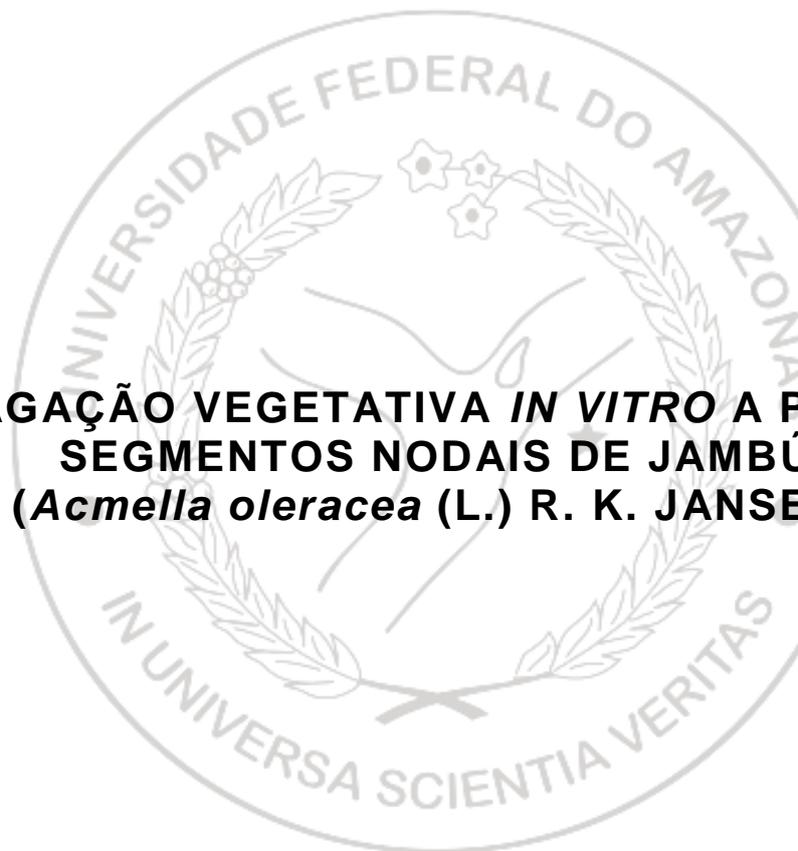


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
E SUSTENTABILIDADE NA AMAZÔNIA**

The seal of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a bird, possibly a toucan, with its wings spread. The bird is surrounded by a laurel wreath. Above the bird are three stars. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written in a circle around the top, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written around the bottom. The seal is rendered in a light gray color.

**PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* A PARTIR DE
SEGMENTOS NODAIS DE JAMBÚ
(*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN)**

TATIANA DA SILVA CALDERARO

**MANAUS
2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRICULTURA E SUSTENTABILIDADE NA AMAZÔNIA

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* A PARTIR DE
SEGMENTOS NODAIS DE JAMBÚ
(*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN)

TATIANA DA SILVA CALDERARO

MANAUS
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E
SUSTENTABILIDADE NA AMAZÔNIA

TATIANA DA SILVA CALDERARO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* A PARTIR DE
SEGMENTOS NODAIS DE JAMBÚ
(*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Agricultura e Sustentabilidade na
Amazônia parte dos requisitos para
obtenção de Título de Mestre em
Agricultura e Sustentabilidade na
Amazônia com Área de Concentração
em Plantas Nativas e Potenciais
Usos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao
Co-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ernesto Oliveira Serra Pinto

MANAUS
2008

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Calderaro, Tatiana da Silva

C146p Propagação vegetativa *in vitro* a partir de segmentos nodais de jambú (*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN) / Tatiana da Silva Calderaro. - Manaus: UFAM, 2008.
54 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao

Co-orientador: Prof. Dr. Ernesto de Oliveira Serra Pinto

1. *Acmella oleracea* 2. Plantas medicinais 3. Propagação vegetal - jambú I. Nagao, Eduardo Ossamu II. Pinto, Ernesto de Oliveira Serra III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 631.53:633.88(043.3)

TATIANA DA SILVA CALDERARO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VITRO* A PARTIR DE
SEGMENTOS NODAIS DE JAMBÚ
(*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção de Título de Mestre em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia com Área de Concentração em Plantas Nativas e Potenciais Usos.

Aprovado em 29 de Novembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Ernesto Oliveira Serra Pinto, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Paula Cristina da Silva Ângelo, Membro
Embrapa Amazônia Ocidental

Dedico

*Primeiramente a Deus,
à minha mãe e ao meu pai,
como também aos meus
irmãos e familiares pelo
total apoio dado em todos
os momentos.*

Ofereço

*Ao meu esposo e amigo Daniel
Azevedo e as minhas duas princesas
Ana e Amanda, com todo o amor da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ele não existiríamos e por tudo que Ele faz de bom em minha vida.

Aos meus familiares, que sempre me ajudaram fazendo sacrifícios para que eu pudesse terminar este trabalho e por compreender minha distância e mesmo assim sempre me apoiar.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por oferecer o Programa e formar profissionais cada vez mais capacitados para exercer suas funções.

Ao Coordenador do curso Dr. José Ferreira da Silva, pelo empenho em cada vez mais melhorar o curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), por me conceder a bolsa de estudos.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Eduardo Ossamu Nagao, pelos conselhos e ensinamentos concedidos constantemente durante a execução deste projeto.

Ao meu Co-Orientador Professor Dr. Ernesto Oliveira Serra Pinto pelas sugestões muito úteis oferecidas.

À Professora Eva Maria Atrock, que sempre se mostrou disponível para qualquer ajuda.

Aos professores que fazem parte do quadro do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos: Márcia, Fred, Susan, Iedo e Aldi pelo ótimo ambiente de amizade e, em especial, à minha grande amiga Sônia Araújo pela força, pois sem ela nunca teria conseguido concluir este trabalho.

Ao Técnico do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal, Sr. Waldemir de Melo, pelas dúvidas esclarecidas, além da ajuda em todos os experimentos feitos neste projeto.

Aos amigos: Lucifrancy, Helder, Silfran, Liliane, Cristóvão, Jucélia, João e Antônia, pelo companheirismo e pelos bons momentos que passamos juntos durante a realização do curso.

Aos membros da banca julgadora, pelas sugestões e críticas para a melhoria da qualidade desta dissertação.

Enfim a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram desde o início até agora para a realização deste trabalho.

AGRADEÇO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Descrição Botânica e Habitat do jambú (<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen)	4
3.1.1. Classificação Taxonômica	4
3.1.2. Sinonímias	4
3.1.3. Nomes populares	4
3.1.4. Origem e Distribuição Geográfica	5
3.1.5. Características Morfológicas	6
3.1.6. Características edafoclimáticas	7
3.1.7. A planta e seu cultivo	8
3.1.7.1. Métodos de Propagação	8
3.1.7.2. Práticas culturais e Produção	8
3.1.8. Composição e Utilização	9
3.1.8.1. Composição química e Valor nutricional	9
3.1.8.2. Formas de Utilização	10
3.2. Micropropagação	11
3.3. Meios de Cultivo	13
3.4. Bioreguladores	14
3.5. Aclimatização	15
3.5.1. Substratos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	18

4.1. Propagação vegetativa <i>in vitro</i> de jambú (<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN)	18
4.1.1. Instalação e condução do experimento	18
4.1.2. Experimento 1 – Estabelecimento de cultura e indução à proliferação de brotos através do uso de bioreguladores	20
4.1.2.1. Delineamento experimental e tratamentos	20
4.1.3. Experimento 2 - Efeitos de diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico no desenvolvimento das plantas	20
4.1.3.1. Delineamento experimental e tratamentos	21
4.1.4. Características avaliadas	21
4.1.5. Análise estatística	21
4.2. Aclimatização de plantas micropropagadas de jambú (<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN)	22
4.2.1. Experimento 3- Utilização de diferentes substratos na aclimatização das plântulas micropropagadas	22
4.2.1.1. Instalação e condução do experimento	22
4.2.1.2. Delineamento experimental e tratamentos	23
4.2.1.3. Características avaliadas	23
4.2.1.4. Análise estatística	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Experimento 1	24
5.2. Experimento 2	32
5.3. Experimento 3	40
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de Distribuição Geográfica Mundial de jambú.....5
- Figura 2.** Efeito de diferentes combinações de BAP e AIA no comprimento médio de broto (cm) de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 200829
- Figura 3.** Efeito das diferentes combinações de BAP e AIA no número médio de brotos/explante de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 200830
- Figura 4.** Efeito das diferentes combinações de BAP e AIA no número médio de brotos/explante maiores de 1 cm de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008..31
- Figura 5.** Efeito das diferentes combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico no comprimento médio de broto (cm) de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008.....37
- Figura 6.** Efeito das diferentes combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico no número médio de broto/explante de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008.....38
- Figura 7.** Efeito das diferentes combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico no número médio de broto/explante maiores de 1 cm de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 200839

Figura 8. Sobrevivência (1A) e Altura (1B) de plantas de jambú em diferentes substratos. UFAM, Manaus/AM, 2008	44
Figura 9. Peso de matéria fresca (2A) e matéria seca (2B) de plantas de jambú em diferentes substratos. UFAM, Manaus/AM, 2008.....	45
Figura 10. Crescimento de plântulas de jambú aclimatizadas em casa de vegetação em diferentes substratos. (a) plantmax®, (b) vermiculita, (c) serragem. UFAM, Manaus/AM, 2008.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valor nutritivo de 100g de folhas de jambú	9
Tabela 2. Composição do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e suas respectivas concentrações	19
Tabela 3. Substratos utilizados na aclimatização do jambú (<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN). UFAM, Manaus – AM, 2008.....	22
Tabela 4. Resumo das análises de variância para comprimento médio de brotos (CB), número médio de brotos/explante (NB) e número médio de brotos/explante maiores de 1 cm de comprimento (NB>1cm), em diferentes concentrações AIA e BAP. UFAM, Manaus/AM, 2008.....	24
Tabela 5. Médias do comprimento médio de brotos (cm), obtidos <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de AIA e BAP. UFAM, Manaus/AM, 2008.....	26
Tabela 6. Médias do número médio de brotos/explante, obtidos <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de AIA e BAP. UFAM, Manaus/AM, 2008.....	27
Tabela 7. Médias do número médio de brotos/explante maiores de 1 cm, obtidos <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de AIA e BAP. UFAM, Manaus/AM, 2008.....	28
Tabela 8. Resumo das análises de variância para comprimento médio de brotos (CB), número médio de brotos/explante (NB) e número médio de brotos/explante maiores de 1 cm de comprimento (NB>1cm), em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico. UFAM, Manaus/AM, 2008.....	32

Tabela 9. Médias do comprimento médio de brotos (cm), obtidos <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico. UFAM, Manaus/AM, 2008	33
Tabela 10. Médias do número médio de brotos/explante, obtidos <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico. UFAM, Manaus/AM, 2008	35
Tabela 11. Médias do número médio de brotos/explante maiores de 1 cm/explante, obtidos <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico. UFAM, Manaus/AM, 2008	36
Tabela 12. Resumo das análises de variância para sobrevivência (S), altura da planta (AP), peso matéria fresca (PMF) e peso matéria seca (PMS) de plântulas de jambú aclimatizadas em diferentes tipos de substrato. UFAM, Manaus/AM, 2008	40
Tabela 13. Médias das variáveis, sobrevivência (S), altura da planta (AP), peso matéria fresca (PMF) e peso matéria seca (PMS) de plântulas de jambú aclimatizadas em diferentes tipos de substrato. UFAM, Manaus/AM, 2008	43

RESUMO

O jambú é uma planta medicinal, cultivada principalmente no Norte do País, mais precisamente no Pará. O extrato de suas folhas possui propriedades anestésicas sendo utilizada no tratamento de males da boca e da garganta, bem como para dor de dente. Também possui atividade antifúngica, antibacteriana, antiinflamatória, analgésica e larvicida. Tal planta ainda é muito utilizada como condimento na culinária da Região Amazônica, principalmente no preparo do famoso “tacacá”. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer diferentes metodologias para o cultivo *in vitro* de segmentos nodais de jambú. Foram testadas diferentes concentrações de bioreguladores, dentre eles o AIA (0; 0,5; 1,0; 3,0 mg.L⁻¹) e BAP (0; 0,5; 1,5; 2,5; 5,0 mg.L⁻¹), diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15; 30; 45 g.L⁻¹) e dosagens de nitrogênio inorgânico (0; 5; 10; 20 e 40 ml.L⁻¹) e por último foi feita a aclimatização das plantas micropropagadas, testando diferentes substratos (plantmax®, vermiculita e serragem). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições de cada tratamento. As plantas foram avaliadas, nos dois primeiros experimentos, aos 45 dias e, no último, aos 60 dias. Constatou-se que a adição de bioreguladores influenciou o desenvolvimento e multiplicação dos brotos, sendo os melhores resultados obtidos entre 0,5 mg.L⁻¹ de AIA combinado com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP. Modificações tanto nas concentrações de sacarose, como nas de nitrogênio inorgânico influenciaram o crescimento do jambú cultivado *in vitro*. As concentrações de sacarose de 7,5 e 30 g.L⁻¹, juntamente com as dosagens de nitrogênio inorgânico de 10 a 20 ml.L⁻¹, proporcionaram os melhores resultados para todas as características avaliadas. O substrato plantmax®, assim como a vermiculita e a serragem, não diferiram entre si, sendo apropriados para a aclimatização de plântulas de jambú.

Palavras-chave: micropropagação, jambú, bioreguladores, sacarose, nitrogênio inorgânico, aclimatização

ABSTRACT

The jambú is a medicinal plant, cultivated mainly in the North of the Country, more necessarily in Pará. The extract of its leaves possess anesthetic properties being used in the treatment of sores of the mouth and the throat, as well as for tooth ache. Also it possess antifungal, antibacterial, antiinflammatory, analgesic and larvicidal activity. Such plant still is very used as condiment in the cookery of the Amazon Region, mainly in the preparation of the celebrity “tacacá”. The present work had as objective to establish different methodologies for the culture *in vitro* of nodal segments of jambú. Different concentrations of bioregulators had been tested, amongst them AIA (0; 0,5; 1,0; 3,0 mg.L⁻¹) and BAP (0; 0,5; 1,5; 2,5; 5,0 mg.L⁻¹), different concentrations of sucrose (0; 7,5; 15; 30; 45 g.L⁻¹) and inorganic nitrogen (0; 5; 10; 20 and 40 mg.L⁻¹) and finally was made the acclimatization of the micropropagated plants, testing different substrates (plantmax®, vermiculit and sawdust). The experimental delineation was entirely randomized, with 20 repetitions of each treatment. The plants had been evaluated, in the two first experiments, to the 45 days and, in the last one, to the 60 days. One evidenced that the addition of bioregulators influenced the development and multiplication of the shoots, being the best ones resulted gotten between 0,5 mg.L⁻¹ of AIA combined with 1,5 mg.L⁻¹ of BAP. Modifications in such a way in the concentrations of sucrose, as in the ones of inorganic nitrogen had influenced the growth of the cultivated jambú *in vitro*. The concentrations of sucrose of 7,5 and 30 g.L⁻¹, together with the dosages of the inorganic nitrogen of 10 and 20 mg.L⁻¹, had provided the best ones resulted for all the evaluated characteristics. The substrate plantmax®, as well as the vermiculit and the sawdust, had not differed between itself, being appropriate for the acclimatization of jambú seedlings.

Key words: micropropagated, jambú, bioregulators, sucrose, inorganic nitrogen, acclimatization

1. INTRODUÇÃO

A Região Amazônica possui a maior diversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em varias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

Nos últimos vinte anos o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido em torno de 8% anualmente. Em um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas medicinais devem ser incentivadas (DI STASI, 1996).

Outro fator relevante em plantas medicinais é a prática de extrativismo que abastece o mercado popular de plantas. A coleta indiscriminada tem levado à extinção de diversas populações naturais (MARTINS, 1996).

O jambú é uma espécie medicinal cultivada no norte do País, onde suas folhas são utilizadas no tratamento de males da boca e da garganta, bem como anestésico para dor-de-dente, e o chá das folhas é utilizado contra anemia, escorbuto, desdizia, estimulante da atividade gástrica e no combate à tuberculose (LORENZI; MATOS, 2002). Além disso, esta espécie é frequentemente utilizada como importante componente de pratos típicos da culinária amazônica por ser uma fonte rica em cálcio, fósforo e ferro (REVILLA, 2001).

Essas plantas são coletadas em seu habitat natural e na maioria das vezes o número de indivíduos em determinada localidade não é suficiente para atender uma demanda constante em larga escala. Para resolver isso, apenas o cultivo sistematizado pode garantir um padrão de produção.

Nesses casos, para a manutenção de programas de cultivo economicamente viáveis, torna-se necessária, a renovação das plantas quando se deseja manter a alta produtividade dos constituintes ativos,

uma vez que o declínio no teor de princípios ativos ou de óleos essenciais em plantas medicinais é comum quando estas são cultivadas por longos períodos e submetidas a vários cortes.

A micropropagação é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos vegetal e tem sido utilizada para multiplicar centenas de espécies medicinais. Essa técnica é usada rotineiramente para multiplicar genótipos selecionados, ou para substituir acessos que tenham adquirido caracteres indesejáveis como baixa produtividade e susceptibilidade à doenças.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer diferentes metodologias para o cultivo *in vitro* de jambú (*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN).

2.2. Objetivos Específicos

- Testar o efeito de diferentes concentrações de bioreguladores, dentre eles auxina (AIA) e citocinina (BAP) para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *A. oleracea* (L.);
- Verificar o efeito de diferentes concentrações de sacarose e de nitrogênio inorgânico da fórmula do meio de cultura Murashige & Skoog (MS) na propagação *in vitro* de *A. oleracea* (L.);
- Testar o substrato mais propício ao favorecimento da aclimatização de *A. oleracea* (L.);

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Descrição Botânica e Habitat do jambú (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen)

3.1.1. Classificação Taxonômica

Filo: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Asterales

Família: Asteraceae

Gênero: *Acmella*

Espécie: *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen

3.1.2. Sinonímias

Spilanthes oleracea L., *Cotula pyretharia* L., *Pyrethrum spilanthus* Medik, *Spilanthes acmella* var. *oleracea* (L.) C. B. Clark ex Hook F., *Spilanthes fusca* Mart (LORENZI; MATOS, 2002).

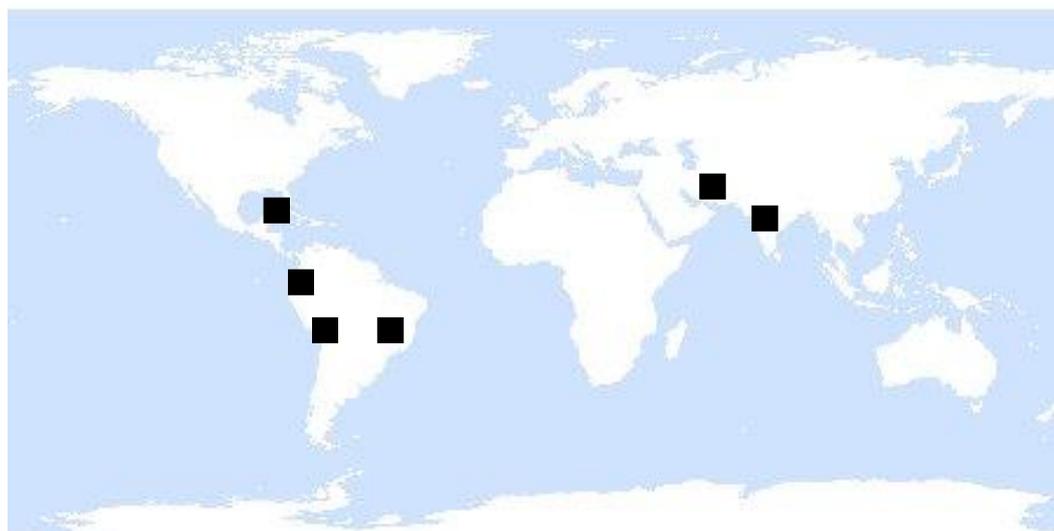
Bidens fervida Lan, *Bidens fusca* Lan, *Isocarpa pyrethraria* (L.) Cass, *Spilanthes radicans* Schrad ex D.C., *Spilanthes oleracea* β *fusca* (Lam.) D.C. (HIND; BIGGS, 2003).

3.1.3. Nomes populares

Essa espécie é conhecida principalmente como jambú, entretanto vários outros nomes são usados, tais como agrião-do-pará, agrião-bravo, botão-de-ouro, jambuaçú, abecedária, agrião-do-brasil, mastruço e agrião-do-norte (DI STASI, 2002), jaguaçú, erva-maluca, jagurama (LORENZI; MATOS, 2002).

3.1.4. Origem e Distribuição Geográfica

Nativo da Amazônia Oriental, sendo cultivado em grande escala no Estado do Pará, Brasil, podendo ser considerado como um provável centro de diversidade (VILLACHICA, 1998).



Provided by Missouri Botanical Garden

Figura 1: Mapa de distribuição geográfica mundial de jambú
(*A. oleracea* L.).

Fonte: www.mobot.org

Sua distribuição se dá principalmente em Regiões Tropicais, onde maior parte de suas populações são comumente encontradas na América do Sul, principalmente no Brasil, Peru, Equador e em países do Sul da Ásia como Índia e Nepal, além do Leste Caribenho, no conjunto de Ilhas Windward (Figura 1).

3.1.5. Características Morfológicas

É uma espécie da Amazônia, principalmente da região do Estado do Pará e se multiplica tanto por sementes como por hastes enraizadas (REVILLA, 2001). É uma planta herbácea, perene, de 20-40 cm de altura, semi-reta, quase rasteira, com caule cilíndrico, carnoso e de ramos decumbentes, geralmente sem raízes nos nós. A raiz principal é pivotante, com abundantes ramificações laterais (LORENZI; MATOS, 2002).

As folhas são simples, opostas, membranáceas, pecioladas, pecíolos de 20-60 mm de comprimento, achatados, com sulcos sobre a superfície, ligeiramente alados e pouco pilosos. O limbo é geralmente oval, com 53-106 mm de comprimento e 40-79 mm de largura, apresenta base truncada, atenuada na parte superior da folha e pêlos esparsos sobre ambas as superfícies, principalmente sobre a nervura central da folha. As folhas possuem ainda glândulas pilóricas, unisseriadas, de bases multicelulares, levemente protuberantes, marrons, com extremidades unicelulares longas, delgadas e brancas. A borda do limbo é dentada e o ápice é agudo. Os folíolos são trisseriados, imbricados, verdes, lanceolados, com ápices de cor púrpura a vermelho, bordas completas, ciliadas e de ápices agudos. Apresentam de 5-6 folíolos externos com 5,8-7,3 mm de comprimento e 5-6 folíolos internos com 5,5-6,5 mm de comprimento. Os pêlos são translúcidos, unisseriados, curtos, de base pálea em ângulo reto, pouco inclinado e ápice agudo (HIND; BIGGS, 2003).

As inflorescências são isoladas, com capítulos globosos axilares e terminais pedunculados. Os pedúnculos apresentam de 3,5-12,5 mm de comprimento, são abracteolados e ocos, de glabros a esparsamente pilosos e os pelos são aglandulados. Os capítulos apresentam de 10,5-23,5 mm de altura e 11-17 mm de diâmetro, são pedunculados, homogêneos e discóides (HIND; BIGGS, 2003).

As flores são pequenas, amareladas, com áreas púrpuras distintas na pálea do cálice, bem visível em capítulos imaturos, dispostas em capítulos globosos terminais que medem cerca de 1 cm

de diâmetro. São hermafroditas, numerosas (400 a 620) e férteis. O tubo da corola mede entre 2,7-3,3 mm de comprimento, é verde, glabro, reduzido em um tubo na base. O tubo mede de 0,5-0,7 mm de comprimento e 0,2-0,4 mm de diâmetro, tem abertura inflada de 2,2-2,6 mm de comprimento e 0,5-1 mm de diâmetro. Os lóbulos da corola (4-5) medem de 0,5-0,6 mm de comprimento, são amarelos e de interior papiloso. As anteras são cilíndricas e localizadas dentro da abertura da corola (HIND; BIGGS, 2003).

O fruto é um aquênio pequeno, com 2-2,5 mm de comprimento e 0,9-1,1 mm de largura, com pericarpo cinza-escuro, quase preto, parcialmente envolvido por partes membranáceas. Está resumido a duas nervuras marginais, que são longitudinalmente alongadas, ciliadas, completas, de faces setulíferas, com pares de sétulas descentralizadas e não divididas em ápices (HIND; BIGGS, 2003).

3.1.6. Características edafoclimáticas

Desenvolve-se bem em zonas com clima quente e úmido. Nos arredores da cidade de Belém, Brasil, onde o jambú é cultivado mais intensamente, com temperatura média anual de 25,9 °C e precipitação pluvial de 2.761 mm/ano, com evapotranspiração potencial de 1.455 mm, com umidade relativa do ar de 86% e com 2.389 horas/ano de luz solar. Nessa região, o cultivo pode ser estabelecido em qualquer época do ano. Com solos argilo-arenosos e ricos em matéria orgânica, assim como em solos de terras altas não inundáveis, são adequados para um bom desenvolvimento da espécie. Toleram solos ácidos (VILACHICA, 1998).

3.1.7. A planta e seu Cultivo

3.1.7.1. Métodos de Propagação

Pode ser propagado por sementes ou por estacas de ramas. A propagação por sementes é o método mais empregado. A estrutura utilizada como semente corresponde a um aquênio, que é de um tamanho pequeno e de coloração cinza quase preto. O peso de 1.000 sementes é de aproximadamente 0,2 g. A germinação é do tipo epígea. Se realiza rápida e uniformemente quando as sementes são sombreadas em ambientes com temperatura entre 25 e 30° C. Se inicia quatro dias após o semeio e se estabiliza no oitavo dia, quando a germinação alcança um valor superior a 90% (VILLACHICA, 1998).

3.1.7.2. Práticas culturais e produção

O cultivo pode ser sombreado em todos os meses do ano, mas tem maior produtividade com uma folhagem de maior qualidade quando se semeia no final do período chuvoso. As chuvas intensas prejudicam o desempenho das plantas e causam prejuízos ao produto por provocar o contato das ramas e folhas com o solo. As sementeiras desta hortaliça são estabelecidas normalmente em canteiros com 20 cm de altura, um espaçamento de 20 x 25 cm, podendo se efetuar o semeio direto nos canteiros, ou em bandejas para um posterior repique e transplantá-lo definitivamente para o campo. Quando a propagação se dá por estacas utilizam-se segmentos de ramas. O enraizamento se produz de 10 a 15 dias depois de colocadas no substrato. As estacas são colocadas para enraizar diretamente nos canteiros. Em ambos os casos é necessário que se proteja as estacas da radiação solar direta, podendo-se utilizar cobertura com folhas de palmeiras (VILLACHICA, 1998).

3.1.8. Composição e Utilização

3.1.8.1. Composição química e valor nutricional

Estudos fitoquímicos revelam a presença do princípio ativo espilantol-isobutilamina, substância responsável pela ação anestésica local, possui 0,7% de óleo essencial e também flavonóides em sua constituição (LORENZI; MATOS, 2002), além de saponinas, espilantina, afinina, filosterina, colina e triterpenóides (DI STASI, 2002).

Segundo Vulpi (2007), que analisando o óleo essencial da espécie, constatou que tanto no caule, como nas folhas e inflorescências, o espilantol foi detectado em todos os órgãos em estudo, indicando a importância comercial da planta na produção da substância.

Como toda a hortaliça de folhagem possui baixo valor energético. É um alimento pobre em vitaminas (B1 e B2) e uma quantidade razoável de vitamina C (Tabela 1).

Tabela 1: Valor nutritivo de 100 g de folhas de jambú.

Componente	Unidade	Jambú
Água	g	89,0
Valor energético	cal	32,0
Proteínas	g	1,9
Lipídeos	g	0,3
Carboidratos	g	7,2
Fibra	g	1,3
Cálcio	mg	162,0
Fósforo	mg	41,0
Ferro	mg	4,0
Vitamina B1	mg	0,03
Vitamina B2	mg	0,21
Vitamina C	mg	20,0

Fonte: Villachica (1998).

3.1.8.2. Formas de utilização

É utilizada principalmente como condimento na culinária da Região Amazônica, principalmente no preparo do famoso “tacacá”, iguaria esta preparada com uma mistura bem adocicada de tucupi, acrescentado de goma (todos os dois feitos de mandioca), e após isso são adicionados folhas e ramos de jambú e camarão (VILLACHICA, 1998).

Na medicina popular, são utilizadas todas as partes da planta (folhas, ramos, inflorescências e frutos). Destas partes, são feitas infusões para o tratamento de males da boca e garganta, tuberculose, litíase pulmonar, estimulante do apetite, dispepsia, malária, antigripal, antiespasmódica, antiasmática, antianêmica, antiescorbútica, béquica dentre outros (LORENZI; MATOS, 2002).

Di Stasi (2002) relata que o chá ou xarope das folhas é considerado útil contra tosses e problemas hepáticos. O mesmo misturado com folhas de amor-crescido e graviola, é utilizado contra conjuntivite e o preparado com folhas de arruda é indicado contra hemorróidas e helmintoses.

Também possui atividade antifúngica (RANI; MAURTI, 2006), antibacteriana (PRESSINI et al, 2003), antiinflamatória, analgésica (CHAKRABORTY et al, 2004) e larvicida (PANDEY, 2007).

Ensaio farmacológicos feitos em cobaias constataram que o extrato causa arritmia cardíaca. Quando o extrato hexânico é injetado no tecido intraperitônioal induz convulsões e tal resposta deu início a novos estudos na medicina sobre o tratamento de epilepsia (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie é promissora também na cosmética, pois estudos têm comprovado que o óleo essencial tem sido eficaz como anti-sinais da pele, que atua descontraindo as micro-tensões, agindo como “anti-rugas” (ARMOND, 2007).

3.2 Micropropagação

Micropropagação é a propagação vegetativa *in vitro*, e recebe este nome devido ao tamanho dos propágulos utilizados. Esta é a aplicação mais prática da cultura de tecidos (FEET, 2005).

Segundo Engelmann (1991), a clonagem *in vitro* é particularmente útil para a conservação das espécies ameaçadas, para a propagação de espécies recalcitrantes, reprodução de espécies que se propagam vegetativamente e/ou de ciclo de vida longo.

A aplicação da micropropagação destaca-se nos trabalhos de hibridação e desenvolvimento de novos cultivares, na multiplicação segura de cultivares desejáveis, na propagação rápida com alto coeficiente de multiplicação e conservação de patrimônio genético de plantas ameaçadas de extinção (PEREIRA et al., 2000).

Um dos quesitos para a aplicação bem-sucedida da tecnologia de propagação de plantas para a agricultura é a capacidade de regenerar mudas elite. Durante a década passada, a demanda por estas plantas nativas em larga escala industrial motivou a busca de novas técnicas de micropropagação, que foram desenvolvidas para suprir as exigências do constante crescimento comercial. Assim, a realização da multiplicação *in vitro* de um grande número de clones de plantas com características melhoradas ganhou importância (BAIS et al., 2000).

Dentre os explantes que podem ser utilizados, ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os mais indicados na propagação clonal *in vitro*, pois eles possuem determinação para o crescimento vegetativo, desenvolvendo plantas sem a passagem pela fase de calo, quando em meio de cultivo adequado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A micropropagação pode ser realizada por meio da cultura de meristemas, da germinação de sementes *in vitro*, da proliferação de gemas apicais, axilares e adventícias. Além disto, também é possível produzir plântulas *in vitro* a partir da regeneração de calos e por embriogênese somática (KRIKORIAN, 1982).

Por ser um sistema com condições ambiental controlada e asséptica, a técnica de micropropagação tem-se mostrado de enorme importância prática, devido à alta taxa de multiplicação, a redução do espaço para a conservação e a eliminação de patógenos. Além disso, permite a fácil troca de acessos entre grupos que visam à pesquisa ou tem interesse comercial (ENGELMANN, 1991).

Segundo Torres et al., (1998), na década de setenta, quando a micropropagação ganhou grande impulso, Murashige (1974), apresentou o conceito de estádios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. Esse esquema padrão para sistemas de micropropagação divide-se em: estágio I, quando é feita a seleção de explantes, desinfecção e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; estágio II, quando ocorre a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação e, estágio III, quando é feita a transferência das partes aéreas produzidas para o meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para substrato ou solo.

O sucesso da micropropagação depende não só de fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos) como, também, as condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida e do meio de cultura apropriado que permite a indução, a multiplicação e o crescimento das brotações adventícias (NAGAO et al., 1994).

Além de vários fatores como: estado fisiológico da planta matriz, coleta de explantes, esterilização dos meios de cultura, condições de incubação, manipulação de subculturas e uso de reguladores de crescimento, meio de cultura, entre outros (GONZÁLES et al., 2004).

Há grande dificuldade de se obter um tecido totalmente descontaminado nas etapas iniciais para algumas espécies, principalmente quando estas se encontram em condições naturais de campo. Nesse caso, pode ser necessária a aplicação de alguns pré-tratamentos com substâncias antimicrobianas na planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3.3. Meios de Cultivo

Os meios de cultura são constituídos geralmente por água, por macronutrientes, onde os minerais são incluídos nos meios na forma de sais inorgânicos, micronutrientes, carboidratos, vitaminas e mio-inositol (TORRES et al., 1998).

De acordo com Hartmann et al. (1997), vários compostos orgânicos são também adicionados ao meio de cultura para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células, complementando assim as substâncias biossintetizadas por elas.

Algumas alterações na composição do meio de cultura básico, com diluições, podem ser feitas para a otimização de protocolos de micropropagação (GAMBORG et al., 1968). Porém, para a grande maioria das plantas estudadas, somente os sais utilizados nos meios de cultura não são capazes de induzir certas respostas fisiológicas, necessitando assim da adição de reguladores de crescimento vegetal no meio de cultura.

As exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições "in vitro" variam de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta o que torna necessária a otimização dos meios de cultura (NAGAO et al., 1994).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como celulose, enfim, todos os componentes orgânicos necessários para o crescimento das células. A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sua concentração também é um fator importante para obter crescimento ótimo, dependendo do explante (TORRES et al., 1998).

Segundo Pasqual et al. (1997), o nitrogênio difere dos demais nutrientes porque depende da forma como é disponibilizado no meio de cultura, influencia sensivelmente tanto no crescimento como na morfogênese em culturas *in vitro*. Praticamente, todos os meios de cultura fornecem N disponível na forma de íons nitrato. Porém uma vez

dentro da célula, o nitrato de amônia (NH_4^+), quando fornecido sozinho ao meio, causa problemas de toxicidade. Por isso ele é usado de forma combinada com o nitrato (NO_3^-).

3.4. Bioreguladores

As plantas naturalmente possuem em sua composição substâncias químicas cuja função é regular processos metabólicos envolvidos no crescimento e desenvolvimento. Essas são ativas em concentrações muito baixas nos tecidos e são conhecidas como hormônios ou substâncias de crescimento (HAVEN et al., 1996).

Existem também substâncias sintéticas que, uma vez aplicadas a plantas inteiras ou a segmentos de tecidos vegetais, provocam atividades fisiológicas similares aos hormônios. A estas dá-se o nome de reguladores de crescimento ou fitorreguladores (DAVIS et al., 1998).

As citocininas apresentam um papel importante na regulação da divisão celular e interagem com auxinas no controle de muitos aspectos do crescimento e do desenvolvimento das plantas. A formação de raízes, parte aérea e calo em cultura de tecido são reguladas pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (FRANK; SCHMÜLLING, 1999).

Além disso, induzem a quebra da dominância apical e proliferação de gemas axilares. Dessas, a benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz na multiplicação de explantes e indução de gemas adventícias, além de ser mais barata do que outras citocininas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As auxinas são muito utilizadas na micropropagação para promover a formação e o crescimento de calos, de órgãos e de células em suspensão, bem como regular a morfogênese, especialmente quando associada com citocininas. Um adequado balanço entre auxinas e citocininas estabelece um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro* (PIERIK, 1990).

3.5. Aclimatização

A técnica da micropropagação geralmente se desenvolve em cinco etapas, as quais incluem preparação da planta matriz, isolamento, multiplicação, enraizamento e aclimatização (TORRES et al., 1998).

Um dos entraves desta técnica é o desenvolvimento de plantas capazes de sobreviver fora dos frascos de cultura. A maioria das plantas derivadas da cultura *in vitro* sofre desidratação nesta fase e isto é crucial durante os primeiros dias de aclimatização (MALDA, 1999 citado por POMPELLI; GUERRA, 2006).

A aclimatização consiste em retirar a plântula da condição *in vitro* e transferi-la para casa de vegetação, tendo por objetivo superar as dificuldades que as plântulas obtidas por cultura de tecido enfrentam quando são removidas do meio de cultivo. Esse processo é crítico, pois a plântula passa de um ambiente de baixa transpiração para outro que exige maior incremento, podendo ocorrer estresse hídrico, há passagem de um estado heterotrófico para outro autotrófico, a disponibilidade de sais é diferente e, finalmente, a planta sai de um estado asséptico para ficar sujeita ao ataque de microrganismos saprófitos e eventualmente patogênicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Confundi-se os conceitos aclimatação e aclimatização. Aclimatação é um termo que se refere ao processo no qual as plantas ou outros organismos vivos tornam-se ajustados a um novo clima ou situação, como resultado de um processo essencialmente natural enquanto que aclimatização é definida como a transferência de um organismo, especialmente uma planta para um novo ambiente, sendo todo o processo realizado. A aclimatação é um processo regulado pela natureza, enquanto que a aclimatização é um processo controlado pelo homem. (PREECE; SUTTER, 1991; TOMBOLATO et al., 1998; GEORGE, 1993 citado por ROCHA, 2007)

Este processo é necessário, pois plantas provenientes de cultura *in vitro* são sensíveis e tenras, pois não desenvolveram cutícula, e sua

parede celular não apresenta rigidez suficiente para se sustentar. As folhas são delgadas e suaves fotossinteticamente inativas, deixando a planta em franco heterotrofismo, os estômatos não operam eficientemente provocando assim estresse nas primeiras horas após sair dos tubos de ensaio (BRAINED; FUCCHIGAMI, 1981 citado por MARCELO et al., 2003).

A aclimatização constitui uma etapa fundamental na produção de plantas obtidas por cultura de tecidos, uma vez que as condições de cultura *in vitro* modificam características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando os processos fisiológicos normais (LUCAS et al., 2002). Segundo Fernandes; Corá (2001), a utilização de substratos no cultivo de plantas é uma técnica amplamente empregada na maioria dos países de horticultura avançada. Fachinello et al., (1995) citado por Neto et al., (2004), afirmam ainda que o mesmo apresenta várias vantagens, dentre elas a de exercer a função do solo, fornecendo à planta sustentação, nutrientes, água e oxigênio. Quando estes são usados na aclimatização, podem influenciar as respostas das plantas através de suas características químicas, físicas e biológicas.

3.5.1. Substratos

Um substrato é formado de três fases: a fase sólida, que garante manutenção mecânica do sistema radicular e sua estabilidade; a fase líquida, que garante o suprimento de água e nutrientes; a fase gasosa, que garante o transporte de oxigênio e gás carbônico entre as raízes e a atmosfera (LEMAIRE, 1995 citado por SALVADOR; MINAMI, 2001).

Os substratos exercem influência significativa na arquitetura do sistema radicular e nas associações biológicas com o meio, influenciando o estado nutricional das plantas e a translocação de água no sistema solo-planta-atmosfera. O substrato deve ser de baixa densidade e rico em nutrientes, ter composição química equilibrada e física uniforme, elevada CTC, alta capacidade de retenção de água e drenagem, boa coesão entre as partículas ou aderência junto às raízes

e ser preferencialmente estéril às plantas daninhas e com boa flora bacteriana (COUTINHO; CARVALHO, 1983).

Segundo Marcelo et al. (2003), a seleção do substrato é de fundamental importância no crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas, podendo influenciar diretamente no sucesso da aclimatização.

Os substratos podem ter diversas origens, ou seja, animal (esterco e húmus), vegetal (tortas, bagaços, xaxim e serragem, mineral (vermiculita, perlita e areia) e artificial (espuma fenólica e isopor). Entre as características desejáveis nos substratos pode-se citar baixo custo, disponibilidade, teor de nutrientes, capacidade de troca de cátions, esterilidade biológica, aeração, retenção de umidade e uniformidade (GONÇALVES, 1995).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em duas etapas. Na primeira, foi realizado o cultivo *in vitro* da espécie, com dois experimentos: indução a proliferação de brotos através do uso de bioreguladores e determinação da concentração de sacarose e dosagens de nitrogênio inorgânico no meio de cultura. Na segunda etapa, o último experimento, onde foi feita a aclimatização das plantas oriundas do cultivo *in vitro*.

4.1. Propagação vegetativa *in vitro* de jambú (*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN)

4.1.1. Instalação e condução do experimento

Os ensaios experimentais do cultivo *in vitro* de *Acmella oleracea* (L.) foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 25 °C (± 2 °C), 60% (± 5 %) de umidade relativa e 16 horas de fotoperíodo com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{E}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$, provenientes de duas lâmpadas fluorescentes brancas frias.

Todo o material utilizado nas operações foi previamente esterilizado e a inoculação foi efetuada assepticamente em câmara de fluxo laminar do tipo horizontal.

O meio de cultura utilizado nos ensaios foi o MS (elaborado por MURASHIGE; SKOOG, 1962), constituídos por sais na concentração relacionados na Tabela 2.

As soluções estoques (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos) constituintes do meio de cultura, foram preparadas e armazenadas a 4 °C. As soluções estoques dos

bioreguladores foram preparadas no mesmo dia de sua utilização e foram dissolvidas em KOH 1 N.

Como fonte de explantes foram utilizados segmentos nodais (1 cm de comprimento e sem folhas) de plantas de jambú cultivadas *in vitro*, com idade de aproximadamente 30 dias e no quarto subcultivo.

Em todos os experimentos, os meios de cultura, com pH ajustado para 5,7, foi adicionado 0,8% de ágar. Após fundido em microondas o meio foi distribuído em tubos de ensaio (25 mm e diâmetro, 150 mm de altura) com 20 ml de meio por tubo, e esterilizado em autoclave a 121° C e 1 atm de pressão durante 20 minutos.

Tabela 2: Composição do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e suas respectivas concentrações.

Componente	Fórmula	Concentração (mg.L ⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes		
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
Iodeto de potássio	KI	0,83
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
FeEDTA		
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Vitaminas		
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,5
Cloridrato de piridoxina	C ₆ H ₁₂ CINO ₂	0,5
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ CL ₂ N ₄ OS	0,5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	2,0
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,0
Outros		
Agar		8.000
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30.000

4.1.2. Experimento 1 - Estabelecimento de culturas e indução à proliferação de brotos através do uso de bioreguladores

Explantos já estabelecidos *in vitro*, foram repicados e transferidos para meio de cultura para indução à proliferação de brotos. Estes foram inoculados em tubos de ensaio com meio MS suplementado com diferentes combinações de bioreguladores: ácido-6-benzilaminopurina (BAP) e ácido-3-indolacético (AIA), respectivamente.

4.1.2.1. Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 4x5, com quatro concentrações de AIA (0,0; 0,5; 1,0 e 3,0 mg.L⁻¹) e cinco de BAP (0,0; 0,5; 1,5; 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹) totalizando 20 tratamentos, com 20 repetições por tratamento e 1 segmento nodal por tubo.

4.1.3. Experimento 2 – Efeitos de diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico no desenvolvimento das plantas

Os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio contendo meio MS modificados em relação a diferentes concentrações de sacarose e dosagens de nitrogênio inorgânico.

As soluções estoques de todos os componentes, incluindo principalmente (KNO₃ e NH₄NO₃), foram preparadas nas concentrações supracitadas na Tabela 2. Todos foram preparados a 50x maior da concentração final no meio MS. Onde principalmente do nitrato de amônio utilizou-se 82,44g e o nitrato de potássio 95,04g os dois dissolvidos em 1 litro de água destilada.

4.1.3.1. Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 5x5, totalizando 25 tratamentos, com 20 repetições por tratamento e 1 segmento nodal por tubo.

Os tratamentos consistiram em cinco diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15; 30 e 45 g.L⁻¹) e dosagens de nitrogênio inorgânico (nitrato de amônio e de potássio) obtidas de acordo com diluições ou múltiplos das quantidades existentes no meio básico, ou seja, 0, 5, 10, 20 e 40 ml.L⁻¹.

Os demais nutrientes minerais e orgânicos não foram alterados, utilizando-se 20ml.L⁻¹.

4.1.4. Características avaliadas

Nos experimentos (1) e (2), os ensaios foram avaliados aos 45 dias de cultivo *in vitro*, nas seguintes características: comprimento médio do broto (cm), número médio de brotos/explante e número médio de brotos maiores de 1 cm de comprimento.

O número médio de brotos/explante e o número médio de brotos maiores de 1 cm, foi obtido através da contagem direta, sendo o comprimento médio de brotos medido através de régua milimetrada.

4.1.5. Análise estatística

As análises de variância e os testes de médias foram feitos utilizando-se o software Sistema de Análise estatística – SANEST (ZONTA; MACHADO, 1991).

Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

Por se tratarem de dados quantitativos, os mesmos foram submetidos à análise de regressão polinomial.

4.2. Aclimatização de plantas micropropagadas de jambú (*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN)

4.2.1. Experimento 3 – Utilização de diferentes substratos na aclimatização das plântulas micropropagadas

4.2.1.1. Instalação e condução do experimento

Os estudos experimentais de aclimatização de *Acmella oleracea* (L.) foram realizados em Casa de Vegetação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Mudas com aproximadamente 60 dias e com tamanhos de brotos em média de 15 cm foram retiradas dos tubos de ensaio e após lavagem das raízes em água corrente para retirar todo o meio de cultura aderido às mesmas, foram colocadas em tubetes, em casa de vegetação, com irrigação por aspersão, contendo os substratos descritos na tabela 3.

Tabela 3: Substratos utilizados na aclimatização do jambú (*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN). UFAM, Manaus – AM, 2008.

Tratamento	Substrato
1	plantmax®
2	vermiculita
3	serragem



4.2.1.2. Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 tratamentos (substratos) e 20 repetições, totalizando 60 plantas.

4.2.1.3. Características avaliadas

Após 60 dias de cultivo, as mudas foram avaliadas quanto às seguintes variáveis: taxa de sobrevivência (%), tamanho da planta (cm), peso de matéria fresca (g.planta^{-1}) e peso de matéria seca (g.planta^{-1}).

A percentagem de sobrevivência foi obtida através da contagem direta e a altura da planta medido através de régua milimetrada. O peso de matéria fresca foi obtido pela pesagem direta em balança analítica, seguido da secagem em estufa por 72 horas, a 65°C para determinação do peso de matéria seca das plantas.

4.2.1.4. Análise estatística

As análises de variância e os testes de médias foram feitos utilizando-se o software Sistema de Análise estatística – SANEST (ZONTA; MACHADO, 1991).

Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

Por se tratarem de dados qualitativos, os mesmos somente foram comparados pelo teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EXPERIMENTO 1

A análise de variância (Tabela 4), mostra que houve diferença significativa a nível de 1% e 5% de probabilidade, para comprimento médio e número médio de brotos emitidos por explante, tanto em função da presença de BAP e de AIA, quando da interação dos dois bioreguladores no meio de cultura.

Para a característica número médio de brotos maiores de 1 cm, houve diferença somente para concentrações de BAP, não havendo significância para AIA, assim como para a interação entre os dois.

Com isso, nota-se que o desenvolvimento de gemas axilares formando brotações e o comprimento destas foi influenciado pela composição do meio de cultura com presença tanto de AIA como de BAP.

Tabela 4: Resumo das análises de variância para comprimento médio de brotos (CB), número médio de brotos/explante (NB) e número médio de brotos maiores de 1 cm de comprimento (NB>1cm), em diferentes concentrações AIA e BAP. UFAM, Manaus/AM, 2008.

Causas da Variação	Quadrados médios			
	G.L.	CB	NB	NB>1cm
BAP	4	16,20*	1,66*	0,29 ^{ns}
AIA	3	8,40*	0,23 ^{ns}	0,28 ^{ns}
BAP X AIA	12	1,66**	0,41*	1,31*
Resíduo	380	0,54	0,06	0,04
C.V (%)		24,00	17,52	16,35

* significativo a 1% de probabilidade

** significativo a 5% de probabilidade

^{ns} não significativo.

Como observa-se na Tabela 5 o maior comprimento de broto (3,78 cm) foi verificado na ausência tanto de BAP como de AIA, ou seja, no meio de cultura MS, na ausência dos dois bioreguladores.

O meio em que houve o menor comprimento dos brotos foi os que continham as maiores concentrações, com 5,0 de BAP mais 3,0 de AIA, com tamanhos de brotos de 1,77 cm.

Através da Figura 2, nota-se que o gráfico teve um comportamento linear e nos meios em que o AIA estava ausente, à medida que se aumentava a concentração de BAP no meio, a tendência foi a redução do comprimento das brotações. Este comportamento é observado em todos os outros meios em que ocorre o acréscimo na concentração dos dois bioreguladores, provavelmente em função do desbalanço hormonal entre os dois.

A tendência de diminuição do comprimento da brotação pode estar ligada ao fato de que as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas até uma determinada concentração, o que varia de acordo com cada espécie, e a partir desta concentração ocorre um efeito tóxico que se caracteriza por falta de alongamento (GRATTAGAGLIA; MACHADO, 1998).

Hartmann et al. (1999), ainda afirmam que isto ocorre em razão da inibição da dominância apical, resultando no desenvolvimento de brotações laterais pelo aumento dos níveis de citocinina no meio.

Verifica-se também que em baixas concentrações de AIA (0,5 a 1 mg.L⁻¹), aliadas a baixas concentrações de BAP (0,5 e 1,5 mg.L⁻¹), o desenvolvimento das plantas foi muito maior, isto porque as auxinas são responsáveis por controlar vários processos distintos, tais como crescimento e alongamento celular, além de serem capazes de iniciar a divisão celular e estarem envolvidas na origem de meristemas, promovendo crescimento tanto de tecido desorganizado como de órgãos definidos (DUDLEY, 1998).

Ressalta-se também que em todos os tratamentos testados, os explantes apresentaram uma espécie de calo rígido na base, dificultando o enraizamento dos mesmos. Esse aspecto também foi

observado por Lemos (2003), ao utilizar AIA em trabalhos de indução de brotos de Pimenta-do-reino.

As auxinas suplementares aos meios de cultura atuam nos processos de expansão, alongamento e divisão celular, com reflexos no enraizamento. Entre elas, o AIA parece ser a auxina mais eficaz para estimular o enraizamento *in vitro*, embora não a mais utilizada nos protocolos em geral. Sendo que para a maioria das espécies as auxinas exógenas são adicionadas ao meio de cultura na fase de indução de raízes, enquanto que na fase de diferenciação dos primórdios e crescimento destas, sua presença no meio de cultura costuma inibir o processo (HU; WANG, 1983; HOPKINS, 1999 citado por POMPELLI, 2006).

Tabela 5: Médias do comprimento médio de brotos (cm), obtidos *in vitro*, em diferentes concentrações de AIA e BAP. UFAM, Manaus/AM, 2008.

AIA (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)					Médias
	0,0	0,5	1,5	2,5	5,0	
0,0	3,78 Aa	3,68 Aa	2,60 BCb	3,32 Aba	2,49 Ca	3,17 A
0,5	3,75 Aa	3,29 ABa	3,70 Aa	3,28 Aba	2,70 Ba	3,34 A
1,0	3,22 Aa	3,33 Aa	3,41 Aa	3,32 Aa	2,39 Bab	3,13 A
3,0	3,29 Aa	3,07 ABa	2,65 ABb	2,55 Bb	1,77 Cb	2,67 B
Médias	3,51 a	3,34 ab	3,09 b	3,12 b	2,34 c	

As médias seguidas da mesma letra, maiúsculas para AIA e minúsculas para BAP não diferem entre si na mesma coluna pelo teste de Tukey à 1% de significância.

A adição de BAP foi responsável pela redução do comprimento das brotações. Embora o BAP seja utilizado na maioria dos sistemas experimentais *in vitro*, verifica-se que as culturas apresentam diferentes sensibilidades a essa citocinina dependendo do meio de cultura utilizado e da fase de cultivo.

Em diversas espécies, foi observado que a exposição a altas concentrações de BAP pode levar ao acúmulo de citocinina, o que inibe o crescimento da parte aérea, sendo esta inibição caracterizada pelo entumescimento e ausência de alongamento, encurtamento de entrenós e engrossamento exagerado dos caules Malik, (2005), citado por Lima; Moraes (2006).

Para a característica número médio de brotos, a Tabela 6, nos mostra que meio em que obteve-se maior número foi o com concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de AIA, que promoveu inicialmente 1,89 brotos/explante.

Tabela 6: Médias do número médio de brotos/explante, obtidos *in vitro*, em diferentes concentrações AIA e BAP. UFAM, Manaus/AM, 2008.

AIA (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)					Médias
	0,0	0,5	1,5	2,5	5,0	
0,0	1,78 Aa	1,32 Ba	1,24 Ba	1,37 Ba	1,34 Ba	1,41 AB
0,5	1,89 Aa	1,22 Ca	1,34 BCa	1,44 BCa	1,49 Ba	1,47 A
1,0	1,71 Aa	1,27 Ba	1,39 Ba	1,40 Ba	1,35 Ba	1,43 AB
3,0	1,26 Bb	1,33 ABA	1,37 ABA	1,30 ABA	1,53 Aa	1,36 B
Médias	1,66 a	1,29 c	1,34 bc	1,38 bc	1,43 b	

As médias seguidas da mesma letra, maiúsculas para AIA e minúsculas para BAP não diferem entre si na mesma coluna pelo teste de Tukey à 1% de significância.

A Figura 3 nos mostra que o meio de cultura em que o AIA estava ausente, o comportamento da curva é quadrático, onde inicialmente houve um decréscimo no número de brotos à medida que adicionava-se BAP ao contrario do meio com 3,0 mg.L⁻¹ de AIA, que ao adicionar-mos BAP, a tendência foi o aumento linear no número de brotos.

Através da Tabela 7, a formação de brotos maiores de 1 cm de comprimento foi obtida no meio com presença somente de BAP, na concentração de 1,5 mg.L⁻¹, com 1,41 brotos/explante.

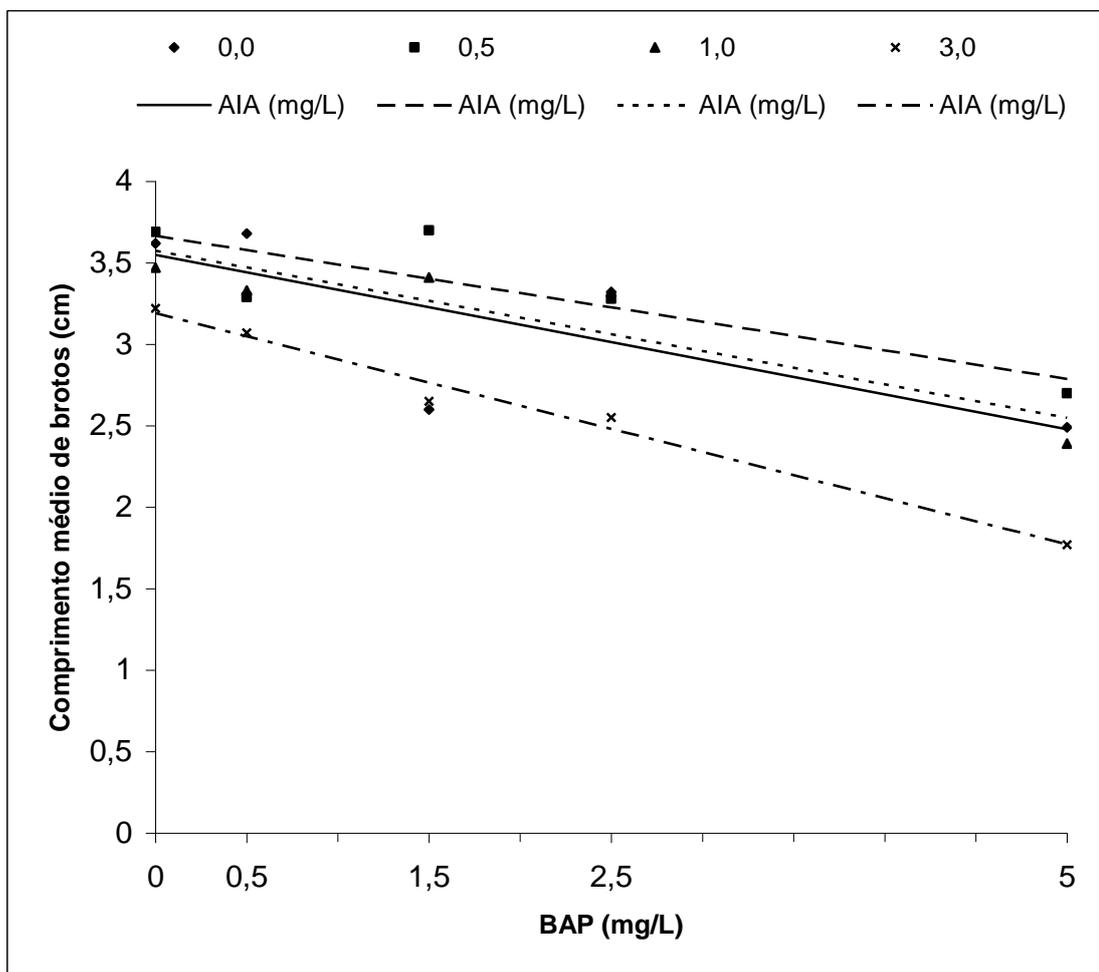
Pela Figura 4, nota-se que através da análise de regressão, todos os meios em que o AIA estava presente, as curvas não mostraram significância, e somente os meio em que havia BAP, houve em acréscimo no numero de brotos maiores de 1 cm à medida que também adicionava-se BAP ao meio.

Tabela 7: Médias do número médio de brotos maiores de 1 cm/explante, obtidos *in vitro*, em diferentes concentrações de auxina e citocinina. UFAM, Manaus/AM, 2008.

AIA (mg.L ⁻¹)	BAP (mg.L ⁻¹)					Médias
	0,0	0,5	1,5	2,5	5,0	
0,0	1,22 A	1,27 A	1,24 A	1,34 A	1,32 A	1,28 A
0,5	1,24 A	1,18 A	1,34 A	1,29 A	1,36 A	1,28 A
1,0	1,13 A	1,24 A	1,41 A	1,38 A	1,34 A	1,30 A
3,0	1,21 A	1,26 A	1,35 A	1,27 A	1,28 A	1,27 A
Médias	1,20 b	1,24 ab	1,34 a	1,32 a	1,33 a	

As médias seguidas da mesma letra, maiúsculas para AIA e minúsculas para BAP não diferem entre si na mesma coluna pelo teste de Tukey à 1% de significância.

Baixas concentrações de BAP promoveram maior número de brotos em Ipeca (LAMEIRA et al., 1994), Aroeira (ANDRADE et al., 200) e Abacaxi (GUERRA et al., (1999). Sendo também efetivo para o brotamento *in vitro* de Figo (FRÁGUAS et al., 2004). Mas Sabá et al., (2004), trabalhando com micropropagação de Jaborandi, constatou que baixas concentrações de citocininas foram efetivas na brotação de explantes *in vitro*.



0,0 AIA: $Y = 3,62 - 0,23 x$

$R^2 = 0,59$

0,5 AIA: $Y = 3,69 - 0,18 x$

$R^2 = 0,74$

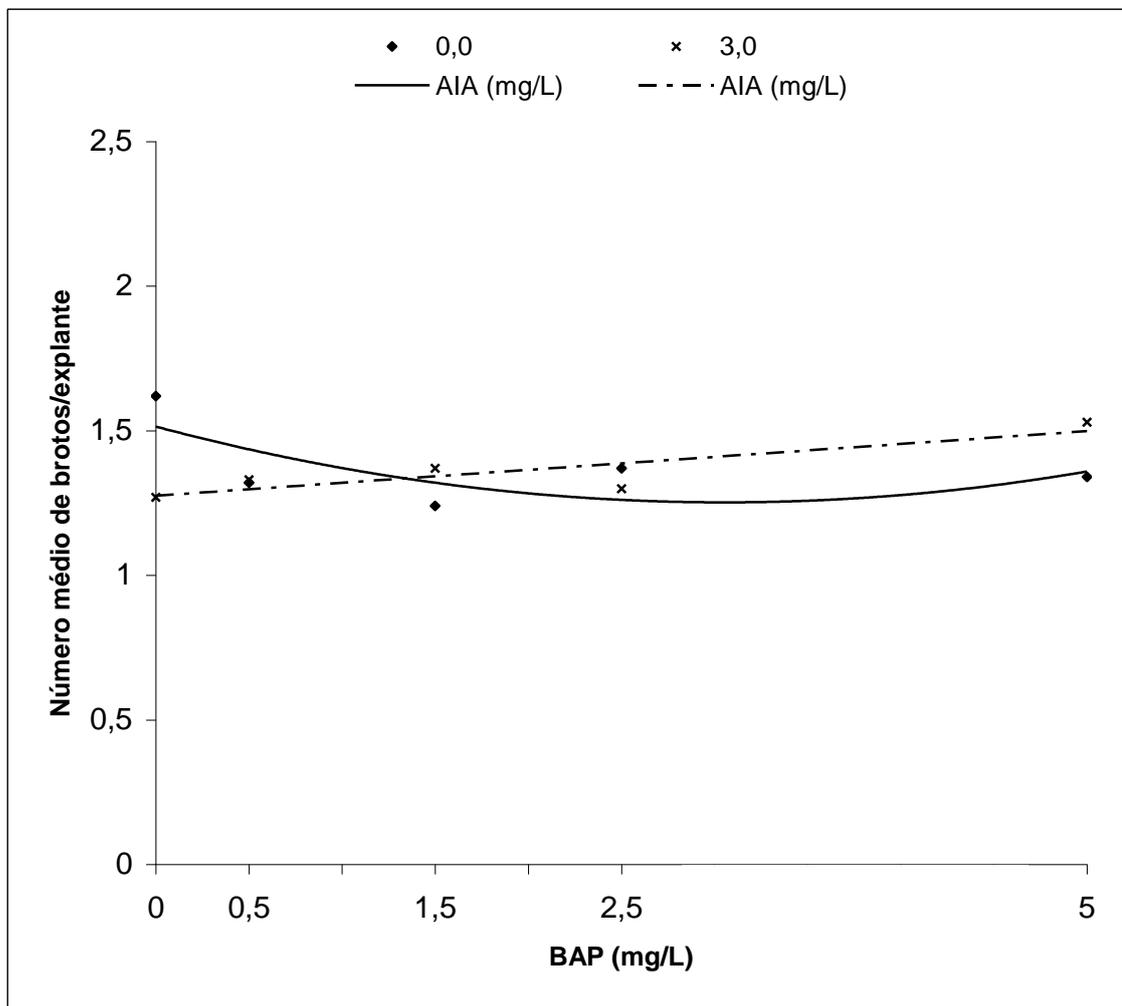
1,0 AIA: $Y = 3,47 - 0,17 x$

$R^2 = 0,67$

3,0 AIA: $Y = 3,22 - 0,29 x$

$R^2 = 0,97$

Figura 2: Efeito das diferentes combinações de BAP e AIA no comprimento médio de broto (cm) de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008.



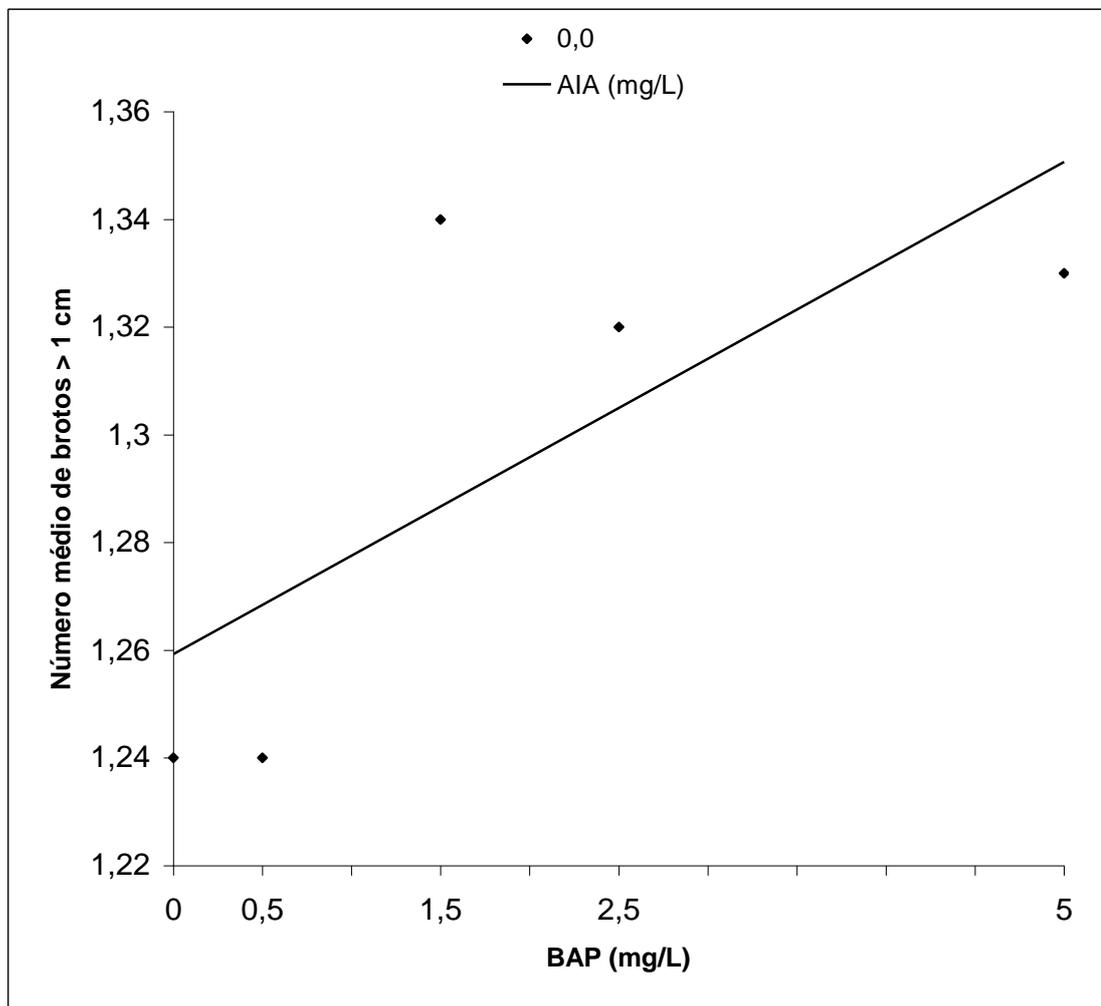
0,0 AIA: $Y = 1,62 - 0,25 x + 0,04 x^2$

$R^2 = 0,52$

3,0 AIA: $Y = 1,27 + 0,04 x$

$R^2 = 0,76$

Figura 3: Efeito das diferentes combinações de BAP e AIA no número médio de brotos/explante de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008.



0,0 AIA: $Y = 1,24 + 0,02 x$

$R^2 = 0,53$

Figura 4: Efeito das diferentes combinações de BAP no número de brotos/explante maiores de 1cm de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008.

5.2. EXPERIMENTO 2

Os resultados obtidos através da análise de variância e regressão tanto para tamanho de brotos como para número de brotos se encontram na Tabela 8.

Verificou-se que tanto para comprimento médio de broto como para número médio de broto e brotos maiores de 1 cm/explante, houve diferença significativa a nível de 1% e 5% de probabilidade, entre os diferentes níveis de sacarose e nitrogênio inorgânico, como também para a interação entre esses dois fatores.

Com isso, observa-se que a concentração de sacarose, a concentração de nitrogênio inorgânico, assim como a interação entre os dois, afetou significativamente o crescimento e a morfogênese, através da disponibilidade e pela forma na qual o nitrogênio inorgânico e a sacarose foi fornecido ao explante.

Tabela 8: Resumo das análises de variância para comprimento médio de brotos (CB), número médio de brotos/explante (NB) e número médio de brotos maiores de 1 cm de comprimento (NB>1cm), em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico. UFAM, Manaus/AM, 2008.

Causas da Variação	Quadrados médios			
	G.L.	CB	NB	NB>1 cm
Sacarose	4	14,90*	0,10**	2,87*
Nitrogênio	4	5,58*	1,37*	1,16*
S X N	16	1,00*	0,16*	0,33*
Resíduo	475	0,14	0,03	0,03
C.V (%)		21,05	12,22	14,34

* significativo a 1% de probabilidade

** significativo a 5% de probabilidade

^{ns} não significativo.

Na Tabela 9, observa-se que a combinação que obtiveram maior comprimento de broto foi no meio de cultivo em que a dose de 30g.L⁻¹ de sacarose associado a 5 ml.L⁻¹ de nitrogênio no meio MS (2,61 cm). Nos meios com valores de sacarose 7,5 g.L⁻¹ e 5 ml.L⁻¹ de nitrogênio, ainda se observa também um crescimento razoável dos brotos (2,48 cm).

Na Figura 5, são mostrados os efeitos da interação entre sacarose e nitrogênio inorgânico. Verifica-se que o modelo quadrático apresentou melhor ajuste aos dados obtidos.

Tabela 9: Médias do comprimento médio de brotos (cm), obtidos *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico. UFAM, Manaus/AM, 2008.

Sacarose (g.L ⁻¹)	Nitrogênio inorgânico (ml.L ⁻¹)					Médias
	0,0	5,0	10	20	40	
0,0	1,26 Ab	1,17 Ac	1,05 Ab	1,18 Ab	1,01 Ac	1,14 D
7,5	1,88 Ca	2,48 Aa	2,34 ABa	1,99 BCa	1,99 BCa	2,14 A
15	1,69 Ba	1,92 ABb	2,23 Aa	2,13 Aa	1,64 Bab	1,92 B
30	1,55 Bab	2,61 Aa	2,28 Aa	1,84 Ba	1,49 Bb	1,95 B
45	1,22 Cb	1,96 Ab	2,01 Aa	1,82 ABa	1,59 Bb	1,72 C
Médias	1,52 c	2,03 a	1,98 a	1,79 b	1,55 c	

As médias seguidas da mesma letra, maiúsculas para SACAROSE e minúsculas para NITROGÊNIO não diferem entre si na mesma coluna pelo teste de Tukey à 1% de significância.

O menor desenvolvimento ocorreu na ausência de sacarose e 40 ml.L⁻¹ de nitrogênio presentes no meio, com 1,01 cm de comprimento para novas brotações. Os meios com concentrações muito altas de nitrogênio (40 ml.L⁻¹) associadas as maiores doses de sacarose (45 g.L⁻¹), também propiciaram as menores formações de brotos, talvez pelo fato de que os mesmos em grandes níveis causem efeito tóxico às plantas. Em todas as concentrações com ausência de sacarose, pode-se observar que as plantas não desenvolveram raízes.

Isto se deve ao fato de que no cultivo *in vitro* a planta desenvolvida é ineficiente na produção de substâncias energéticas para a manutenção de seu crescimento e desenvolvimento normal. A variação na dosagem de sacarose influencia diretamente na produção de biomassa, tanto da parte aérea como no sistema radicular (BORKOWSKA; SZCZERBA 1991; CALVETE et al., 2002 citado por TORRES et al., 1998), mostrando a importância dos carboidratos no meio para o completo estabelecimento da cultura *in vitro* de muitas espécies.

O que também pode ser observado é que nos tratamentos em que o nitrogênio estava ausente, as plantas mostraram-se amareladas, característica essa que é sintoma da deficiência do nutriente. Segundo Russowski (2001) citado por Maldaner (2006), isto se deve ao fato de que o mesmo faz parte de inúmeras estruturas orgânicas, compondo os nucleotídeos, que formam os ácidos nucleicos (RNA e DNA), como também aminoácidos, que constituem as proteínas, estando presente ainda na própria molécula de clorofila.

Estes resultados diferem dos encontrados por Guimarães et al., (1999), que registraram o maior comprimento de brotos de samambaia-espada (*Nephrolepis exaltata*) na ausência de sacarose e a 5ml.L⁻¹ de nitrogênio. Oliveira (1994) verificou que no crescimento dos brotos de crisântemo (*Dendranthema grandiflora*), o melhor tratamento foi a combinação da baixa concentração de sacarose associada à baixa concentração de nitrogênio no meio da cultura. Estes resultados demonstram que as repostas à interação entre doses de nitrogênio e sacarose variam em função da espécie vegetal em questão.

A otimização do número de brotações são observados na Tabela 10 onde a maior formação de brotos ocorreu na concentração de 7,5 g.L⁻¹ e de sacarose e 20 ml.L⁻¹ de nitrogênio com 1,70 novos brotos. Nos meios com valores de sacarose de 30 g.L⁻¹ seguidas de 40 ml.L⁻¹ de nitrogênio ainda se observa também uma formação razoável de brotos (1,69 cm).

Tabela 10: Médias do número médio de brotos/explante, obtidos *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico. UFAM, Manaus/AM, 2008.

Sacarose (g.L ⁻¹)	Nitrogênio inorgânico (ml.L ⁻¹)					Médias
	0,0	5,0	10	20	40	
0,0	1,54 Aa	1,53 Aa	1,40 Aab	1,54 Aa	1,54 Aa	1,51 A
7,5	1,20 Cb	1,47 Ba	1,58 ABa	1,70 Aa	1,56 ABa	1,50 AB
15	1,29 Bb	1,50 Aa	1,44 ABab	1,53 Aa	1,57 Aa	1,47 AB
30	1,22 Db	1,42 Ca	1,50 BCab	1,60 ABa	1,69 Aa	1,49 AB
45	1,27 Cb	1,40 BCa	1,34 Cb	1,59 Aa	1,56 ABa	1,43 B
Médias	1,31c	1,46 b	1,45 b	1,59 a	1,58 a	

As médias seguidas da mesma letra, maiúsculas para SACAROSE e minúsculas para NITROGÊNIO não diferem entre si na mesma coluna pelo teste de Tukey à 1% de significância.

O metabolismo do carbono e do nitrogênio, analisados sob aspectos moleculares e fisiológicos, interagem com forte correlação, na qual a presença de carbono reduzido estimula tanto a expressão gênica

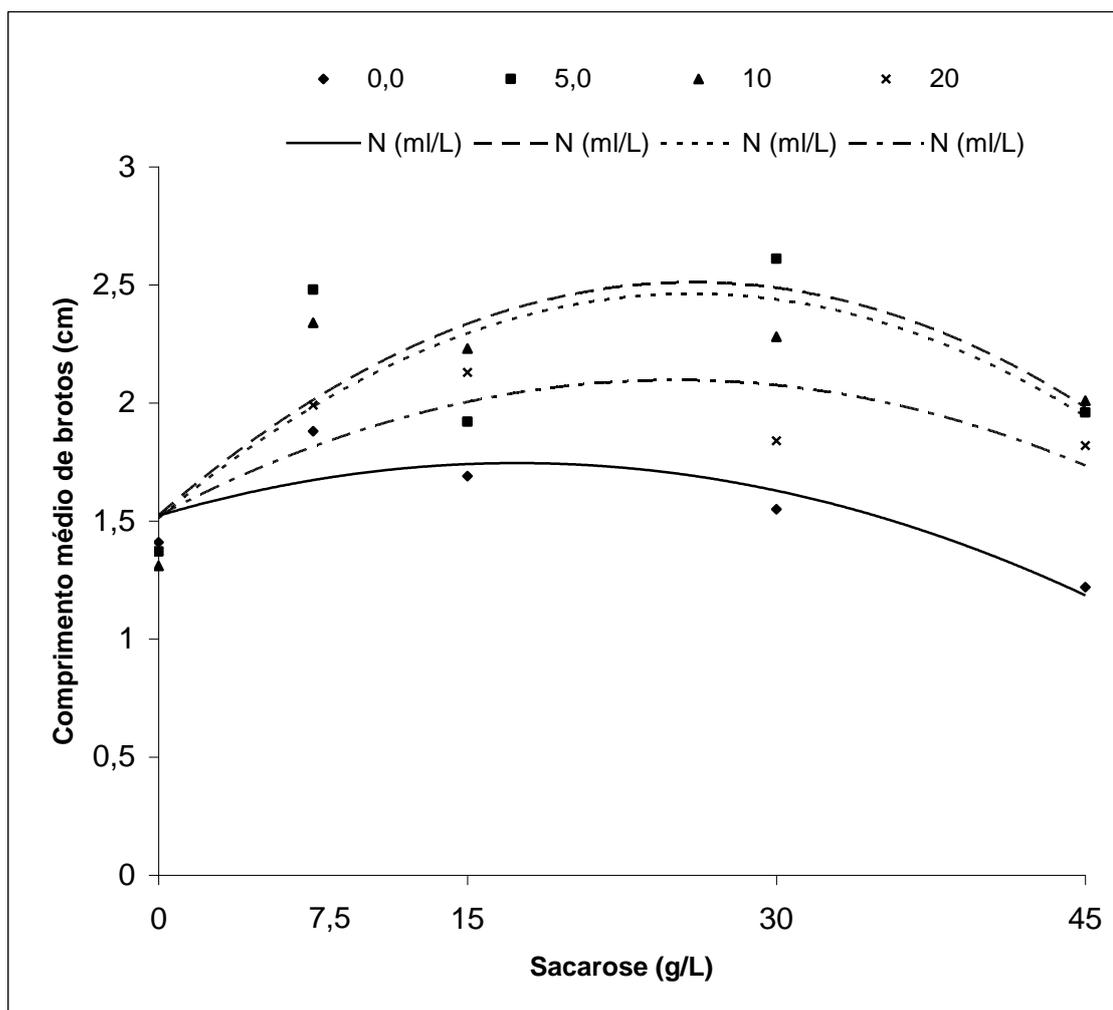
como a atividade de enzimas da assimilação do nitrato (CORUZZI, 2003). Isto é demonstrado quando se observa que à medida que a concentração de sacarose aumenta, é aumentada também a eficiência na assimilação do nitrato, o que proporciona uma quantidade maior no número de brotos.

Em *P. glomerata* cultivada *in vitro* Nicoloso et al., (2001) verificaram que o número de brotações tem sido o parâmetro de crescimento menos variável conforme as alterações dos nutrientes do meio MS.

Tabela 11: Médias do número médio de brotos/explante maiores de 1 cm, obtidos *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico. UFAM, Manaus/AM, 2008.

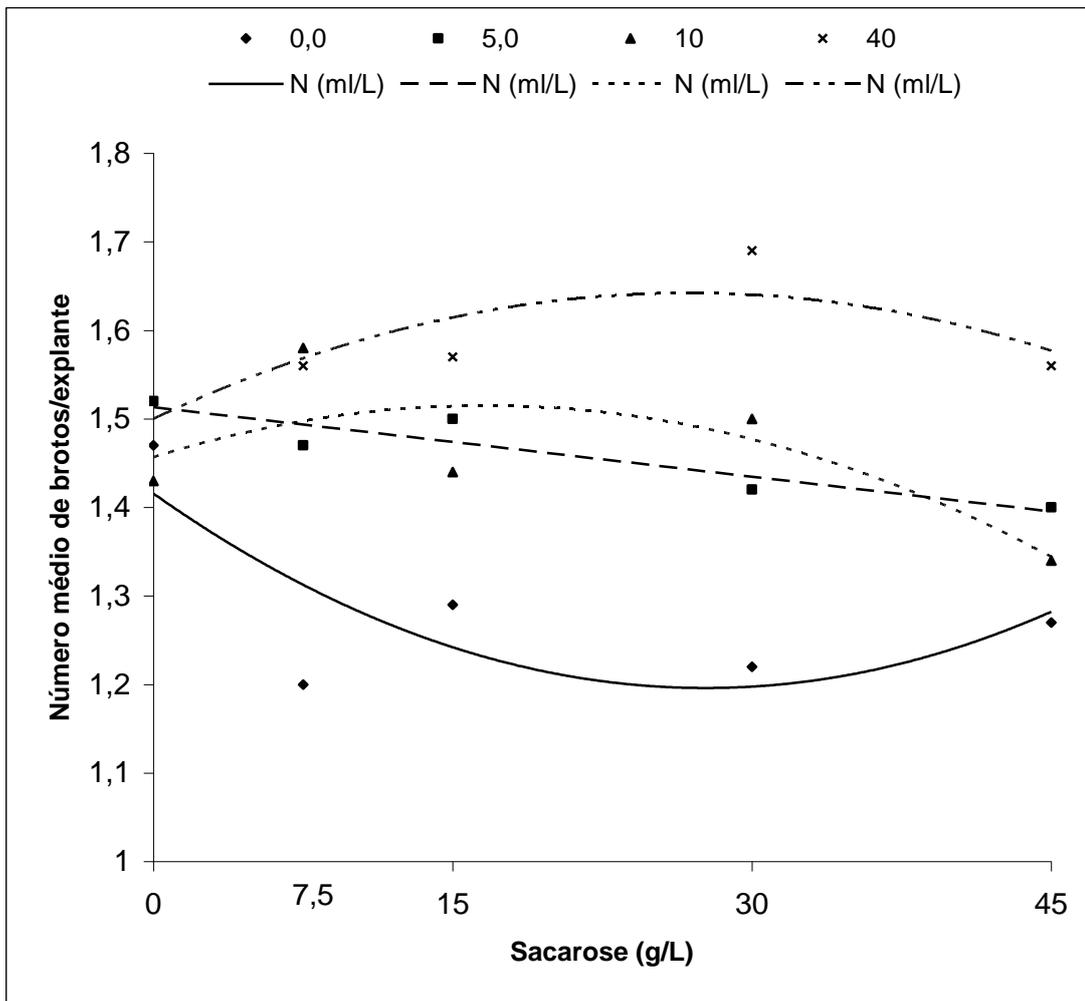
Sacarose (g.L ⁻¹)	Nitrogênio inorgânico (ml.L ⁻¹)					Médias
	0,0	5,0	10	20	40	
0,0	1,19 Aa	1,13 ABb	0,99 Bc	1,14 Abc	0,70 Cc	1,03 D
7,5	1,17 Ca	1,43 Ba	1,50 ABa	1,67 Aa	1,52 ABa	1,46 A
15	1,24 Ba	1,43 Aa	1,37 ABab	1,51 Aab	1,42 ABab	1,39 AB
30	1,19 Ba	1,36 ABa	1,38 Aab	1,50 Aab	1,35 ABab	1,36 B
45	0,94 Bb	1,27 Aab	1,28 Ab	1,38 Ab	1,31 Ab	1,24 C
Médias	1,14 c	1,33 b	1,31 b	1,44 a	1,26 b	

As médias seguidas da mesma letra, maiúsculas para SACAROSE e minúsculas para NITROGÊNIO não diferem entre si na mesma coluna pelo teste de Tukey à 1% de significância.



0,0 N:	$Y = 1,41 + 0,03 x - 0,0009 x^2$	$R^2 = 0,66$
5,0 N:	$Y = 1,37 + 0,08 x - 0,0017 x^2$	$R^2 = 0,61$
10 N:	$Y = 1,31 + 0,09 x - 0,0017 x^2$	$R^2 = 0,71$
20 N:	$Y = 1,37 + 0,05 x - 0,0011 x^2$	$R^2 = 0,63$

Figura 5: Efeito das diferentes combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico no comprimento médio de broto (cm) de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008.



0,0 N: $Y = 1,47 - 0,020 x - 0,0003 x^2$

$R^2 = 0,64$

5,0 N: $Y = 1,52 - 0,002 x$

$R^2 = 0,84$

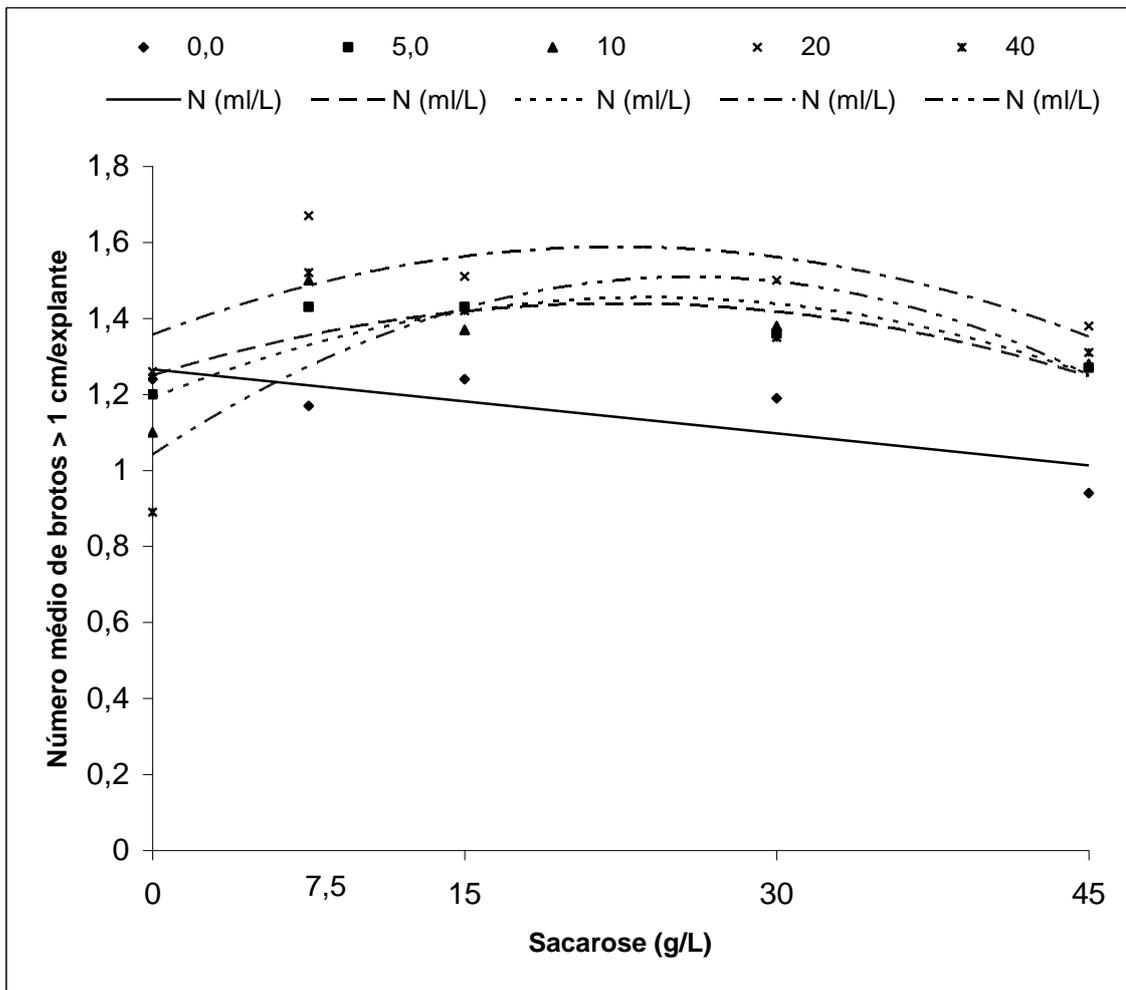
10 N: $Y = 1,43 + 0,009 x - 0,0002 x^2$

$R^2 = 0,58$

40 N: $Y = 1,52 + 0,009 x - 0,0001 x^2$

$R^2 = 0,59$

Figura 6: Efeito das diferentes combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico no número médio de broto/explante de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008.



0,0 N:	$Y = 1,24 - 0,004 x$	$R^2 = 0,53$
5,0 N:	$Y = 1,20 + 0,021 x - 0,0004 x^2$	$R^2 = 0,68$
10 N:	$Y = 1,10 + 0,029 x - 0,0005 x^2$	$R^2 = 0,54$
20 N:	$Y = 1,26 + 0,029 x - 0,0006 x^2$	$R^2 = 0,50$
40 N:	$Y = 0,89 + 0,049 x - 0,0009 x^2$	$R^2 = 0,58$

Figura 7: Efeito das diferentes combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico no número médio de broto/explante maiores de 1 cm de jambú (*A. oleracea* L.) obtido em condições *in vitro*. UFAM, Manaus/AM, 2008.

5.3. EXPERIMENTO 3

Através da Tabela 12, podemos afirmar que os substratos utilizados na aclimatização de mudas micropropagadas de jambú, não influenciaram de forma significativa no crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das mesmas. Assim, os resultados obtidos através das análises de variância mostraram que nenhuma característica foi afetada significativamente, ao nível de 5% de probabilidade para os diferentes tipos de substratos estudados.

Hartmann et al. (1990), mencionam que os principais efeitos dos substratos se manifestam sobre as raízes, podendo acarretar algumas influências sobre o crescimento da parte aérea. Porém neste experimento, não foram encontrados diferenças significativas na porcentagem de sobrevivência, tamanho da parte aérea, peso de matéria fresca e peso de matéria seca entre as diferentes composições.

Tabela 12: Resumo das análises de variância para sobrevivência (S), altura da planta (AP), peso matéria fresca (PMF) e peso matéria seca (PMS) de plântulas de jambú aclimatizadas em diferentes tipos de substrato. UFAM, Manaus/AM, 2008.

Causas da Variação	Quadrados Médios				
	G.L.	S	AP	PMF	PMS
Substrato	2	0,0133 ^{ns}	0,1441 ^{ns}	0,0179 ^{ns}	0,0002 ^{ns}
Resíduo	57	0,058	4,333	0,057	0,002
C.V. (%)		22,66	58,03	24,21	6,45

^{ns} não significativo.

** significativo a 5% pelo teste de Tukey.

Observou-se efeito positivo na aclimatização, sobre as mudas de jambú produzidas *in vitro* (Tabela 13, Figura 8 - 1A). Plantas desenvolvidas no substrato vermiculita demonstraram superioridade com a maior taxa de sobrevivência (69%), seguidas das plantas cultivadas no substrato serragem (64%). Entretanto no substrato plantmax®, houve a menor taxa de sobrevivência (58%).

Estes resultados corroboram com os encontrados por Nunes et al., (1999), que verificaram que o uso da vermiculita proporcionou um maior crescimento do sistema radicular e melhores condições de sobrevivência das plântulas na aclimatização de mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira “Marubakaido”, quando comparado com o substrato comercial plantmax®.

Em experimentos também realizados por Lemos (2003), que testando o substrato plantmax® + vermiculita (1:1) e somente vermiculita, na sobrevivência de plantas micropropagadas de pimentado-reino, concluiu que o substrato vermiculita foi muito mais eficaz do que o outro composto.

Porém diferem dos resultados encontrados por Wagner (2001), que concluíram que o aumento na proporção da concentração de vermiculita nos substratos houve uma diminuição linear, não sendo recomendados para aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta.

A variação na altura das plantas durante a aclimatização comportou-se semelhante à característica anterior estudada. Observa-se inicialmente (Tabela 13, Figura 8 - 1B), a superioridade na altura das plantas nas mudas desenvolvidas no substrato vermiculita e serragem (12,96 e 12,38 cm), respectivamente. Após isso, observam-se resultados inferiores as produzidas em plantmax® (11,75 cm).

Segundo Filgueira (2000), a vermiculita expandida é altamente vantajosa, pois esse mineral micáceo absorve até cinco vezes o próprio volume da água. Além de conter teores favoráveis de K e Mg disponíveis apresenta boa retenção de nutrientes graças à elevada capacidade de troca catiônica.

O peso de matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes das mudas de jambú não diferiu significativamente em razão da variável tipo de substrato utilizado (Tabela 13, Figura 9 – 2A e 2B).

De acordo com os resultados, as plantas estabelecidas no substrato comercial plantmax® apresentaram as maiores valores para matéria fresca e seca (0,53 e 0,08 g/planta), seguidas pelas plantas conduzidas em substrato vermiculita (0,47 e 0,07 g/planta). As plantas também mostraram-se mais vigorosas no substrato plantmax®, como observado na Figura 10.

Os piores resultados para estes parâmetros foram encontrados nas plantas que cresceram em serragem (0,41 e 0,07 g/planta). A serragem consiste de cascas e sobras de madeira trituradas ou pulverizadas. Devido ao seu baixo custo, leveza e disponibilidade, esse material é muito utilizado. Porém existe a possibilidade da serragem conter materiais tóxicos as plantas, como fenóis, resinas, terpenoides e taninos, por isso recomenda-se um curtimento de 10 a 14 semanas antes do uso (HARTMANN et al., 1999).

Dentre as desvantagens do uso da serragem tem-se que sua estrutura quebra-se com o uso, dando origem a partículas muito finas, que comprometem a aeração (MARTINEZ; BARBOSA, 1999).

Em estudos relatados por Skrebsky (2006), que testando diferentes substratos concluiu que de todos os substratos testados, o plantmax® apresenta valores de densidade próxima do ideal, fornecendo boa estabilidade às plantas.

Relata ainda que foi o que apresentou maior capacidade de retenção de água, fato que pode ter contribuído para diminuir as elevadas perdas de água pela evapotranspiração.

Alem destas, foi o que apresentou maior espaço para aeração, fator este responsável pela manutenção de oxigênio nas raízes.

Segundo Hoffmann (2001), o plantmax® apresenta vantagem pela sua uniformidade de composição química e física, diferente do que pode ocorrer com o solo e distintos materiais orgânicos, os quais podem variar muito nas suas características.

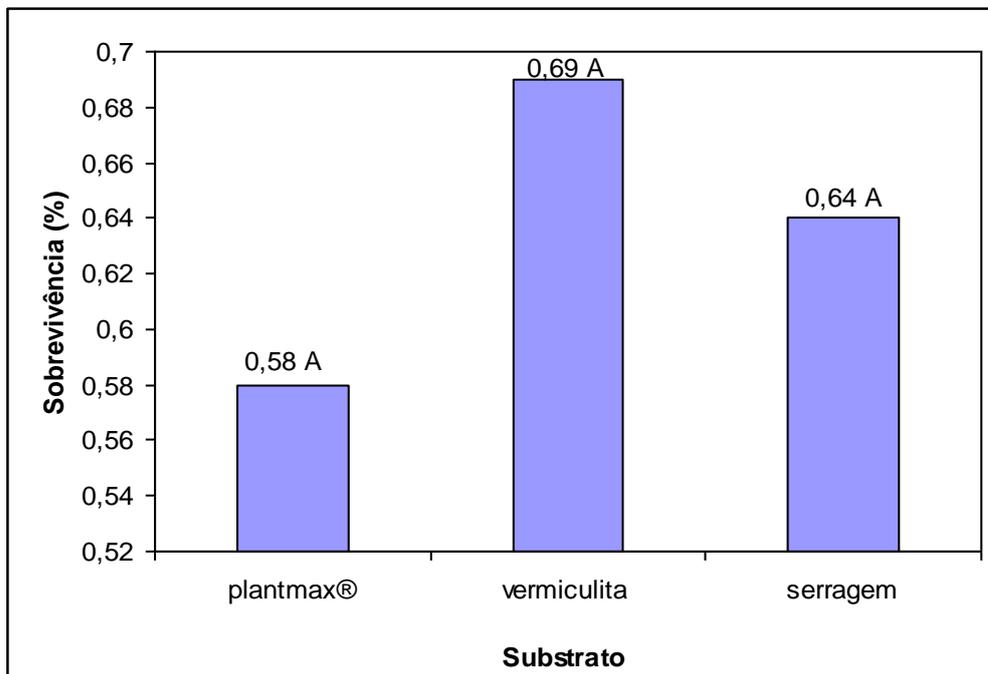
O substrato plantmax® também foi um meio apropriado para o desenvolvimento de plantas micropropagadas no cultivo *ex vitro* de Porta-enxerto para pessegueiros e ameixeiras (COUTO, 2003), *aloe vera* (SILVA, 2007) e plantas de ginseng brasileiro (SKREBSKY, 2006).

Tabela 13: Médias das variáveis, sobrevivência (S), altura da planta (AP), peso matéria fresca (PMF) e peso matéria seca (PMS) de plântulas de jambú aclimatizadas em diferentes tipos de substrato. UFAM, Manaus/AM, 2008.

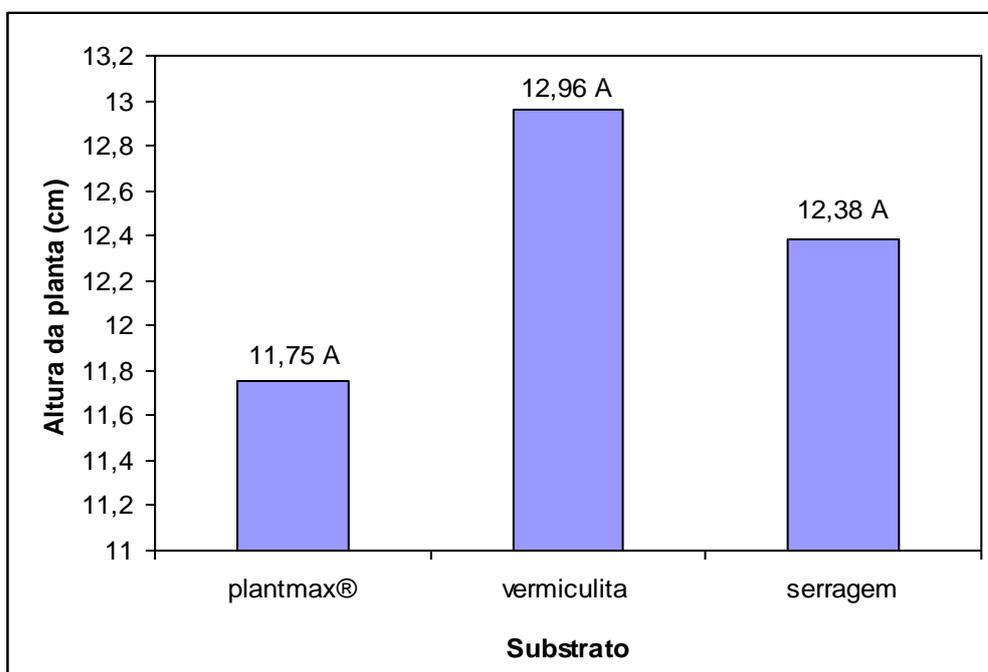
Substratos	S	AP	PMF	PMS
	(%)	(cm)	g.planta ⁻¹	
plantmax®	0,58 A	11,75 A	0,53 A	0,08 A
vermiculita	0,69 A	12,96 A	0,47 A	0,07 A
serragem	0,64 A	12,38 A	0,41 A	0,07 A

As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 1% de significância pelo teste de Tukey.

Notou-se também que as plantas retiradas do cultivo *in vitro* e transplantadas, apresentaram sistema radicular fino, frágeis e facilmente quebráveis, durante a retirada do ágar. Alguns autores afirmam que as raízes formadas *in vitro* não são funcionais, por lhes faltarem pêlos radiculares e conexão vascular e por não desenvolverem um câmbio secundário após o período em cultura. Relatam ainda que muitas raízes formadas *in vitro* morrem e novas são formadas quando transferidas para o campo. Contudo, é possível que as raízes formadas *in vitro* possam servir de sustentação e reserva de nutrientes até que novas raízes sejam formadas (GEORGE, 1993; DEBERGH; MAENE, 1981 citado por POMPELLI; GUERRA, 2006).

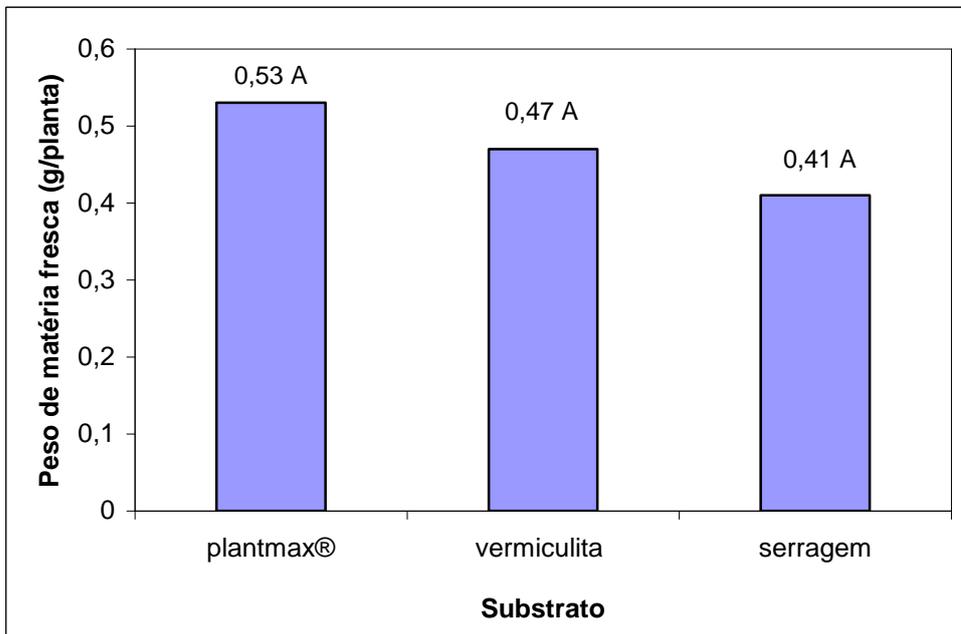


1A

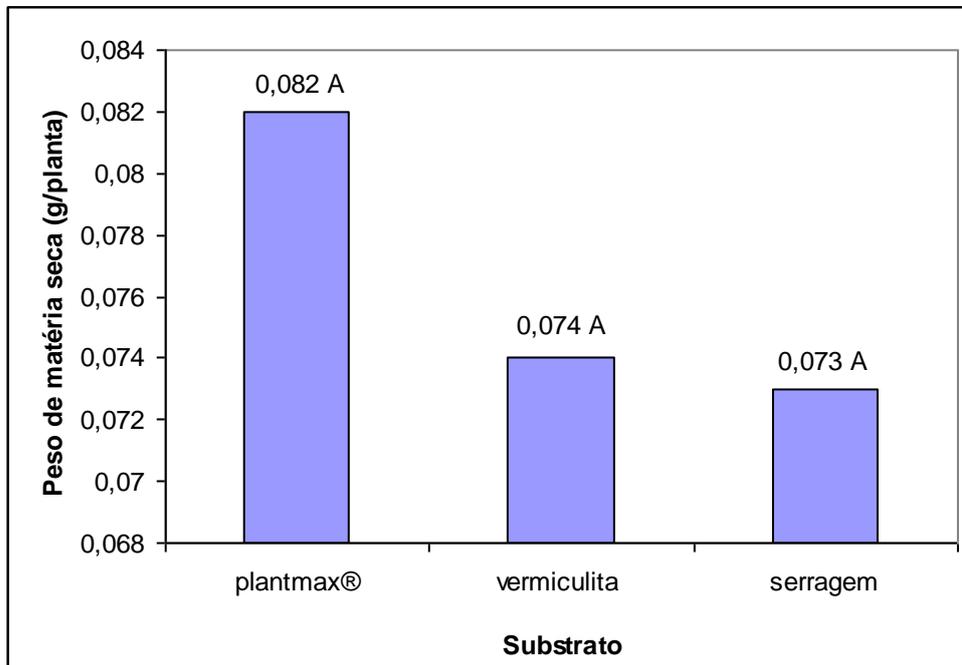


1B

Figura 8: Sobrevivência (1A) e Altura (1B) de plantas de jambú em diferentes substratos. Manaus/AM, 2008.



2A



2B

Figura 9: Peso de matéria fresca (2A) e matéria seca (2B) de plantas de jambú em diferentes substratos. Manaus/AM, 2008.

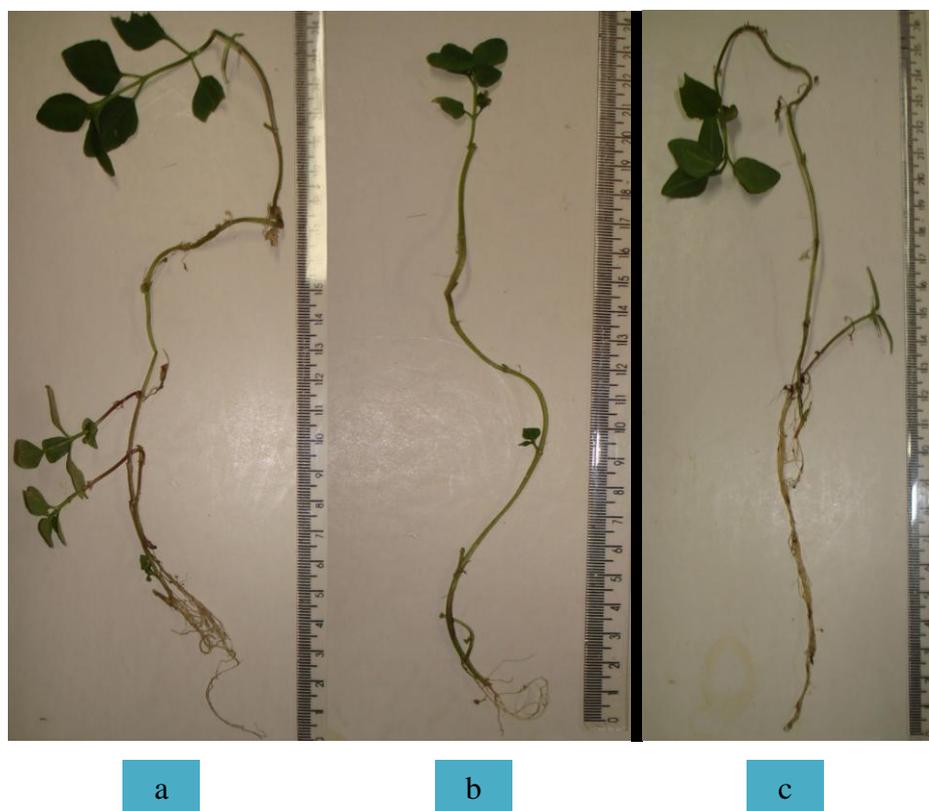


FIGURA 10: Crescimento de plântulas de jambú aclimatizadas em casa de vegetação em diferentes substratos. (a) Plantmax®, (b) vermiculita e (c) serragem. UFAM, Manaus-AM, 2008.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foram conduzidos os experimentos, pode-se concluir que:

A adição de reguladores de crescimento no meio de cultura MS influenciou no desenvolvimento e multiplicação de plantas de Jambú cultivadas *in vitro*.

Modificações tanto nas concentrações de sacarose, como nas de nitrogênio inorgânico influenciaram no crescimento do Jambú cultivado *in vitro*.

O substrato plantmax®, assim como a vermiculita e a serragem, são apropriados para a aclimatização de plântulas de Jambú cultivadas *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M.; LACERDA, A. R.; MELO, P. D. A. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). Ciência Agrotec. v.24, n.1, p. 174-180, 2000.

ARMOND, C. Indicadores químicos, crescimento e bioletoografias de plantas de Jambú (*Acmella oleracea* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) e folha-da-fortuna (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken) submetidos a tratamentos homeopáticos. Tese Universidade Federal de Viçosa – MG. 142p, 2007.

BAIS, H. P.; GEORGE, J.; RAVISHANKAR, G. A. *In vitro* of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn, an endangered Shrub, through axillary bud cultures. Current Science. v. 79, n.4, p.408-410, 2002.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Revista Ciência e Cultura. São Paulo. v.55, n.3. Jul/Set, 2003.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; RITA, S.; SHARATCHANDRA, T, I, S. Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. Indian J pharmacol. v.36, p.148-150, June, 2004.

COUTINO, C. J.; CARVALHO, C. M. O uso da vermiculita na produção de mudas florestais. In: Encontro Nacional de Reflorestadores. Curitiba. Anais de Curitiba. P. 54-63, 1983.

DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings. Discovery Press: Oregon. 315p, 1988.

DI STASI, L. C. Arte, Ciência e Magia. In: Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora UNESP. p.472-483, 2002.

DUDLEY, T. R. Adventitious root formation in cuttings. Advances in Plant Science Series. v.2, p. 132-149, 1998.

ENGELMAN, F. In vitro conservation of tropical plant Germoplasma: a Review. Euphytica, vol. 57, p.227-243, 1991.

FEET, M. S. Como produzir mudas de Eucalipto clonado? Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. SENAI: Piracicaba. 5p, 2005.

FERNANDES, C.; CORA, J. E. Substratos hortícolas. Cultivar HF. p.32-34, out./nov, 2001.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura. Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa/UFV. 402p. 2000.

GONÇALVES, A. L. Substrato para produção de mudas ornamentais. In: Minami, K. Tessarioli Neto, J.; Penteado, S. R.; Scarpate Filho, J. A. Produção de mudas hortícolas de alta qualidade. Piracicaba: ESALQ/Sebrae. 156p, 1995.

GONZÁLES, S. R.; LOZANO, J. G.; ROJAS, M. A. Propagación asexual de plantas: Conceptos basicos y experiencias con especies Amazónicas. Pronatta: Colombia. 55p, 2004.

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

GUERRA, P. G.; VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.; NODAR, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. Pesq. Agropec. Bras. v.34, n.9, p.1557-1563, 1999.

GUIMARÃES, P. T. C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A. M. P de. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação "in vitro" da samambaia-espada (*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott). Ciência e Agrotec. Lavras. v.23, n.2, p. 309-316, abri/jun, 1999.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T. D. Plant propagation: Principles and practice. Prentice Hall. 642p. 1997.

HAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHOORN, S. E. Biologia vegetal. Editora Koogan, Rio de Janeiro. p. 612-637, 1996.

HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella oleracea*: Compositae. Curtis's Botanical Magazine. v. 20, n.1, p.31-39. 2003.

HOFFMANN, A. PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; FRÁGUAS, C. B. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira "marubakaido". Ciência e Agrotecnologia. Lavras, v.25, n.2, p.462-467, 2001.

KRIKORIAN, A. D. Cloning higher from aseptically cultured tissues and cell. Biology Revision. V.57, p.151-218, 1982.

LAMEIRA, O. A.; COSTA, M. P.; PINTO, J. E. B. P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three

subcultures *in vitro*. Ciência Rural. Santa Maria. v.24, n.3, p.523-526, 1994.

LEMOS, O. F. de; Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). Tese. Piracicaba. 159p. 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto plantarum de estudos da Flora LTDA. 512p. 2002.

LUCAS, M. A. K.; SAMPAIO, N. V.; KOHN, E. T.; SOARES, P. F.; SAMPAIO, T. G. Avaliação de diferentes composições de substratos para a aclimação de mudas de morangueiro (*Fragaria xananassa* Duch). Revista Cient. Rural, v.8, n.1, p.16-23, 2002.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Ciência Rural. Santa Maria. v.36, n.4, p.1201-1206, jul/ago, 2006.

MARCELO, C.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto miranbolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.) em casa de vegetação. Rev. Bras. Agrociência. v.9, n.2, p.125-128, abr/jun, 2003.

MARTINEZ, H. E. P.; BARBOSA, J. G. Substrato para hidroponia. In: Cultivo protegido de hortaliças em solo e hidroponia. Informe Agropecuário. v.20, p.81-89, n.200-201. 1999.

MARTINS, E. R. Morfologia externa e interna, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. Dissertação Universidade Federal de Viçosa – MG. 97p. 1996.

NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação “in vitro” de brotações de porta – enxerto de citros. *Bragantia*, Campinas. 53(1): 25-31, 1994.

NETO, C. P. C. T.; HERNANDEZ, F. F.; BEZERRA, F. C.; SOUSA, R. F de; CAVALCANTI, M. L. F. Efeito da concentração salina da solução nutritiva na aclimatação de plantas micropropagadas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. v. 4, n.2, 2004.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeito e doses de carboidratos no crescimento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. *Ciências Agrotecnologia*. Lavras. v.27, n.1, p. 84-90, jan/fev, 2003.

NUNES, J. C. O. de; BARPP, A.; SILVA, F. C.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto Murabakaido (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v.1, n.2, p.191-195, 1999.

PANDEY, V.; AGRAWAL, V.; RAGHAVENDRA, A. P. Strong larvicidal activity of three species of *Spilanthus* (Akarkara) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston, *Anopheles culicifacies*, species C) and filaria vector (*Culex quinquefasciatus* Say). *Parasitol Res*. P.171-174. 2007.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. Meios de cultura. Editora da UFLA: Lavras. 127p, 1997.

PEREIRA, A. M. S.; BERTPNI, B. W.; CÂMARA, F. L. A.; DUARTE, I. B.; QUEIROZ, M. E. C.; LEITE, V. G. M.; MORAES, R. M.; CARVALHO, D.; FRANÇA, S. C. Co-cultivation of plant cells as a technique for the elicitation of secondary metabolite production. *Plant Cell, Tissue and Culture*, Netherlands. V.60, p.165-167, 2000.

PIERIK, R. L. M. Preparación y composición de los medios nutritivos. In: Cultivo "in vitro" de las plantas superiores. Madrid: Mundi Prensa. p. 49-84, 1990.

POMPELLI, M. F.; GURRA, M. P. Enraizamento in vitro e ex vitro de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. Revista Floresta e Ambiente. V.12, n.2, p. 42 - 49, nov./dez, 2006

PRESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. Revista Brasileira de Farmacognosia. v.13, p.21-24, 2003.

RANI, S. A.; MURTY, S. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. African Journal of Biomedical Research. v.9. p.67-69. 2006.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas sustentáveis. Manaus: INPA, 405p, 2001.

SABÁ, R. T.; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. P.; GOMES, A. P. R.; INECCO, R. Micropropagação de Jaborandi. Hort. Bras. v.20, n.1, p.106-109, 2002.

SALVADOR, E. D.; MINAMI, K. Efeito de diferentes substratos no cultivo de grama santo *Agostinho* (*Stenotaphrum secundatum* Kuntze) em bandejas. Ciência Agrotec., Lavras, v.25, n.5, p.1079-1086, set/out, 2001.

SILVA, C. G.; DEBIASI, C. Enraizamento in vitro e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu, v.9, n.1, p.29-35. 2007.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida in vitro sob diferentes doses de sacarose. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.5, p.1416-1423, set-out, 2006.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA. v.2, 864p, 1998.

VILLACHICA, H. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazônia. Lima: Tratado de Cooperacion Amazônica. 385p. 1996.

VULPI, T. S.; MORAIS, C. P. M.; TRINDADE, A. P. F.; LIMA, M. C. H. P.; VELOZO, L. S. M.; KAPLAN, M. A. C. Análise do óleo essencial dos diferentes órgãos de *Acmella ciliata* Kunth (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre. v.5, n.2, p.1128-1130, jul, 2007.

WAGNER, A.; CHAVES, A.; COUTO, M.; MALGARIN, M. B.; FORTES, G. R de L. Avaliação de diferentes níveis de vermiculita na aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta (*Rubus spp*). 2001.

ZONTA, E. P. & MACHADO, A. A. Manual do Sanest: Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 1991.