sâmela Chagas, Andrina Guimarães, Eloísa Paz, Laiza Limana.

Aos colegas do Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, pelo companheirismo. Aos professores do PGDRA por todo o conhecimento transmitido.

À CAPES, pelo fomento.

*“...Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento;  
porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda  
do que o ouro mais fino...”*

*Provérbios 3:13-14*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição química da semente da castanha-do-brasil.	18
<b>Tabela 2:</b> Composição mineral (A) e conteúdo vitamínico (B) da semente da castanha-do-brasil (USDA, 1975).	19
<b>Tabela 3:</b> Concentrações de hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e solução de cefotaxima utilizados para desinfestação de sementes imaturas de <i>B. excelsa</i> . Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2012.	31
<b>Tabela 4:</b> Análise de variância dos tratamentos utilizados para desinfestação de sementes imaturas de <i>B. excelsa</i> .	32
<b>Tabela 5:</b> Efeito dos tratamentos de desinfestação em sementes imaturas de <i>B. excelsa</i> em relação ao tempo de imersão e à concentração dos desinfestantes testados. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2012.	36
<b>Tabela 6:</b> Análise de variância do efeito de diferentes combinações de 2,4-D e TDZ na indução de calos em sementes imaturas de <i>B. excelsa</i> . Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2012.	38



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Bertholletia excelsa*. (A) Aspecto geral. (B) Ouriços imaturos. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2012. 17
- Figura 2:** *B. excelsa*. Contaminação de semente imatura segmentada por bactéria endógena. 33
- Figura 3:** *B. excelsa* (A) Semente imatura no início da indução de calos, 15 dias após inoculação. (B) Semente imatura 21 dias após inoculação, já com toda a superfície coberta por calos 36
- Figura 4:** Percentagem de calogênese em sementes imaturas de *B. excelsa* em relação a diferentes concentrações de 2,4-D em combinação com 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ. 36

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>13</b>
1.1 A AMAZÔNIA	13
1.1.1 Modelos de desenvolvimento para a Amazônia	14
1.2 EXTRATIVISMO	15
1.2.1 O extrativismo da castanha – O início nos castanhais do Pará	16
1.3 A ESPÉCIE <i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K	17
1.4 BIOTECNOLOGIA VEGETAL	22
1.4.1 Desinfestação	24
1.4.2 Calogênese	25
1.4.3 Hormônios e Reguladores de Crescimento	26
1.5 DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE	28
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
2.1 EXPERIMENTO I – DESINFESTAÇÃO	30
2.2 EXPERIMENTO II – CALOGÊNESE	31
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
3.1 EXPERIMENTO I - DESINFESTAÇÃO	32
3.2 EXPERIMENTO II - CALOGÊNESE	35
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>40</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>41</b>

## RESUMO

*Bertholletia excelsa* H.B.K., conhecida como castanheira-do-brasil, é uma espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae. É uma espécie endêmica da Floresta Amazônica e consta na lista oficial do IBAMA de espécies ameaçadas da flora amazônica considerada como vulnerável. As sementes da castanheira levam de 60 a 275 dias para germinar naturalmente e a produção inicia-se entre 5 e 12 anos. Técnicas de cultura de tecidos vegetais são ferramentas promissoras para programas de melhoramento dessa cultura, principalmente por permitir a clonagem de plantas selecionadas. Objetivou-se com esse trabalho determinar protocolos eficientes para desinfestação e indução de calos em explantes de sementes imaturas de *B. excelsa*. Foram realizados dois experimentos, desinfestação e indução de calogênese. Para a desinfestação foram utilizados explantes provenientes de castanheiras cultivadas, os quais passaram por testes de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5%, hipoclorito de cálcio a 5% e de cefotaxima a 50 mg.L<sup>-1</sup>, todos por 15 e 30 minutos, em combinação fatorial. Após este procedimento, foi retirado o tegumento das sementes e estas foram inoculadas em meio MS (Murashige & Skoog) com metade da concentração dos nutrientes. Após sete dias, foi avaliada a contaminação. Para indução de calogênese, fragmentos de sementes imaturas foram cultivados em meio WPM (Wood Plant Medium) acrescido de 2,4-D (0, 1, 2, 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup>) e TDZ (0, 1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup>) em combinação fatorial. Após 21 dias, foi avaliada a indução de calos. Os cultivos foram mantidos no escuro, em sala de crescimento, a 24±2°C. Nas condições em que foi realizado este trabalho, a menor contaminação (5%) foi obtida com imersão em hipoclorito de cálcio 5% por 30 minutos. A condição que resulta em maior porcentagem de calogênese foi encontrada na combinação de 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D com 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ. Estudos posteriores serão realizados visando à regeneração de plantas a partir dos calos obtidos.

Palavras-chave: indução de calos, reguladores de crescimento, desinfestação, Floresta Amazônica.

## ABSTRACT

### *In vitro* culture of *Bertholletia excelsa* H.B.K. immature seeds

*Bertholletia excelsa* H.B.K., known as castanheira-do-brasil, is a tree species belonging to the Lecythidaceae botanic family. It is an endemic species from the Amazon Rainforest and is in the IBAMA list of endangered species from the Amazon flora considered as vulnerable. Seeds take 60 to 275 days to naturally germinate and the production starts between 5 and 12 years. Plant tissue culture techniques are promising tools for breeding this crop mainly because allow to clone selected plants. The objective of this work is to establish efficient protocols for disinfestation and callus induction from immature seeds of *B. excelsa*. Two experiments were carried out, disinfestation and callus induction. In disinfestation tests explants from cultivated plants were immerse in 2.5% sodium hypochlorite, 5% calcium hypochlorite and 50 mg.L<sup>-1</sup> cefotaxime, for 15 and 30 minutes, in factorial combination. After that, seeds had they teguments removed and were inoculated in MS (Murashige & Skoog) medium containing half of the concentration of nutrients. Seven days later the contamination was evaluated. For callus induction fragments of immature seeds were cultivated in WPM (Wood Plant Medium) supplemented with 2,4-D (0, 1, 2, 4 and 8 mg.L<sup>-1</sup>) and TDZ (0, 1.6 and 3.2 mg.L<sup>-1</sup>) in factorial combination. Twenty-one days after the callus induction was evaluated. Cultures were kept in growth room in the dark at 24±2°C. At the conditions which these experiments were carried out the lower contamination level (5%) was observed with immersion in 5% calcium hypochlorite for 30 minutes. Highest percentage of callus induction was found with the combination of 2 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D with 3,2 mg.L<sup>-1</sup> TDZ. Further studies will be performed aiming to regeneration of plants from callus.

Keywords: callus induction, growth regulators, disinfestation, Amazon Rainforest.

## INTRODUÇÃO

A Amazônia Continental, localizada ao norte da América do Sul, ocupa uma área superior a 6,5 milhões de km<sup>2</sup> e abrange nove países, dentre eles, Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia. Cerca de 85% dessa região é a Amazônia brasileira que ocupa uma área de 5,2 milhões de km<sup>2</sup>, o equivalente a 61% do território nacional. Apesar de toda essa área, a população é de somente 11,8% do total da população brasileira (SOUZA, 2006).

A Amazônia brasileira possui cerca de 200 espécies de árvores, 1.400 tipos de peixes, 1.300 pássaros e 300 espécies de mamíferos por hectare, totalizando dessa forma, mais de 2 milhões de espécies. Com toda essa riqueza em fauna e flora, estima-se que 7% da população dos estados amazônicos combinem o extrativismo de produtos florestais não madeireiros a outras atividades econômicas (SOUZA, 2006). Estes produtos também são importantes para os consumidores urbanos e para processadores e comerciantes que, por sua vez, aumentam seus ingressos à medida que os mercados urbanos adotam seu consumo. Desta forma, o extrativismo de produtos florestais não-madeiráveis (PFNM) é visto como um mecanismo para a manutenção dos serviços ambientais; para conservação da biodiversidade; para o incremento da economia regional e segurança alimentar e, também, para o incremento da economia global (LORENZI, 2006).

Historicamente, a castanha substituiu a borracha no que se refere à geração de renda para a população extrativista da floresta amazônica, quando este produto perdeu mercado, no início do século passado (SOUZA, 2006). De acordo com o IBAMA (2006), cerca de quase 20.000 famílias coletam castanha-do-brasil para a complementação da receita familiar. A comercialização dessa castanha é responsável por 10% da renda proveniente do extrativismo.

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma espécie arbórea pertencente à família Lecythidaceae, de grande valor econômico e social (SERRA et al., 2000). É uma espécie endêmica da floresta amazônica, ocorrendo naturalmente em florestas de terra-firme nos Estados do Pará, Acre, Maranhão, Amazonas, Rondônia e norte do Mato Grosso. Ocorre ainda nas florestas fronteiriças com o Suriname, Peru, Bolívia, Guiana Francesa e Venezuela (FERNANDES & ALENCAR, 1993). Esta espécie consta da lista oficial de espécies ameaçadas da flora Amazônica com o status de vulnerável (IBAMA, 2006).

Além da importância para o extrativismo, a castanha-do-brasil é uma das espécies nativas de potencial interesse para os sistemas agroflorestais (SAF's), por sua madeira de lei e amêndoa. A exportação da castanha constitui uma importante fonte de divisas para o Brasil. Além disso, é um produto de grande interesse para o agricultor de baixa renda, muito nutritivo, empregado na alimentação da família, comercializada com facilidade e pode ser armazenada por muito tempo, mesmo nas condições rústicas de sua propriedade (SOARES et al., 2004).

A castanheira leva de 60 a 275 dias para germinar naturalmente. Seu crescimento anual é de 1 cm e a produção inicia-se entre os 5 e 12 anos (SHANLEY et al., 2010). Uma das maiores dificuldades para sua propagação é o processo germinativo lento e desuniforme. As sementes desta espécie apresentam comportamento recalcitrante, com diminuição da capacidade de germinação ao se reduzir o grau de umidade (MÜLLER & FREIRE, 1979). Para acelerar o processo de propagação vegetativa faz-se necessário a utilização de novas tecnologias que viabilizem projetos para plantações comerciais.

A cultura de tecidos vegetais é uma das áreas da Biotecnologia que tem contribuído para o desenvolvimento sustentável na Amazônia (BARBOSA, 2001). Além de empregar técnicas que se sobressaem às outras ao trabalhar com pequenas porções das espécies estudadas sem agressão à planta-mãe, favorece o pequeno produtor, pois as mudas provenientes de experimentos biotecnológicos são livres de pragas e doenças e ainda há a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa e a diminuição do tempo necessário para o início da produção. Uma dessas técnicas é a micropropagação, a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto. É a metodologia que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Considerando a necessidade de modelos de desenvolvimento para a região Amazônica que sejam sustentáveis do ponto de vista ambiental e viáveis do ponto de vista econômico, o objetivo deste trabalho foi determinar protocolos eficientes para desinfestação e indução de calos em sementes imaturas de *B. excelsa*.

# 1. REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 A AMAZÔNIA

A Amazônia vem sendo objeto de vários estudos, até mesmo por pesquisadores de outros países. O interesse por este tema deve-se, provavelmente, à sua grandiosidade de extensão e de diversidade de riqueza, seja de flora, fauna ou recursos minerais (SOUZA, 2006).

A Amazônia Legal cobre cerca de 60% do território brasileiro e abriga 21 milhões de habitantes, 12% da população total, dos quais 70% vivem em cidades e vilarejos. O Brasil também tem o maior manancial de água doce do mundo, e a região amazônica sozinha responde por quase um quinto das reservas mundiais. O uso sustentável dessas enormes riquezas não apenas garantiria os recursos para o futuro, como poderia ser também uma fonte de maior equidade e redução de pobreza, uma vez que os recursos naturais representam uma proporção muito maior dos bens dos pobres (cerca de 80%) do que dos ricos (MARGULIS, 2003).

Existem mais de 67 milhões de hectares desmatados na Amazônia, extensão superior a três Estados do Paraná ou mais do que a soma dos Estados da região Sul. Uma fração dessa área é mais do que suficiente para o desenvolvimento dos produtos da biodiversidade amazônica. A geração de renda e emprego proporcionada por toda essa riqueza natural poderia reduzir os desmatamentos e queimadas e promover a recuperação de áreas que não deveriam ter sido desmatadas (HOMMA, 2005).

Uma das preocupações com a perda da biodiversidade em áreas como a Amazônia é que pelo menos parte da diversidade perdida tem potencial econômico comprovado. Por exemplo, o cacau (*Theobroma cacao*) e a seringa (*Hevea brasiliense*), nacional e mundialmente importantes, são originários da Amazônia. Espécies florestais que, além da madeira, produzem óleos (pau-rosa [(*Aniba duckei* Kostermans)], andiroba [(*Carapa guianensis* Aubl.)] e copaíba [(*Copaifera landesdorffii*)], resinas [(jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke)], látex (maçaranduba [(*Manilkara huberi* Chavalier)], sorva [(*Couma utilis* (Mart.) Muell. Arg.)] e amapá [(*Parahancornia amapa*)] e castanhas (castanha-sapucaia [(*Lecythis pisonis* Cambess)], castanha-de-cotia [(*Couepia edulis* Prance)] e castanha-pêndula [(*Couepia longipendula* Pilger)] (CLAY et al., 1999).

A região amazônica representa atualmente um conjunto de conflitos de interesses, que apresenta como eixos centrais a questão ecológica e a necessidade de

garantir a sobrevivência da população local. No que concerne à questão ecológica, perpassa pela contextualização da Amazônia, como sendo de propriedade comum dos habitantes do Planeta, garantir uma utilização mais racional dos recursos naturais e atender aos interesses dos países desenvolvidos e dos exotismos de determinados movimentos ecológicos (HOMMA, 1998).

Em razão dessa conjuntura faz-se necessário pensar uma proposta de desenvolvimento agrícola para a Amazônia que contemple, ao mesmo tempo, preocupações com o meio ambiente, aumento da produtividade e o uso intensivo do fator de produção terra, como forma de reduzir as pressões sobre os recursos naturais e melhoria dos indicadores socioeconômicos regionais, aprimorando, assim, as condições de vida do homem da Região (REBELLO & HOMMA, 2005).

### **1.1.1 Modelos de desenvolvimento para a Amazônia**

Na Amazônia, historicamente, destacam-se os investimentos de infraestrutura básica de apoio à agricultura voltada à incorporação de novas áreas ao processo produtivo, sobretudo relacionados com a abertura de estradas e os programas de colonização, destinados à concessão de crédito à agricultura de fronteira, à implantação de núcleos de colonização e a mobilização de mão-de-obra para os vazios demográficos. Hoje, no entanto, é preciso reverter essa tendência, como forma de se buscar mecanismos mais racionais para a promoção do desenvolvimento sustentável do meio amazônico (REBELLO & HOMMA, 2005).

Os plantios de enriquecimento e o manejo da regeneração natural têm sido uma das práticas mais recomendadas para a recuperação de fragmentos degradados e podem, ainda, ser utilizadas em áreas muito degradadas e que não conservam nenhuma das características bióticas da formação original, como é o caso de áreas utilizadas para extração de minérios (SALOMÃO et al., 2006)

Outra alternativa que vem sendo muito utilizada são os sistemas agroflorestais. No contexto da produção agrícola, o uso de SAF - sistema de uso da terra que envolve a integração de espécies perenes lenhosas com cultivos agrícolas e/ou pecuária, visando o melhor aproveitamento do uso dos recursos naturais envolvidos é referido como uma alternativa válida para alcançar esse objetivo. Frequentemente, os SAF são vistos como opção para ajudar a frear o desmatamento, por quebrar a predominância do ciclo de



agricultura migratória e pecuária extensiva praticadas na Amazônia, sendo opção para gerar lucros significativos em áreas relativamente pequenas (SANTOS et al., 2004).

As reservas extrativistas estão sendo consideradas como uma alternativa de se evitar o desmatamento na Amazônia. Também são consideradas como uma melhor opção de renda e emprego. Além disso, atribui-se à essa atividade a proteção da biodiversidade, e o fato de poder ser uma barreira para conter a expansão da fronteira agrícola. Mas isso constitui um grande equívoco, uma vez que o ato de desmatar é um reflexo da situação econômica do extrator (HOMMA, 2008a).

A transformação da biodiversidade da Amazônia em atividade econômica para gerar renda e emprego e para reduzir os riscos da biopirataria depende de medidas concretas de identificação, domesticação, produção em bases racionais e de sua verticalização. A preservação da biodiversidade amazônica dependerá da utilização apropriada das áreas já desmatadas, da recuperação das áreas que não deveriam ter sido destruídas, de maiores investimentos em C&T e de infraestrutura social (HOMMA, 2008a).

## **1.2 EXTRATIVISMO**

O extrativismo - ou uma economia extrativa - é, no sentido mais básico, uma maneira de produzir bens na qual os recursos naturais úteis são retirados diretamente da sua área de ocorrência natural, em contraste com a agricultura, o pastoreio, o comércio, o artesanato, os serviços ou a indústria. A caça, a pesca e a coleta de produtos vegetais são os três exemplos clássicos de atividades extrativas (DRUMMOND, 1996).

O setor extrativo é um ciclo econômico constituído de três fases distintas. Na primeira fase, verifica-se um crescimento na extração, quando os recursos naturais são transformados em recursos econômicos com o crescimento da demanda. Na segunda fase, atinge-se o limite da capacidade de aumentar a oferta, em face da limitação dos estoques disponíveis e do aumento no custo da extração, uma vez que as melhores áreas tornam-se cada vez mais difíceis. Na terceira fase, inicia-se o processo de declínio na extração, decorrente do aumento na demanda, induzindo o início dos plantios domesticados, desde que a tecnologia de domesticação, iniciada nos quintais interioranos e nas instituições de pesquisa, esteja disponível e seja viável economicamente. A expansão da fronteira agrícola, a criação de novas alternativas econômicas, o aumento da densidade demográfica, o processo de degradação, o

aparecimento de produtos substitutos são também fatores indutores desse declínio (HOMMA, 2005).

Na Amazônia, a extração de recursos naturais tem sido o ponto de apoio na atividade de comércio exterior desde os primórdios de sua ocupação. Assim aconteceu com o cacau (*Theobroma cacao* L.) que, na economia colonial, respondeu por até 97% do valor das exportações (1736). Foi assim também com a seringueira (*Hevea brasiliense*) (1887-1917), pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans) (1955) e a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), em 1956, com 71% de participação nas exportações da região Norte. Esses produtos seguiram a fase de expansão, estagnação e declínio, decorrentes do esgotamento, domesticação, perda do poder de monopólio e aparecimento de substitutos (HOMMA, 2008a).

### **1.2.1 O extrativismo da castanha – O início nos castanhais do Pará**

No começo do século XX, o trabalho de coleta da castanha-do-brasil conheceu uma fase livre, onde os castanhais não tinham donos particulares e o trabalho se dava de forma expedicionária (HOMMA, 2000). A partir da década de 20 essas áreas passaram a ser monopolizadas de diversas formas, desde casos de compra direta até arrendamento e aforamento dos castanhais. Em 1954, foram introduzidas importantes modificações no arrendamento de terras devolutas do Estado para fins de extração da castanha. Inicialmente se tinha uma licença para exploração por uma safra; depois um contrato de cinco anos e após isso, o contrato de renovação constituía uma forma de aforamento perpétuo (HOMMA et al., 1996).

Dessa forma, o dono do castanhal passou a ser não só o organizador da produção, mas também passou a ter o domínio de fato da terra (COELHO et al., 2006). Os donos dos castanhais mantinham o controle sobre o recurso extrativo, reproduzindo o mesmo processo de apropriação do excedente verificado na extração da borracha. Esse controle era para assegurar a apropriação do excedente econômico (HOMMA et al., 1996). Com o golpe militar de 1964, a passagem do município de Marabá para área de Segurança Nacional e a nomeação de prefeitos pelos governos militares causaram sérias dificuldades à preservação dos poderes oligárquicos. Começou então uma longa história de disputa pelo poder local, que levou à perda da hegemonia exercida pela oligarquia dos castanhais (COELHO et al., 2006).

Mas a partir do final da década de 60, baseado no princípio que o gado renderia mais do que a mata em pé, o governo começou a apoiar à agropecuária. Para promover o desenvolvimento da Região Norte, foram construídas rodovias (Belém-Brasília, Transamazônica, entre outras) além da Usina Hidroelétrica de Tucuruí (1976). Nessa época muitos posseiros e fazendeiros começaram a se instalar na região, mesmo em áreas remotas. Assim, a floresta começou a ser substituída pelo plantio de lavouras e pastos, iniciando uma onda de desmatamento (HOMMA et al., 1996).

Depois do ciclo da pecuária começou uma nova fase de valorização dos recursos naturais da região – a descoberta das jazidas de ferro, que ocasionou a construção e implantação do Programa Grande Carajás; as minas de ouro, acarretando um deslocamento migratório sem precedentes na história para a região e a madeira, onde primeiramente foi explorado o mogno e posteriormente a castanheira. Como resultado até 1997, cerca de 70% das áreas de castanhais já haviam sido desmatadas no sudeste paraense (SHANLEY et al., 2010).

### 1.3 A ESPÉCIE *Bertholletia excelsa* H.B.K.

As espécies da família Lecythidaceae são todas arbóreas, apresentam folhas alternas e inteiras, com estípulas rudimentares, bainhas coriáceas oblongas, medindo 17 a 36 cm de comprimento por 6 a 15 cm de largura (Figura 1A). Flores isoladas ou inflorescências paniculadas, no caso da castanha, suas flores são isoladas, não apresentando inflorescências (JOLY, 1993).



**Figura 1:** *Bertholletia excelsa*. (A) Aspecto geral. (B) Ouriços imaturos. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2012. Foto: S. M. S. Carvalho.

Os frutos apresentam-se em forma de cápsulas (ouriços) grandes e arredondadas (10 a 12 cm), bastante pesadas (0,5 a 2,5 kg), com aspecto de madeira, contendo de 10 a 25 sementes em seu interior (Figura 1B). As sementes possuem corte transversal triangular e medem 3,5 a 5 cm de comprimento por 2 cm de largura e pesam 4 a 10g cada uma. A parte comestível do fruto da castanha-do-brasil é, de fato, sua semente conhecida como “castanha” na linguagem popular (CLEMENT, 1999).

Árvore de grande porte, podendo atingir 50 m de altura e diâmetro de 2m, apresenta caule retilíneo, cilíndrico sem sapopemas, com galhos ausentes até a copa, casca marrom-escura com fendas longitudinais (LOCATELLI et al., 2005). É a espécie que apresenta o tronco mais grosso entre todas as espécies da floresta amazônica (SALOMÃO et al., 2006).

As florestas com a presença de castanha-do-brasil cobrem uma área de aproximadamente 325 milhões de hectares na Amazônia e abrange a Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Guiana. As florestas mais densas ocorrem no Brasil (TONINI et al., 2008).

Numa bola de castanha (expressão cabocla) ou castanhal, pode-se encontrar de 1 a 15 castanheiras por hectare, sendo a média geral para as áreas de ocorrência na Amazônia de 1,5 árvore/ha (SALOMÃO et al., 2006).

Em sua propagação utiliza-se basicamente a semeadura da amêndoa em substrato de areia, com posterior repicagem da plântula para embalagens plásticas, antes da abertura das primeiras folhas. Apresenta processo germinativo lento, sendo que a protrusão radicular e da parte aérea, partindo da amêndoa, pode apresentar disparidade, que pode ser explicada pela presença de um embrião não diferenciado por ocasião da dispersão das sementes (CAMARGO et al., 2000).

**Tabela 1:** Composição química da semente da castanha-do-brasil.

Componente	Sanchez (1975)	USDA (1975)	Adams (1975)
Água <sup>1</sup>	4,0	4,6	2,0
Proteína <sup>2</sup>	17,0	15,0	16,3
Gordura <sup>2</sup>	65,0	70,1	68,3
Extrato N-livre <sup>2</sup>	10,1	8,2	6,6
Fibra <sup>2</sup>	0,9	3,2	^
Cinza <sup>2</sup>	3,0	3,5	3,6
Energia <sup>3</sup>	-	654,0	694,0

1 % peso fresco, 2 % peso seco, 3 calorias/100g peso fresco.

Fonte: CLEMENT, 1999.

Segundo Shanley et al. (2010) seu fruto tem grande valor nutritivo, sendo também chamado de “carne vegetal” pelo alto teor de proteínas, calorias, gordura e minerais (Tabelas 1 e 2), apresentando o dobro do nível de proteínas em relação a um bife de carne bovina. Seu leite apresenta proteínas quase equivalentes ao leite de vaca, podendo ser substituído na culinária. Também há grandes quantidades de metionina e cisteína – aminoácidos sulfúricos - substâncias presentes principalmente em carnes e no feijão, elemento nutritivo muito limitado na dieta amazônica. A castanha é considerada uma das melhores e maiores fontes de selênio, minério considerado antioxidante, anticancerígeno, que ajuda na prevenção de alguns tipos de vírus, Mal de Parkinson e Alzheimer. Também combate a depressão, cansaço, ansiedade e melhora a autoestima. A quantidade de selênio presente nos frutos da castanheira depende da quantidade desse minério no solo.

Pesquisas recentes mostram que o selênio diminui o estresse oxidativo em mulheres obesas e que, uma dieta suplementar à base de castanhas melhora esse quadro consideravelmente (COMINETTI, 2010). É conhecido que a castanha-do-brasil, ocasionalmente, pode causar queda de cabelo se for consumida em grandes quantidades, devido a altas concentrações de selênio. Há relatos de experimentos com animais em laboratório, indicando que esse elemento pode causar intoxicação (CLEMENT, 1999).

**Tabela 2:** Composição mineral (A) e conteúdo vitamínico (B) da semente da castanha-do-brasil (USDA, 1975).

A	Fósforo <sup>1</sup>	Potássio	Ferro	Sódio
	693	715	3.4	1.0
B	Vitamina A <sup>2</sup>	Tiamina <sup>3</sup>	Riboflavina	Niacina
	-	0,96	0,12	1,6

1 minerais em mg, 2 Vitamina A em unidades internacionais, 3 outras vitaminas em mg.

Fonte: CLEMENT, 1999.

A castanha-do-brasil é rica em óleo comestível, utilizado em vários pratos culinários amazônicos. É um óleo com percentagem baixa de insaturação, um fato importante na dieta moderna. As castanhas rejeitadas para exportação podem ser prensadas para obtenção do óleo se houver um mercado para esse produto, o que pode aumentar o valor das castanhas para os coletores e incentivar um melhor controle de qualidade, bastante precário em alguns centros de processamento (CLEMENT, 1999).

Sua madeira é de qualidade superior para a construção civil e naval, de peso mediano, macia ao corte, resistente a ataques de organismos xilófagos, sendo também considerada uma boa fonte de celulose. A exploração para fins madeireiros de indivíduos nativos é proibida por lei federal (Decreto Nº 5.975 de 30 de Novembro de 2006), o que não impede seu plantio para fins de reflorestamento (LOCATELLI et al., 2005). É considerada uma das madeiras mais finas da Amazônia (CLEMENT, 1999). Ocorre em agrupamentos conhecidos como castanhais ou “bolas”. A densidade por hectare varia muito e sua média é em torno de 1 árvore produtora por hectare. A produção de ouriços varia de 0 a 2.000 por árvore (SHANLEY et al., 2010).

Na região amazônica, quase toda a extração de castanha-do-brasil é destinada à exportação. Após a decadência da borracha, a castanha-do-brasil passou a constituir o principal produto extrativo para exportação da região Norte do Brasil, na categoria de produtos básicos (SERRA et al., 2000). Em 1999, a produção brasileira foi de 19.000 toneladas, sendo o Acre o estado mais produtor, com 10.000 toneladas. Em 2000, a produção subiu para 33.000 toneladas e gerou uma renda superior a R\$ 18 milhões (SHANLEY et al., 2010).

Atualmente, a Bolívia é o maior produtor mundial de castanha-do-brasil e em Cobija está localizada a Tahuamanu S.A., considerada a indústria de beneficiamento mais moderna do mundo. A capacidade da oferta extrativa do Brasil, da Bolívia e do Peru, que respondem pela produção mundial, apresenta-se constante há décadas. Há necessidade de ampliar a oferta mediante plantios racionais, cujas técnicas foram desenvolvidas pela Embrapa Amazônia Oriental desde a década de 1970 (HOMMA, 2008b).

A grande problemática das plantações de castanheiras é a polinização. As flores da castanheira possuem uma estrutura peculiar, na qual um conjunto de estaminóides soldados formam uma peça robusta, a lígula ou capuz, que restringe a entrada de visitantes florais. Para alcançar os recursos florais, é necessário que o visitante,

invariavelmente abelhas, tenha vigor físico suficiente para levantar a lígula e esgueirar seu corpo para o interior da câmara corolínica. A castanheira é uma planta alógama com síndrome de polinização melitófila (MAUÉS, 2002).

Isso quer dizer que, flores polinizadas por determinados visitantes compartilham um conjunto típico de características comuns, relacionadas ao tamanho, comportamento e outras características biológicas dos seus visitantes. Este conjunto de atributos é conhecido como síndrome de polinização, de modo que, por exemplo, as flores polinizadas por abelhas são ditas melitófilas e, muitas vezes, apresentam as seguintes características: flores com simetria zigomorfa, cores vistosas (amarelo, azul e lilás), antese diurna e odor agradável (RODARTE et al., 2008).

As abelhas que especificamente fazem esse tipo de polinização são dos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Epicharis*, *Eulaema* e *Xylocopa*, que vivem em floresta fechada (SHANLEY et al., 2010). Absy et al. (2010), relatam um estudo com *B. excelsa* em um cultivo comercial na Amazônia Central onde foram observados 19 espécies de abelhas de três famílias (Anthophoridae, Apidae e Megachilidae), sendo 10 gêneros, dentre eles, *Apis*, *Megachile*, *Frieseomellita* e *Melipona*.

Por isso, para uma planta vir a frutificar deve estar próxima à área de mata fechada, pois esses insetos não se arriscam a cruzar grandes áreas de espaço aberto (SHANLEY et al., 2010). Contudo, um estudo realizado por Janzen (1971), mostrou que abelhas *Euglossine* podem voltar a um local de alimentação distante 23 quilômetros em uma floresta tropical. Estas abelhas forrageiras aparentemente atravessam longas distâncias e visitam as mesmas plantas repetidamente ao longo de uma rota de alimentação. Elas provavelmente promovem a polinização cruzada entre plantas tropicais com baixa densidade populacional e, portanto, podem permitir a existência dessas espécies de plantas cujas densidades provavelmente baixaram devido a fatores como a concorrência e predadores de sementes e mudas.

As flores de *B. excelsa* ofertam dois tipos de pólen aos visitantes. O pólen que é produzido nos estames concrecidos da lígula (estaminódios) não é fértil, já o que é produzido pelos estames da base da câmara corolínica, formando o anel estaminal, circundando o pistilo, é fértil. Essa característica também é encontrada em outros gêneros de Lecythydaceae (*Chytroma*, *Eschweilera*, *Holopysidium* e *Couratari*). Foram encontradas diferenças morfológicas e fisiológicas entre o pólen fértil e o estéril em *Couroupita guianensis*. Quando as abelhas entram nas flores de *B. excelsa*, usam a parte

externa da lígula como plataforma de pouso e, com o primeiro par de pernas, “puxam” essa estrutura produzindo uma abertura apenas suficiente para entrar na flor na posição invertida, de forma que seu tórax fica em contato com as anteras do anel estaminal e o abdome sem contato com os estaminódios do capuz, à medida que buscam o néctar na base dos estaminódios. Ao visitarem outra flor, o pólen alheio é transferido para o estigma, promovendo a polinização (ABSY et al., 2010).

A castanheira possui uma grande sinergia com outros seres da floresta. A cutia é o principal responsável pela dispersão de sua semente. Ela enterra algumas sementes a um quilometro da árvore mãe. Especula-se que essa seja a origem dos castanhais. O veado, o tatu, a paca, a queixada e o catitu se alimentam das flores, tornando a área ao redor das castanheiras, propícia para a caça. Há duas espécies de anfíbios que só procriam dentro do ouriço da castanha, *Dendrobates castaneoticus* e *D. quinquevittatus* (SHANLEY et al., 2010).

#### **1.4 BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

O termo biotecnologia refere-se a um conjunto amplo de tecnologias que envolvem a utilização, alteração controlada e a otimização de organismos vivos, células e moléculas para a geração de produtos e processos. Seus resultados são aplicáveis e utilizados por setores de diversas áreas do conhecimento (FIGUEIREDO et al., 2010).

Do início do século XX até os dias de hoje, os avanços na área biotecnológica foram imensos. Recombinação de DNA e fusão de protoplastos foram somente alguns desses avanços. Essas novas técnicas aliadas às já conhecidas, como a cultura de tecidos vegetais auxiliam em muito o homem em vários setores, como a indústria farmacêutica, setor agrícola, energético e outros (BARBOSA, 2001).

A biotecnologia vegetal consiste na utilização correlacionada de processos tecnológicos e bioquímicos, aplicados às células, tecidos e órgãos de plantas superiores, visando à geração de novos produtos e serviços. A biotecnologia vegetal, apesar de ser uma tecnologia moderna, é remota e era praticada há 10 mil anos, quando o homem utilizava as plantas e as modificava por meio de reprodução seletiva para obtenção de características melhores como uma maior produção, mais resistentes e sabor mais agradável (CÂMARA, 2009).

Dentre as várias técnicas utilizadas na biotecnologia vegetal, a cultura de tecidos de plantas tem tido, nos últimos anos, um grande incremento nos meios científicos e



ampla divulgação, com enorme potencial de aplicação em várias áreas diferentes (FILHO, 1995).

A cultura de tecidos vegetais é uma das áreas da Biotecnologia, e compreende vários métodos de propagação vegetal em laboratório, vegetativamente e sob condições assépticas, também chamados de cultivo *in vitro*. A utilização destes métodos permite a produção de mudas com alta qualidade fitossanitária, durante todo o ano e em pequeno espaço físico, sob condições controladas. Também possibilita o armazenamento de material vegetativo, com o estabelecimento de bancos de germoplasma *in vitro*. As culturas *in vitro* não necessitam de irrigação, adubação, pulverização com defensivos agrícolas e outras práticas que podem ser danosas ao ambiente (SANTOS, 2008).

Esta metodologia é, basicamente, o cultivo *in vitro* de qualquer parte de uma planta, seja esta uma simples célula, um tecido ou um órgão, sob condições assépticas. Esse conjunto de técnicas está baseado no fato de que qualquer célula vegetal contém toda a informação necessária para regenerar uma planta completa através de processos de diferenciação (CASTRO & OLIVEIRA, 2007). Essa capacidade se deve ao princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, em 1902 (FLORES, 2006).

A aplicação prática dessa técnica iniciou-se quando Morel & Martin (1952) recuperaram plantas de dália livres de vírus do mosaico por meio de cultura de ápices caulinares. Posteriormente, Morel (1960) utilizou essa metodologia para obtenção de plantas de orquídea livres de vírus. Infelizmente, Morel empregou erroneamente a palavra ‘meristema’ para se referir ao ápice caulinar e, até hoje, pesquisadores confundem o uso desse termo (TORRES et al., 1998).

No Brasil, o pioneiro dos trabalhos sobre cultura de tecidos foi o Dr. Agesilau Bitancourt, do Instituto Biológico de São Paulo, na década de 50. Em 1971, uma equipe liderada pelo Dr. William Sharp e pela Dra. Linda Caldas estabeleceu-se na ESALQ, Piracicaba. Posteriormente, a Dra. Linda Caldas transferiu-se para Brasília, criando ali mais um pólo dessa tecnologia. Hoje o Brasil conta com dezenas de laboratórios nessa área, utilizando diferentes metodologias de manipulação de plantas *in vitro*, bem como desenvolvendo trabalhos de engenharia genética de plantas (TORRES et al., 1998).

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Em geral, essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, não, necessariamente, no desenvolvimento direto de novos cultivares. Mas podem oferecer novas alternativas aos

programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecem soluções únicas (FERREIRA et al., 1998).

A seleção e o desenvolvimento de um meio de cultura é essencial para qualquer trabalho em cultura de tecidos de plantas. Dentre os componentes essenciais de meio de cultivo estão a água, sais inorgânicos, vitaminas, fonte de carbono e os fitoreguladores (FLORES, 2006).

Os meios de cultura, segundo Mantovani et al. (2001), além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*. A grande variedade de meios de cultura que tem sido utilizada para a regeneração de espécies de diferentes gêneros foi relatada por vários pesquisadores (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; FLORES, 2006; CORREIA, 2010).

Alguns desses meios foram especificamente desenvolvidos para fornecer os requisitos particulares à espécie trabalhada, como o meio básico de cultura de Murashige & Skoog (1962), desenvolvido inicialmente para tecido medular de *Nicotiana tabacum*, e o Woody Plant Medium (WPM), elaborado por Lloyd & Mccown (1981), para propagação de plantas lenhosas. Esse meio apresenta  $\frac{1}{4}$  das concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  do meio MS, além de possuir mais potássio e um alto nível de íons sulfato (VILA et al., 2004). O meio WPM não inclui cobalto nem iodo, outro elemento sem função conhecida em plantas. Em alguns casos, o iodo estimula o crescimento de explantes *in vitro* de maneira bastante significativa (FERREIRA et al., 1998).

O carbono exógeno no meio de cultivo serve como fonte de energia, influenciando na fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos. Para as plantas é necessário energia, e esta pode ser oriunda da fotossíntese ou de outra fonte de carboidratos. Na cultura *in vitro*, geralmente utiliza-se 20-30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, adicionados ao meio de cultivo (BANDEIRA et al., 2007).

Na cultura de tecidos, são essenciais o controle e a prevenção da contaminação microbiana, pois o meio de cultura proporciona um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos, constituindo-se nas principais causas de perdas de material vegetal (PALÚ et al., 2011).

#### **1.4.1 Desinfestação**

Algumas limitações específicas restringem o uso extensivo do cultivo de tecidos vegetais *in vitro*. Um dos maiores entraves está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A contaminação pode originar-se a partir de microrganismos encontrados no ar, nos tecidos dos explantes, ou por procedimentos inadequados no laboratório. O mais sério problema de contaminação é originado por fungos e bactérias (ODA et al., 2003).

Na prática, a diferença básica entre contaminações bacterianas e fúngicas está no fato de que a ocorrência de fungos e leveduras pode ser mais facilmente percebida no meio de cultura após poucos dias de cultivo, o que, de certo modo, facilita a eliminação de material contaminado. Já no caso das bactérias, por serem, muitas vezes, de difícil visualização, nem sempre sua presença é evidenciada no início do cultivo e, desta forma, podem ser disseminadas facilmente de um material para outro durante as etapas de multiplicação (PEREIRA & FORTES, 2003a).

O uso de diferentes agentes germicidas é fundamental para redução da contaminação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro*. Os mais comuns são o etanol e os compostos à base de cloro, tais como hipoclorito de sódio e de cálcio (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Além dos já citados, vários outros esterilizantes podem ser utilizados como peróxido de hidrogênio, nitrato de prata e cloreto de mercúrio (DONINI et al., 2005).

Vários antibióticos de amplo espectro também são empregados, mas há a problemática da fitotoxicidade, devido às altas concentrações necessárias e tempo de contato com o explante. Contudo, muitos autores citam que os antibióticos pertencentes ao grupo dos betalactanos, como a ampicilina e a carbenicilina, as cefalosporinas (cefotaxime, cefaloridina, cefalotina) e a rifampicina são pouco ou não tóxicos aos cultivos *in vitro* (FISSE et al., 1987; SANTOS & SALEMA, 1989). Além da ausência de fitotoxicidade, alguns antibióticos pertencentes a estes grupos também podem potencializar o crescimento *in vitro* (PEREIRA & FORTES, 2003b).

Além disso, a concentração da solução desinfestante, a combinação dos princípios ativos e o tempo de exposição podem variar muito, sendo necessário à adequação do protocolo de desinfestação de acordo com a espécie, cultivar e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (CHAVES et al., 2005). A superexposição do tecido aos agentes esterilizantes, geralmente, danifica o explante e leva à morte celular (DONINI et al., 2005).

### 1.4.2 Calogênese

A formação de calos em um explante, denominada calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações (CORREIA, 2010). Explante é o órgão ou parte de tecido da planta, o qual será utilizado para iniciar a cultura *in vitro* (FILHO, 1995).

O calo é um aglomerado de células e tecidos formado pela intensa divisão das células do explante. O tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogenético dependem, sobretudo do explante, meio de cultura e fitoreguladores. Também podem diferir em textura, consistência e coloração. Alguns calos são compactos e crescem vagarosamente, outros são friáveis e são mais difíceis de manipular (FLORES, 2006).

Tormignoni (2005) discorre que, ao contrário de alguns autores que afirmam ser o calo uma estrutura desorganizada, este pode ser considerado como um sistema biológico que tem uma estrutura própria. Um calo apresenta gradientes nutricionais próprios que decorrem de sua interação com o meio de cultura, internamente, a partir dos primeiros 10 dias em cultura, tomando tecidos de tabaco como modelo, já se estabelecem as primeiras camadas de células com metabolismo peculiar àquela situação nova, ou seja, já começam a se estabelecer centros de atividade cambial onde estão células que começam uma síntese hormonal.

Diversos fatores interferem na calogênese, tais com o tamanho do explante, composição do meio de cultura, reguladores vegetais, órgão fornecedor do explante, idade e época do ano em que o explante é colhido e genótipo da planta doadora. Calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogenéticos *in vitro* (RODRIGUES & ALMEIDA, 2010).

De acordo com Ferreira (2006), o estabelecimento da cultura de calos é dividido em três etapas: (1) indução, ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular; (2) divisão celular e (3) diferenciação, em que as células tornam-se maiores, vacuolizadas e a taxa de divisão diminui, ocorrendo o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular.

Na primeira etapa do processo de indução de calo, as células prepararam-se para dividir-se, o metabolismo é ativado e as células permanecem com o tamanho constante. A duração dessa fase varia com o estado fisiológico das células e as condições de cultura empregadas. Durante todo esse período ocorre síntese de proteína e DNA (CORREIA, 2010).

A segunda fase inicia-se pela divisão das células periféricas do explante passando, posteriormente, a ocupar a região central. Inicia-se assim, a terceira fase que se caracteriza pela desdiferenciação, na qual as novas células iniciam sua expansão e diferenciação. Surgem os nódulos ou centros de divisão onde há uma mudança na orientação dos planos de divisão. Neste momento, os processos morfogenéticos começam a ocorrer, ou seja, as células entram em um processo fisiológico que as compromete com os novos padrões histológicos. Tornam-se, assim, determinadas a executar funções garantidas pela sua totipotência (TORMIGNONI, 2005).

### **1.4.3 Hormônios e Reguladores de Crescimento**

Em vários tecidos cultivados *in vitro*, a utilização de substâncias reguladoras de crescimento tem-se mostrado de importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação, condições estas necessárias para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (KERBAUY, 1998).

Os fitormônios, como são chamados os hormônios vegetais, são conhecidos também como substâncias de crescimento. São substâncias orgânicas sintetizadas numa região da planta e transportadas para outra, onde vão agir, em baixas concentrações (MODESTO & SIQUEIRA, 1981).

Além dos hormônios que as plantas produzem naturalmente, existem os análogos sintéticos, também conhecidos como reguladores de crescimento que diferentemente dos hormônios que são produzidos em um ponto e agem em outro, tem ação local. Por serem de mais fácil acesso, possuem vasta aplicação na agricultura e silvicultura moderna. A possibilidade de produção dos reguladores vegetais permitiu o cultivo de tecidos vegetais *in vitro* e definiu o sucesso da micropropagação clonal de plantas (SALVARO, 2009).

O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os fitorreguladores se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (ANDRADE, 2010).

Como os hormônios vegetais não são produzidos em glândulas, como nos animais, não é fácil isolar um hormônio vegetal, o que por sua vez dificulta o estudo de sua atuação. Cinco grupos de substâncias são considerados hormônios vegetais: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (MODESTO & SIQUEIRA, 1981).

Na natureza, as auxinas estão envolvidas com a alongação do caule e internós, tropismos, dominância apical, abscisão, enraizamento, entre outros processos. Na cultura de tecidos, as auxinas têm sido utilizadas para a divisão celular e a diferenciação de raízes (FILHO, 1995). As primeiras experiências sobre substâncias de crescimento datam de 1880, quando C. Darwin e seu filho Francis começaram a se interessar pela inclinação de plantas em direção à luz. A essas primeiras evidências, que sugeriram a existência de hormônios vegetais, seguiram-se outras, que culminaram, em 1928, com a descoberta da auxina por Frits Went (MODESTO & SIQUEIRA, 1981).

Segundo Souza & Abreu (2007), as auxinas, em particular o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) são extremamente importantes na indução da calogênese e células embriogênicas e na posterior remoção da auxina do meio de cultura. Estas células formam embriões somáticos. Além disso, o 2,4-D possui uma aplicação relevante no estudo da lignificação através de células em suspensão de várias espécies e com os mais variados objetivos.

As citocininas são substâncias reguladoras de crescimento envolvidas principalmente na divisão, crescimento e diferenciação de células. No enraizamento de lenhosas, geralmente são utilizadas em concentrações bem mais baixas do que as auxinas. As mais empregadas tem sido o BAP, CIN, 2iP e ZEA (ASSIS & TEIXEIRA, 1998). São indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. O uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas, mas o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pelo demasiado entufamento e falta de alongamento das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Outras substâncias com atividade de citocinina têm sido descritas. Nieuwkerk et al., (1986) verificaram que o tidiazuron (TDZ), um composto do grupo das feniluréias, estimulou a multiplicação de partes aéreas de macieira, em concentração bem inferior àquele do BAP (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

As giberelinas formam outra classe de substâncias reguladoras do crescimento. Elas se caracterizam por serem compostos de ocorrência natural. Apenas dois ou três

compostos ativos são disponíveis comercialmente. Aplicadas em plantas intactas, as giberelinas podem influenciar o crescimento, de diversas maneiras, aumentando o comprimento do caule, promovendo o florescimento e o aparecimento de frutos (FILHO, 1995). Esse efeito pode ser explorado *in vitro*. Quando as partes aéreas produzidas não estão em condições de ser individualizadas para o enraizamento, devido ao seu tamanho, o cultivo na presença de GA<sub>3</sub> pode provocar alongamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A composição e concentração de hormônios no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. É considerado por alguns autores que o crescimento de calo em diferentes espécies pode ser: (1) independente de citocinina e de auxina; (2) dependente de auxina; (3) dependente de citocinina ou (4) dependente de ambas, auxina e citocinina (CALDAS et al., 1998).

## **1.5 DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE**

A história do desenvolvimento econômico revela que as nações que alcançaram níveis satisfatórios de crescimento o fizeram à custa de perdas ambientais. Por isso, cresce a consciência mundial sobre a importância da preservação do meio ambiente, o que permite prever que esse será um dos temas que demandará definições e ações efetivas das instituições públicas, em especial, daquelas formuladoras de políticas econômicas e de ciência e tecnologia, fazendo surgir bases teóricas para um crescimento econômico com preservação ambiental (TAVARES et al., 2008).

O processo de desenvolvimento regional recente vem-se prestando para acelerar o uso dos recursos bióticos e, ao mesmo tempo, tem pouca preocupação quanto à necessidade de conservá-los. São quatro as fases que caracterizam a evolução extrativista dos recursos vegetais da Amazônia: expansão; estabilização, onde há o equilíbrio entre oferta e demanda; declínio, causado pela redução dos recursos e, por fim, o plantio domesticado, que começa a se formar ainda na estabilização a partir de tecnologias e práticas comerciais que favoreçam as condições de plantio (BARBOSA, 2001).

No início da década de 1990, a EMBRAPA reconheceu que o desenvolvimento agrícola amazônico deve incluir extrativismo, manejo florestal e agroflorestal, além da agricultura convencional, tendo transformado todos seus centros na Amazônia em

Centros de Pesquisa Agroflorestral. Para a EMBRAPA, os sistemas de produção são não-convencionais, mais orientados para o pequeno proprietário e conservação da biodiversidade do que para os sistemas agrícolas convencionais (CLAY et al., 1999).

Na perspectiva de se conceber uma nova proposta de desenvolvimento rural, os aspectos da localidade, interagindo com as demais características da sustentabilidade e integração social e territorial, emergem como um dos seus aspectos fundamentais. A noção de desenvolvimento centrado essencialmente no local apresenta-se com uma conotação essencialmente integracionista, alusiva à superação das carências específicas das localidades; e, de uma integração das especificidades locais, no sentido da formação de sinergias territoriais (ARAGÃO & BORRERO, 2007). Assim, o conceito de local adquire a conotação de alvo sócio-territorial das ações; não sendo, no entanto, propriamente, um espaço micro, podendo ser tomado como um município ou, inclusive, como uma região compreendendo vários municípios (CORREIA, 2010).

O desenvolvimento de uma região como a Amazônia, que precisa crescer economicamente visando o progresso, mas precisa preservar de acordo com o ponto de vista ecológico, deve ocorrer da forma menos drástica e, ser realizado de modo a configurar uma recuperação das áreas já degradadas, que são muitas, de maneira a evitar um maior estresse ao solo já totalmente desprotegido e a fauna local, que provavelmente, já se distanciou de seu nicho ecológico original. O trabalho aqui apresentado busca uma forma rápida, segura e ecologicamente sustentável de começar a fazer essa recuperação. Apoiando o reflorestamento com espécies sociais, como é o caso da castanheira. Além de criar uma nova área verde, ainda fornece renda para os pequenos agricultores de nossa região, visando diminuir a evasão do campo.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 EXPERIMENTO I - DESINFESTAÇÃO

Nesse estudo foram utilizadas sementes imaturas provenientes de castanheiras cultivadas em Campo Experimental da Embrapa Rondônia (8°53'20''S 63°06'40''W), no município de Porto Velho, situado na margem direita do Rio Madeira, com área territorial de 34.096,429 km<sup>2</sup>, população de 428.527 habitantes, classificação climática dessa região segundo Köppen é do tipo Aw, tropical chuvoso, com uma estação relativamente seca durante o ano temperaturas médias anuais de 25,5 °C, máxima de 31,5 °C e mínima de 20,7 °C (SILVA et al., 2004).

Para chegar à copa das árvores, cerca de 25 m de altura, foi utilizada a técnica de rapel. Para fazer a coleta dos ouriços, utilizou-se um podão.

As sementes imaturas ainda com tegumento foram devidamente lavadas com o auxílio de esponja e detergente comercial e enxaguadas com água destilada. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as mesmas foram imersas em etanol a 70% (v/v), por um minuto e logo após foram separadas em 6 béqueres e submersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 2,5% por 15 e 30 minutos, em soluções de hipoclorito de cálcio (Na(ClO)<sub>2</sub>) na concentração de 5% por 15 e 30 minutos e solução de cefotaxima 50mg.L<sup>-1</sup> por 15 e 30 minutos, conforme demonstrado na tabela 3. Após esse procedimento foram enxaguadas três vezes em água bidestilada e autoclavada, sendo o primeiro enxágue, por um minuto. Logo depois, com o auxílio do bisturi, foi retirado o tegumento das sementes e os explantes foram seccionados em média com um cm<sup>2</sup> e inoculados em meio MS<sup>1/2</sup> (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 0,8% de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 ± 1 antes da autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos, sem reguladores de crescimento. Foi realizada uma avaliação sete dias após a inoculação. Os aspectos avaliados foram as percentagens de contaminação. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com luminosidade de 2000 lux e fotoperíodo de 16 horas. O material inoculado foi mantido na ausência de luz, visando diminuir a oxidação fenólica, e com temperatura controlada de 24°C ± 2°C. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em fatorial 3 (NaClO, Na(ClO)<sub>2</sub> e Cefotaxima) x 2 (dois períodos de tempos – 15 e 30 minutos) com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por quatro tubos de ensaio contendo um explante por tubo. A avaliação da contaminação foi realizada sete dias após a inoculação dos explantes. Os

dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 3:** Concentrações de hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e cefotaxima utilizados para desinfestação de explantes provenientes de sementes imaturas de *Bertholletia excelsa*. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2012.

Tratamento	Tempo (minutos)	Concentração
1	15	NaClO 2,5%
2	30	NaClO 2,5%
3	15	Ca(ClO) <sub>2</sub> 5%
4	30	Ca(ClO) <sub>2</sub> 5%
5	15	CEF 50 mg.L <sup>-1</sup>
6	30	CEF 50 mg.L <sup>-1</sup>

## 2.2 EXPERIMENTO II – INDUÇÃO DE CALOGÊNESE

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal – Embrapa Rondônia com sementes oriundas de ouriços de castanheiras cultivadas no campo experimental da referida empresa. Todas as manipulações foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Os explantes foram desinfestados ainda com tegumento e, após esta fase, cada semente foi segmentada com bisturi em quatro partes, cada uma com cerca de um cm<sup>2</sup> e inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981), acrescido de combinações fatoriais de 2,4-D (0;1;2;4;8 mg.L<sup>-1</sup>) e TDZ (0;1,6;3,2 mg.L<sup>-1</sup>). Após a inoculação, o experimento foi mantido no escuro, em sala de crescimento, com luminosidade de 2000 lux e fotoperíodo de 16 horas, a 24 ± 2°C. Os tratamentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por cinco tubos de ensaio contendo um explante cada.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Após 21 dias, avaliou-se o percentual de explantes com a presença de calos, considerando seu surgimento a partir da estrutura típica de calos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 EXPERIMENTO I - DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Após o sétimo dia de inoculação, pôde ser observado neste estudo que, na maioria dos tratamentos, houve um alto índice de contaminações. No tratamento que combinou hipoclorito de sódio com concentração de 2,5% no tempo de 15 minutos houve um percentual de 55% de explantes contaminados e quando imersos por 30 minutos no referido desinfestante, esse percentual foi de 70%. Já com o desinfestante hipoclorito de cálcio na concentração de 5%, quando imersos durante 15 minutos, a porcentagem de contaminação foi de 80%, enquanto que, no tratamento em que os explantes ficaram em contato com o desinfestante durante 30 minutos, o índice de contaminação caiu para 5%. Grattapaglia & Machado (1998) discorreram sobre o hipoclorito de cálcio apresentar a vantagem de ser menos tóxico para os tecidos do que o hipoclorito de sódio. O uso do antibiótico cefotaxima na concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> não surtiu o efeito desejado. Quando imersos durante 15 minutos, houve 30% de contaminação e aumentando o tempo para 30 minutos, o índice subiu para 50%.

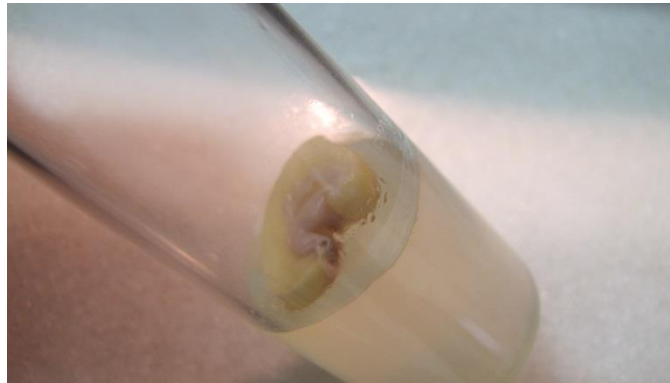
É possível verificar na Tabela 4 que os tratamentos testados diferiram significativamente entre si. Alguns seres contaminantes podem ser endógenos ou estarem latentes tanto em sementes como em brotos. Por essa razão, muitas vezes a obtenção de tecidos vegetais livres de microrganismos prejudiciais é complexa (CALDAS et al., 1998).

**Tabela 4:** Análise de variância dos tratamentos utilizados para desinfestação de sementes imaturas de *B. excelsa*.

<b>Causas de variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
Tratamentos	(5)	7,47	15,89**
Resíduo	18	0,47	
Desinfestantes	2	3,04	6,47**
Tempos	1	2,66	5,66**
D x T	2	14,30	30,42**
D (dentro de 15')	2	6,25	13,30**
D (dentro de 30')	2	11,09	23,59**
T (dentro de NaClO)	1	1,13	2,40*
T (dentro de Ca(ClO) <sub>2</sub> )	1	28,13	59,85**
T (dentro de CEF)	1	2,00	4,26**
CV (%)		11,59	

\* Significativo a 5% de probabilidade; \*\* significativo a 1% de probabilidade.

A contaminação depende muito do local de cultivo do material a ser multiplicado. Assim, provavelmente a aplicação de tratamentos preventivos (com inseticidas, fungicidas e bactericidas) possa aumentar o grau de desinfestação antes da retirada dos explantes (DINIZ et al., 2008). A dificuldade maior nesta etapa é conseguir livrar o tecido vegetal da contaminação microbiana e manter sua integridade no processo (Figura 2).



**Figura 2:** *Bertholletia excelsa*. Contaminação de fragmento de semente imatura por bactéria endógena. Foto: S.M.S. Carvalho.

É essencial que o tecido que dará origem aos explantes estejam livres de contaminantes, sendo necessária a sua desinfestação, a fim de eliminar microrganismos exógenos, que poderá vir a comprometer a fase de estabelecimento *in vitro*, visto que, os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MORAES et al., 2007).

Como demonstrado na Tabela 5, o desinfestante que melhor efeito teve sobre os explantes de *B. excelsa* foi o hipoclorito de cálcio 5%, com imersão durante 30 minutos. Moraes et al. (2007) explicam que o mecanismo de ação do cloro ativo presente no hipoclorito de cálcio não é bem conhecido, embora algumas hipóteses sugiram que há uma combinação com proteínas da membrana celular dos microrganismos, formando compostos tóxicos e levando à inibição das enzimas essenciais, provocando, assim, a necrose não só dos agentes infestantes mais também do material biológico.

**Tabela 5:** Efeito dos tratamentos na desinfestação dos explantes em relação ao tempo de imersão e à concentração dos desinfestantes testados. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2012.

Tratamento	Tempo (min.)	Concentração (%)	Contaminados
1	15	NaClO 2,5%	11 b
2	30	NaClO 2,5%	14 a
3	15	Ca(ClO) <sub>2</sub> 5%	16 a
4	30	Ca(ClO) <sub>2</sub> 5%	1 d
5	15	Cef 50mg.L <sup>-1</sup>	6 c
6	30	Cef 50mg.L <sup>-1</sup>	10 b

\*As letras indicam significância, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si.

Guerra et al. (1999) trabalhando com plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr., tiveram êxito com o hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos. Em um experimento realizado com *Spathiphyllum wallisi* Regel, Diniz et al. (2008) obtiveram bons resultados quando utilizaram hipoclorito de sódio na concentração de 2%. Figueiredo (2003) utilizou este mesmo tratamento em sementes de *Acanthostachys strobilacea* (Schultes f.) Klotzsch e também obteve excelentes resultados.

Malosso (2007) obteve bons resultados com hipoclorito de cálcio 5%, descontaminando segmentos nodais de *Acmella oleracea*, tendo percentuais de contaminação variando entre 8 e 11%, mas houve 100% de explantes mortos, sendo esse fato explicado pela relação entre o tamanho do explante e a ação do agente desinfestante, uma vez que tecidos pequenos são muito susceptíveis à degeneração dos tecidos causados pelo hipoclorito de cálcio. Rescarolli & Zaffari (2009) experimentaram em gemas axilares de *Etilingera elatior* hipoclorito de cálcio 5% por 25 minutos juntamente ao etanol 70% por dois minutos e obtiveram resultados medianos, tendo percentuais de contaminação de até 40% e sobrevivência dos explantes de 30%. Os autores supõe que esses resultados se devam a fragilidade do tipo de explante usado e ao tempo de ação em que o desinfestante atua.

Na seleção dos explantes, devem ser considerados aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação. O tamanho do explante também determina suas possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1988). No presente estudo, o tamanho do explante foi determinado considerando abranger uma área meristemática maior e sua

sobrevivência. A existência de tecido meristemático circundando a amêndoa leva a crer que a semente de *B. excelsa* tenha boa capacidade de regeneração (CAMARGO et al., 2000).

Rocha et al. (2007) obtiveram bons resultados com a utilização de hipoclorito de cálcio nas concentrações 5 e 10% em explantes de bananeira ‘prata anã (ABB)’. Efeitos análogos foram observados por Cordeiro (1999) ao utilizar como desinfestante o hipoclorito de cálcio 5% em explantes foliares de *Coffea canephora* e *C. arábica* e Heloir et al. (1997) em gemas axilares de videira *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir.

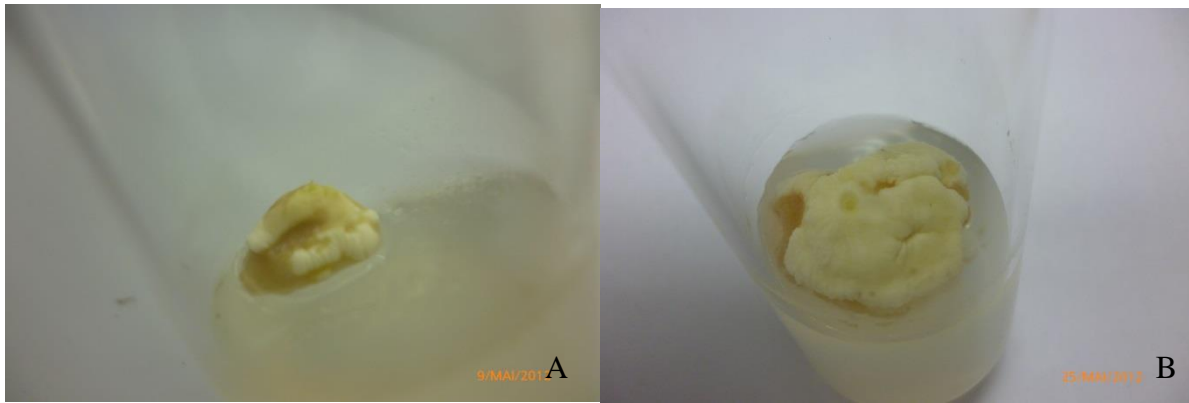
Foi constatado em um estudo realizado por Ferreira et al. (2009) que a utilização de cefotaxima 100mg.L<sup>-1</sup> no meio de cultura é fundamental para o controle da contaminação em explantes florais de cupuaçu, permitindo o seu estabelecimento *in vitro*.

A combinação de polimixina B, rifampicina e cefotaxima elimina os contaminantes de várias espécies lenhosas cultivadas *in vitro*, incluindo a macieira, ameixeira e pereira. A utilização de antibióticos é interessante para o controle de contaminações de bactérias endógenas, que frequentemente representam sério problema no estabelecimento de culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1988).

Comumente, um detergente é acrescentado à solução de hipoclorito para facilitar sua ação, aumentando o contato da solução com os tecidos, contudo o efeito pode ser ambivalente; diminui a contaminação, mas pode aumentar a toxicidade do desinfestante no explante (TORRES et al., 1998).

### **3.2 EXPERIMENTO II - CALOGÊNESE**

A formação de calos nas sementes imaturas de *B. excelsa* ocorreu entre 12 e 15 dias após a inoculação, sendo que os explantes apresentaram intumescimento, indicando desta forma o início do processo de indução de calos (Figura 3). Serra et al. (2000) também observaram o surgimento de calos aos 15 dias ao inocular explantes foliares de *B. excelsa* com as combinações de 2,26 µM de 2,4-D + 8,88 µM de BAP. Ao analisar a curva de crescimento, observou-se que na fase exponencial, entre o 30º e 53º dia, ocorreu o maior percentual de crescimento (74%) e o menor na fase de desaceleração, entre o 60º e 67º dia (6%). Os resultados apresentados pela curva de crescimento indicam que seu crescimento é lento, o qual possivelmente está associado à presença de um ciclo celular também lento.



**Figura 3:** *Bertholletia excelsa* (A) Semente imatura no início da indução de calos, com 15 dias de inoculado. (B) Semente imatura com 21 dias de inoculado, já com toda a superfície coberta por calos. Foto: S. M. S. Carvalho

Na Tabela 6 constam os resultados da análise de variância da indução de calos em resposta às combinações de reguladores de crescimento a que foram submetidos os explantes. Em termos gerais, os tratamentos diferiram significativamente entre si. No desdobramento dos efeitos individuais de TDZ e 2,4-D, não se observou efeito significativo do TDZ. Ao contrário, o 2,4-D resultou em efeito significativo na indução de calos, assim como sua interação com o TDZ. Assim, procedeu-se ao desdobramento do 2,4-D dentro de cada concentração de TDZ, identificando-se que o mesmo apenas teve efeito significativo dentro da concentração de 3,2 mg.L<sup>-1</sup>. A curva de regressão correspondente a esse efeito está apresentada na Figura 4.

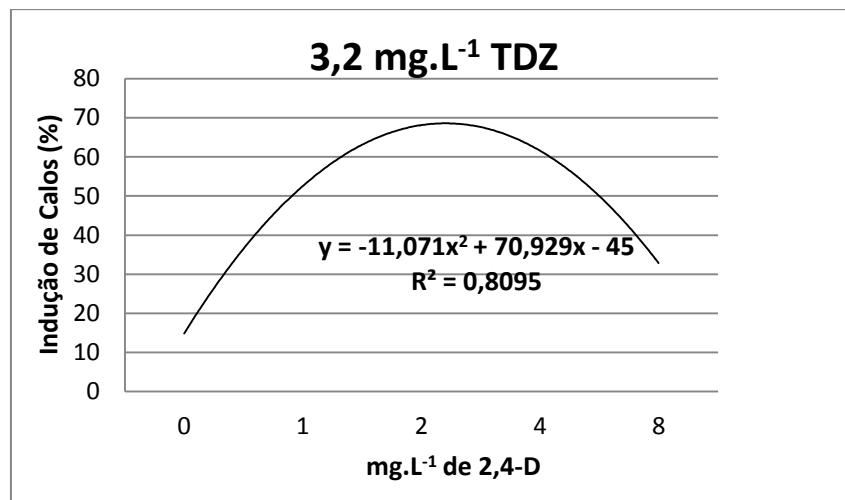
**Tabela 6:** Análise de variância do efeito de diferentes combinações de 2,4-D e TDZ na indução de calos em sementes imaturas de *B. excelsa*. Porto Velho, Embrapa Rondônia, 2012.

Fontes de Variação	GL	QM	F
Tratamento	14	4,20	7,78**
Resíduo	45	0,54	
TDZ	2	0,07	0,12 <sup>ns</sup>
2,4-D	4	6,79	12,58**
TDZ X 2,4-D	8	3,94	7,30**
2,4-D (0 mg.L <sup>-1</sup> TDZ)	4	0,8	1,48 <sup>ns</sup>
2,4-D (1,6 mg.L <sup>-1</sup> TDZ)	4	0,01	0,02 <sup>ns</sup>
2,4-D (3,2 mg.L <sup>-1</sup> TDZ)	4	4,05	7,5**

CV(%)	9,71
-------	------

ns não significativo; \*\* significativo a 1% de probabilidade.

Pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos moleculares da interação auxina-citocinina. Acredita-se que um dos possíveis pontos de interação poderia ser encontrado no próprio metabolismo de ambos os hormônios, e uma dessas classes hormonais influenciaria a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese ou inativação da outra (KERBAUY, 2004).



**Figura 4:** Representação gráfica da curva de regressão de explantes de semente imatura de *B. excelsa* com formação de calos quando inoculados em meio WPM, contendo diferentes concentrações de 2,4-D e 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ.

Nogueira et al. (2007) não verificaram efeito positivo da utilização de TDZ em interação com 2,4-D na calogênese de explantes foliares de murici-pequeno. Como a indução de calos é dependente de um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas, provavelmente, o fornecimento de citocininas endógenas acrescido da citocininas presente no meio nutritivo proporcionaram uma elevada concentração desse regulador em relação à auxina, ocasionando uma diminuição na formação de calo. Estudos comprovam que o balanço hormonal auxinas/citocininas age na regulação do ciclo celular. Determinou-se que, na transição de G<sub>1</sub> para S, a auxina aumenta o conteúdo da cinase dependente de ciclina do tipo a (CDK/a), a qual, por seu lado, precisa ser ativada por uma ciclina específica, a do tipo D<sub>3</sub> (CYC/D<sub>3</sub>). Por sua vez, o nível da ciclina D<sub>3</sub> é modulado por citocininas. Somente a partir da formação do



complexo ativo CDK/aCYC/ D<sub>3</sub>, a célula adquire capacidade para progredir no ciclo, passando para a fase seguinte, isto é, iniciação da síntese de DNA (KERBAUY, 2004).

Na ausência dos dois reguladores, houve 30% de calogênese, o que provavelmente ocorreu devido à injúria física a que os explantes foram submetidos, após o processo de desinfestação e corte com bisturi.

De modo geral, a iniciação de calos é estimulada apenas pela presença de auxina no meio de cultura. Entretanto, o crescimento de calos em diferentes espécies pode ser independente de auxina e citocinina, dependente de auxina, dependente de citocinina ou dependente de ambas (BORGES et al., 2006).

Santos et al. (2003) induziram calos em segmentos foliares de *Coffea arabica* cv Rubi, ao utilizarem 2,4-D isoladamente nas concentrações de 0,5; 1; 1,5 mg.L<sup>-1</sup> alcançando, respectivamente, 61%, 67% e 69% de produção de calos. Thurow et al. (2009), conseguiram bons resultados com a concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D ao inocular explantes foliares de ameixeira japonesa cv. 'América' (*Prunus salicina*, Lindl.). Ferreira et al. (2007) ao inocular segmentos foliares de figueira cultivar Roxo de Valinhos (*Ficus carica* L.) utilizaram 2,4-D na concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, alcançando excelentes resultados.

Silva et al. (2009) ao inocular anteras de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho constataram que, a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D proporcionou seu melhor resultado e a partir desta, foi observado um decréscimo de calosidade.

As auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular. O 2,4-D tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento e que podem induzir a proliferação desordenada (NOGUEIRA et al., 2007).

Os reguladores de crescimento não influenciam as respostas da planta exclusivamente por meio de mudanças na sua concentração, mas que esta regulação também pode ser exercida mediante alterações na sensibilidade das células responsivas. Dessa maneira, a resposta a um determinado hormônio pode ser alterada por mudanças: a) no número e na afinidade de receptores e b) no nível de outras substâncias endógenas (GUERRA et al., 1998)

Com a concentração de 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ, observou-se que foi seguido o mesmo padrão de porcentagem de calos (75%) de quando não foi acrescido TDZ no meio de cultura. Nos dois tratamentos a concentração de 2,4-D foi de 2,0 mg.L<sup>-1</sup>.

Provavelmente a concentração de citocinina endógena da castanheira foi suficiente para balancear o processo de calogênese, tornando assim, a concentração de 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ desnecessária. Esta citocinina pode manifestar-se como inibidor de crescimento, quando utilizada na mesma concentração de outras citocininas (RIBEIRO et al., 2010). Muitos estudos tem mostrado que citocininas do tipo feniluréia, como o thidiazuron e a difeniluréia (DPU), são fortes inibidores da atividade da CKO (oxidase da citocinina). Análises recentes da cinética da proteína codificada pelo gene de CKO indicaram que as feniluréias atuam como inibidores competitivos de citocininas endógenas para o sítio da referida enzima. As CKOs atuam no controle do ciclo celular através da degradação de citocininas. (KERBAUY, 2004).

O trabalho de Deus et al. (2007) apresentaram resultados interessantes, onde foi testado o uso de TDZ combinado a ANA para indução de calos em sementes de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Comprovou-se que, quando se usou TDZ na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> isoladamente não houve surgimento de calos, mas ao combinar as concentrações de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, obteve-se 100% dos explantes apresentando calos. Segundo Kaneda et al. (1997), o melhor desempenho do TDZ, aparentemente, pode estar relacionada à maior atividade citocinínica ou a forma de ação diferente de outras citocininas durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular.

O TDZ é mais ativo na multiplicação que outras citocininas, por causa do aumento da atividade enzimática fosfatase ácida que promove a interconversão nucleotídeo-nucleosídeo da estrutura das citocininas endógenas, tornando-as biologicamente mais ativas, e dessa forma, podendo tornar-se inibidor de crescimento, quando utilizada na mesma concentração de outras citocininas (MANTOVANI et al., 2001).

Declerck & Korban, (1996) consideraram ótimo as concentrações de 1,76 a 2,86 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ para a calogênese em pessegueiro (*Cercis canadensis* var. mexicana). No entanto, doses mais elevadas resultaram em necrose dos explantes.

Em combinação com todas as concentrações de TDZ analisadas neste estudo (0; 1,6 e 3,2 mg.L<sup>-1</sup>), a concentração de 8,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D apresentou valores relativamente baixos de indução de calos, sendo 35%, 20% e 40% de explantes com calos respectivamente, o que reflete o efeito fitotóxico deste regulador em altas concentrações.

Corroborando com este resultado, Costa et al. (2008) testaram diferentes tipos de auxinas (ANA, AIB, AIA e 2,4-D) nas concentrações de 0; 2,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> em explantes foliares e internodais de *Piper hispidinervum* C. DC e os melhores resultados foram obtidos com ANA e os piores resultados, onde houve morte da maioria dos explantes, foi com 2,4-D. Foi observado ainda que explantes foliares foram mais sensíveis às concentrações de 2,4-D estudadas do que explantes internodais. Os resultados de Reis et al. (2007) apontam para o mesmo efeito fitotóxico já comprovado, ao trabalhar com as concentrações 0, 2, 4 e 6 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D na indução de calogênese em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby), alcançando os percentuais, respectivamente de 90%, 71%, 85% e 5% de calos.

Contradizendo os resultados apresentados, Werner et al. (2009), obtiveram calos friáveis em discos de foliólolos do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) em concentrações que vão de 5 a 20 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, consideradas fitotóxicas nos experimentos supracitados. Correia (2010) induziu calogênese em *Bactris gasipaes* com a combinação de 10 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

## CONCLUSÕES

- Nas condições em que foi realizado esse trabalho, a menor contaminação (5%) de sementes imaturas de *B. excelsa* foi obtida com imersão em álcool 70% por um minuto seguido de imersão em hipoclorito de cálcio 5% por 30 minutos.
- A condição que resulta em maior porcentagem de calogênese em *B. excelsa* foi encontrada nas concentrações de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 3,2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ.
- Estudos posteriores deverão ser realizados para dar continuidade ao processo de cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *B. excelsa* visando à regeneração de plantas a partir dos calos obtidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABSY, M. L.; MATOS, F. D. A.; AMARAL, I. L. (Orgs). Diversidade Vegetal Brasileira: Conhecimento, Conservação e Uso. In: Conferências, Simpósios e Mesas-redondas do 61º Congresso Nacional de Botânica. **Anais...** Manaus: Sociedade Botânica do Brasil, 2010.550p.

ADAMS, C.F. 1975. Nutritive value of American foods. Agricultural Research Service, US Dept. Agriculture Handbook 456. In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. (Eds) **Biodiversidade Amazônica – exemplos e estratégias de utilização**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 1ª edição. Manaus, 1999.

ANDRADE, W. F. **Indução de rejuvenescimento de teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação**. 2010. 75p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais/Silvicultura), Piracicaba, ESALQ/USP, 2010.

ARAGÃO, J. L.; BORRERO, M.A.V. Esboço de uma política pública de desenvolvimento sustentável para a pecuária leiteira da agricultura familiar de Rondônia em consonância com o sistema contemporâneo capitalista. In: **Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente em Rondônia**. Edufro (Universidade Federal de Rondônia), 2007.

ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, p. 261-296, 1998.

BANDEIRA, J. M.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 472-474, 2007.

BARBOSA, F. B. C. A Biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.18, n.2, p.69-94, 2001.

BORGES, N. S. S.; BENBADIS, A. K.; MARCO, C. A.; SOMBRA, J. N. S. Avaliação da descontaminação, germinação e respostas morfológicas do mamão cultivado *in vitro* (*Carica papaya* L.) **Revista Ciência Agronômica**., v.37, n.2, p.308-313, 2006.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, v. 1, p. 87-132, 1998.

CAMARGO, I. P.; CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia e morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-brasil. **Cerne**, v.6, n.2, p.11-18, 2000.

CASTRO, L.A.S.; OLIVEIRA, R. P. Cultura de tecidos e indexagem Sistemas de Produção, 10. ISSN 1806-9207 - **Versão Eletrônica**.2007.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. Conservação e Desenvolvimento. In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. (Eds) **Biodiversidade Amazônica – exemplos e estratégias de utilização**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 1ª edição. Manaus, 1999.

CLEMENT, C. R. Castanha-do-Pará. In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. (Eds) **Biodiversidade Amazônica – exemplos e estratégias de utilização**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 1ª edição. Manaus, 1999.

COELHO, M. C. N.; MONTEIRO, M. B.; FERREIRA, B. C.; BUNKER, S. Impactos Ambientais da Estrada de Ferro Carajás no Sudeste do Pará PARTE IV. In: TEIXEIRA, J. B. G.; BEISIEL, V. R. **Carajás: Geologia e ocupação humana**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2006.

COMINETTI, C. **Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase**. 2010. 100p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), São Paulo, USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2010.

CORDEIRO, A. T. **Embriogênese somática e fusão interespecífica de protoplastos em *Coffea***. 1999. 126p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 1999.

CORREIA, A. O. **Calogênese em ápices caulinares de *Bactris gasipaes* H.B.K.** 2010. 54p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). UNIR – Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho. 2010.

DECLERCK, V.; KORBAN, S.S. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. mexicana. **Journal of Horticultural Science**, Urbana, v. 71, n. 1, p. 49-55, 1996.

DEUS, D. A.; SOUZA, K. C. A.; DUARTE, M. S.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, H. S. Calogênese em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake em diferentes concentrações de reguladores de crescimento. (Nota Científica). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 717-719, 2007.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; OLIVEIRA, A. B.; BEZERRA, A. M. E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p.107-113, 2008.

DONINI, L.P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J. A.; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.4, p.517-522, 2005.

DRUMMOND, J. A. A extração sustentável de produtos florestais na Amazônia brasileira: vantagens, obstáculos e perspectivas. **Estudos Sociedade e Agricultura**, v.6, p.115-137.1996.

FERNANDES, N. P.; ALENCAR, J. C. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies - castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.), dez anos após o plantio. **Acta Amazonica**, v.23 n.2-3. p.191-198. 1993.

FERREIRA, E. A. **Micropropagação, calogênese e irradiação da figueira 'roxo de valinhos'**. 2006. 93p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). UFLA – Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2006.

FERREIRA, E. A.; PASQUAL M.; REZENDE, J. C. Calogênese em plântulas de figueira. Comunicação. **Revista Ceres**, v.54, n.312, p.112-117, 2007.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, Porto Velho, v.2, n.2, p.37-44, 2009.

FIGUEIREDO, M. L. **Desenvolvimento de protocolos para propagação *in vitro* de três espécies de bromeliaceae nativas do Brasil**. 2003. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. 2003.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Editores técnicos. **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE: Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010. 761p.

FILHO, C. F. D. Cultura de Tecidos de Plantas. Micropropagação. **Apostila**. DBAA/FCAVJ/UNESP. São Paulo, 1995.

FISSE, J.; BATALLE, A.; PERA, J. Endogenous bacteria elimination in ornamental plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 212, p. 87-90, 1987.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de  $\beta$ -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 168p. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2006.

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

GUERRA, M. P.; VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a

micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira.**, v. 34, n.9, p. 1557-1563, 1999.

HELOIR, M. C.; FOURNIOUX, L.; OZIOL, L.; BESSIS, R. An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* L. Pinot noir) using auxiliary-bud microcuttings. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, v. 49, p. 223-225, 1997.

HOMMA, A. K. O.; WALKER, R. T.; CARVALHO, R. A.; CONTO, A. J.; FERREIRA, C. A. P. Razões de risco e rentabilidade na destruição de recursos florestais: o caso de castanhais em lotes de colonos no sul do Pará. **Revista Economica do Nordeste.** Fortaleza, v. 27, n.3, p. 515-535,1996.

HOMMA, A. K. O. **Amazônia – Meio Ambiente e Desenvolvimento Agrícola.** 1ª edição. 412 pág. Belém: EMBRAPA – CPATU, 1998.

HOMMA, A. K. O. **Cronologia da ocupação e destruição dos castanhais no sudeste paraense.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 132p. 2000.

HOMMA, A. K. O. Amazônia: como aproveitar os benefícios da destruição? DOSSIÊ AMAZÔNIA BRASILEIRA II. **Estudos Avançados**, vol.19 n.54, São Paulo. 2005.

HOMMA, A. K. O. Extrativismo, Biodiversidade e Biopirataria na Amazônia. **Texto para Discussão 27.** Embrapa Informação Tecnológica Brasília, DF. 97 pág. 2008a.

HOMMA, A. K. O. Benefícios da domesticação dos recursos extrativos vegetais. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (Eds). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas.** Brasília, DF: Embrapa, v. 2, p. 263-271. 2008b

IBAMA. **Lista Oficial de Flora Ameaçada de Extinção.** Brasília. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/flora/extincao.htm>> acesso em: out.2011

JANZEN, D. H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, N.Y. 171:203-205.1971.

JOLY, A. B. **BOTANICA – Introdução à taxonomia vegetal.** 11ª edição. Editora Nacional, São Paulo. 1993.

KANEDA, Y.; TABEL, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, v.17, p.8-12, 1997.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa, v. 2, p. 519-531, 1998.



KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo, Ed. Guanabara-Koogan. 452p, 2004.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant. Prop. Soc.**, v. 30, p. 421-327, 1981.

LOCATELLI, M.; VIEIRA, A. H.; GAMA, M. M. B.; FERREIRA, M. G. R.; SILVA FILHO, E. P.; SOUZA, V. F.; MACEDO, R. S. **Cultivo da Castanha-do-brasil em Rondônia**. Sistemas de Produção, 7. Jun./2005. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Castanha/CultivodaCastanhadoBrasilRO/autores.htm>> acesso em: out. 2011.

LORENZI, G. M. A. C. **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. -Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. 2006. 156p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MALOSSO, M. G. **Micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro***. 101p. 2007. Tese (Doutorado em Biotecnologia). UFAM – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2007.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia Trichotoma* (Vellozo) Arrabida Ex Steudel). Rede de Revistas Científicas da América Latina y el Caribe, España y Portugal. **Ciência Florestal**, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil v.11, n.2. p.93-101. 2001.

MARGULIS, S. **Causas do Desmatamento da Amazônia Brasileira** - 1ª edição - Brasília –100p. Estação Gráfica. Banco Mundial, 2003.

MAUÉS, M. M. Reproductive phenology and pollination of the brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* HUMB. & BONPL. Lecythidaceae) in eastern Amazonia. In: Kevan P & Imperatriz Fonseca VL (eds) - Pollinating Bees - **The Conservation Link Between Agriculture and Nature** - Ministry of Environment / Brasília, p.245-254, 2002.

MODESTO, Z. M. M.; SIQUEIRA, N. J. B. **Botânica – CEB – Currículo de Estudos de Biologia**. Editora Pedagógica e Universitária Ltda. São Paulo. 1981.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; FILHO, J. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.1, n.2, p.39-44, 2007.

MOREL, G.; MARTIN, C. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. **Comptes Rendus des Sèances de l'Academie des Sciences**, v.235, p.1324-1325, 1952.

MOREL, G. Producing vírus-free cymbidiums. **American Orchid Society Bulletin**, v.29, p.495-497, 1960.

MÜLLER, C.H.; FREIRE, F. das C.O. Influência de fungicidas na conservação e na germinação de amêndoas de castanha-do-brasil. Belém: Embrapa-CPATU. 9p. (Embrapa-CPATU. **Comunicado Técnico**, 26). 1979.

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

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

ODA, M. L.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; SILVA, G. L. Avaliação da fitotoxicidade de fungicidas e germicida na propagação *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orquidaceae) para o controle de microrganismos. **Ciencias Agrárias**, Londrina, v.24, n.2, p. 273-276, 2003.

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

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p.1035-1043, 2003.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1273-1279, 2003.

REBELLO, F. K.; HOMMA A. K. O. Uso da terra na Amazônia: uma proposta para reduzir desmatamentos e queimadas. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, Belém, v.1, n.1, 2005.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, (Nota Científica), Porto Alegre, v.5, n.2, p.498-500, 2007.

RESCAROLLI, C.L.S.; ZAFFARI, G.R. Produção de mudas de *Etlíngera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, p.190-195, 2009.

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

ROCHA, H. S.; SILVA, C. R. R.; ARAUJO, A. G.; SILVA, A. B. Propagação *in vitro* de bananeira ‘prata anã (AAB)’: intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, vol.3, n.1, p.10-16, 2007.

RODARTE, A. T. A.; SILVA, F. O.; VIANA, B. F. A flora melitófila de uma área de dunas com vegetação de caatinga, Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasileira** v.22, n.2. p.301-312. 2008.

RODRIGUES, F.R.; ALMEIDA, W.A.B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.3, p.333-340, 2010.

SALOMÃO, R. P.; ROSA, N. A.; CASTILHO, A.; MORAIS, K. A. C. Castanheira-do-brasil recuperando áreas degradadas e provendo alimento e renda para comunidades da Amazônia Setentrional. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. **Ciências Naturais**, Belém, v.1, n.2, p. 65-78, 2006.

SALVARO, L. M. S. **Reguladores vegetais e poliaminas na organogênese *in vitro* de *Piper hispidinervium* Candolle de candolle: análises biométricas e bioquímicas**. 108p. 2009. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências. Botucatu. 2009

SANCHEZ, J.S. 1973. Explotación y comercialización de la castaña em Madre de Dios. Ministério da Agricultura, Dirección General de Forestal y Caza, Informe n. 30. Lima, Peru. In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. (Eds) **Biodiversidade Amazônica – exemplos e estratégias de utilização**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 1ª edição. Manaus, 1999.

SANTOS, I.; SALEMA, R. Penicillins and activity of nitrogen metabolism enzymes in plant tissue culture. **Plant Science**, Calcutta, v. 59, p.119-125, 1989.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., Cultiva Rubi. **Ciência Agrotecnica**, Lavras. v.27, n.3, p.571-577, 2003.

SANTOS, S. R. M.; MIRANDA, I. S.; TOURINHO, M. M. Análise florística e estrutural de sistemas agroflorestais das várzeas do rio Juba, Cametá, Pará. **Acta Amazonica**, vol. 34 n.2 p.251-263. 2004.

SANTOS, M. R. A. Cultura de Tecidos Vegetais em Rondônia. Grupo Cultivar de Publicações. **Separata**, Biblioteca da Embrapa Rondônia. Julho, 2008.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Revista Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.4, p. 833-840, 2000.

SHANLEY, P.; SERRA, M.; MEDINA, G. (eds). **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. 2ª edição revista e ampliada. Cifor. Embrapa Informação Tecnológica. 2010. 316p.

SILVA, M.J.G.; SARAIVA, F.A.M.; ARAUJO, M.L.P. Aspectos climáticos de Porto Velho – Rondônia. Congresso Brasileiro de Meteorologia - cbmet. **Anais eletrônicos...** Edição XIII - Fortaleza – 2004.

SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q.; RODRIGUES, T. M.; MARQUES, S. V.; MARQUES, R.V.; PASQUAL, M. Diferentes reguladores de crescimento na indução de calos e pró-embriões em anteras de cafeeiro. **Biosciencia Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 19-27, 2009.

SOARES, J. E. C.; LEEUWEN, J. van; GOMES, J. B. M. O desenvolvimento da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em plantios agroflorestais no município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM. 2004.

SOUZA, I. F. **Cadeia produtiva de castanha-do-brasil ((*Bertholletia excelsa* HUMB. & BONPL. Lecythidaceae) no estado de Mato Grosso**. 141p. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Universidade Federal de Goiás. 2006.

SOUZA, K. C. A.; ABREU, H. S. Biotecnologia aplicada ao estudo da lignificação. **Floresta e Ambiente**. v.14, n.1, p. 93 - 109, 2007.

TAVARES, E. D.; SIQUEIRA, E. R.; SILVA, M. A. S. Agricultura e uso sustentável dos recursos naturais. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (Eds). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa, v. 2, p. 23-62, 2008.

THUROW, L. B.; BANDEIRA, J. M.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A.; BIANCHI, V. J. Desenvolvimento de um protocolo de regeneração *in vitro* de explantes foliares de ameixeira cv. ‘América’. XVIII CIC – XI ENPOS – 1ª Amostra Científica. **Anais eletrônico...** Pelotas – RS. 2009.

TONINI, H.; ARCO-VERDE, M. F.; SÁ, S. P. P. Dendrometria de espécies nativas em plantios homogêneos no Estado de Roraima - Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl), Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), Ipê-roxo (*Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb) e Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Acta Amazonica**, v.35, n.3, 2005.

TONINI, H.; KAMINSKI, P. E.; COSTA, P. Relationship of Brazil-nut seed yield to crown morphometric characteristics and competition indexes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.43 n.11. nov. 2008.

TORMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Editora da UFRGS. 1ª edição. Porto Alegre, 183p, 2005.

TORRES, A. L; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.).

**Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília, DF: Embrapa, v. 1, p. 11-20. 1998.

USDA. 1975. Composition of Foods. USDA Agriculture Handbook # 8. In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. (Eds) **Biodiversidade Amazônica – exemplos e estratégias de utilização.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 1ª edição. Manaus, 1999.

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.33, n.6, p.987-996, 2009.