



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DO PARÁ

**RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS *IN VITRO* DE PARICÁ**  
**(*Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências agrárias do Pará como parte das exigências, do curso de Ciências Florestais, área de concentração em Silvicultura e Manejo Florestal, para obtenção do grau de “Mestre”

Orientador: Pesq. Dr. Osmar Alves Lameira

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Luiz Contente de Barros

Belém-Pará

2002

CORDEIRO, Iracema Maria Castro Coimbra. Respostas morfogênicas *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke). Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 2002. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – FCAP, 2002.

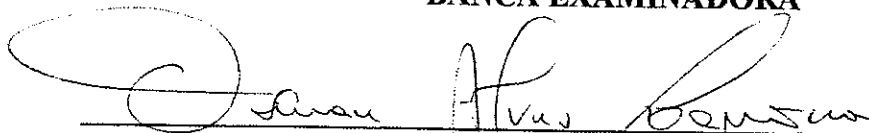
**IRACEMA MARIA CASTRO COIMBRA CORDEIRO**

**RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS *IN VITRO* DE PARICÁ  
(*Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke)**

Dissertação submetida ao Conselho de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais, área de concentração em Manejo e Silvicultura Tropical, outorgada pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará.

Aprovada 20 de dezembro de 2002

**BANCA EXAMINADORA**

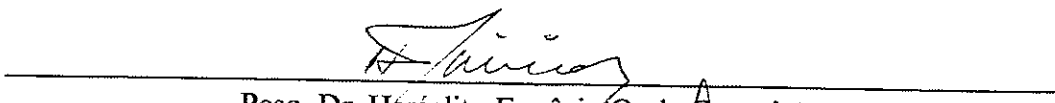


Pesq. Dr. Osmar Alves Lameira  
Orientador

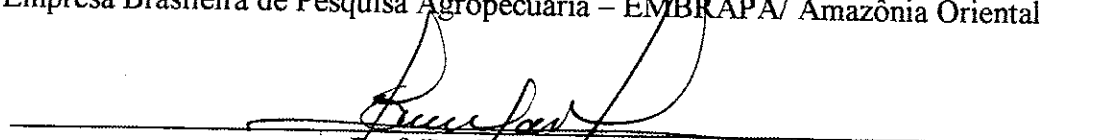
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/ Amazônia Oriental



Dr. Evaristo Mauro de Castro  
Universidade Federal de Lavras- UFLA



Pesq. Dr. Héracito Eugênio O. da Conceição  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/ Amazônia Oriental



Prof. Dr. Sueli Namazawa  
Faculdade de Ciências Agrárias do Pará- FCAP

A DEUS

**Ofereço**

Aos meus pais Alfredo e Joana,  
pelo que sou hoje.

Ao meu marido Milton e aos meus filhos Gabriel e Túlio  
pelo amor e compreensão.

Aos meus irmãos e sobrinhos  
pelo apoio e carinho.

**Dedico**

**“Os seres vivos têm capacidade de regenerar seus  
corpos inteiros a partir de células únicas”**

**Gottlieb Haberlandt (1902)**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, Onipotente e Onipresente por estar sempre ao meu lado em todas as horas.

Aos meus grandes homens, Milton, Gabriel e Túlio pela compreensão

Aos pais Alfredo e Joana, meus irmãos e familiares pelo amor irrestrito

Ao pesq. Dr. Osmar Alves Lameira pela incansável orientação, amizade, apoio e experiência transmitida.

Ao prof. Dr. Paulo Luís Contente de Barros, pelos ensinamentos, sugestões e planejamento dos experimentos.

Ao Eng. Florestal Francisco Evaristo de Moura Terezo, por acreditar na minha capacidade para realizar este trabalho e por me ter despertado para a área de biotecnologia.

À empresa Tramontina Belém S.A. na pessoa do Diretor Superintendente, Sr. Luís Ongaratto, pelo apoio financeiro e logístico para a realização deste trabalho.

Ao corpo docente do curso de mestrado da FCAP pelos ensinamentos transmitidos, orientações recebidas e agradável convívio.

À professora Selma Ohashi, pelo incentivo, amizade e valiosa contribuição.

Aos meus amigos do curso de Pós-Graduação Julivane, Tangriene, Ulisses, César, Márcio, Buza, João Ricardo, Rosana, Santa Rosa, Débora e em especial a Gracialda Ferreira pelo companheirismo e amizade.

À Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, através do curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais, por esta grandiosa oportunidade.

À coordenadora do curso de Pós-Graduação, Dra. Izildinha Miranda, pela inesgotável dedicação.

Ao técnico agrícola Guilherme Neves, pela amizade e incansável ajuda na coleta de material.

Aos mestres Ilmarina Campos de Menezes, Sebastião da Cunha Lopes e Marly da Costa Pedroso, pela ajuda, críticas e sugestões.

Ao pessoal de apoio do laboratório de recursos genéticos e biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, em especial aos Srs. Gerson e Paulo e aos bolsistas e estagiários Elaine, Michelli, Mauro, Juliana, Lana, Louise, Surama e Alessandra, pela boa convivência e presteza constantes.

Ao José de Ribamar (Pelé) e José Maria, funcionários da biblioteca da Embrapa Amazônia Oriental, pela ajuda constante concernente ao material bibliográfico.

## SUMÁRIO

|            |                                                                                                                                               |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|            | DEDICATÓRIA.....                                                                                                                              | i         |
|            | EPÍGRAFE.....                                                                                                                                 | ii        |
|            | AGRADECIMENTOS.....                                                                                                                           | iii       |
|            | SUMÁRIO.....                                                                                                                                  | iv        |
|            | LISTA DE TABELAS.....                                                                                                                         | vi        |
|            | LISTA DE FIGURAS.....                                                                                                                         | vii       |
|            | LISTA DE ABREVIATURAS.....                                                                                                                    | viii      |
|            | <b>CAPITULO I - INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                                                                                                     | <b>10</b> |
| 1.1        | RESUMO.....                                                                                                                                   | 10        |
| 1.2        | APRESENTAÇÃO.....                                                                                                                             | 12        |
|            | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                        | <b>17</b> |
|            | <b>CAPITULO II - GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PARICÁ (<i>Schizolobium amazonicum</i> Huber Ex Ducke).....</b>                                | <b>19</b> |
| 2.1        | RESUMO.....                                                                                                                                   | 19        |
| 2.2        | INTRODUÇÃO.....                                                                                                                               | 20        |
| 2.3        | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                       | 21        |
| 2.4        | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                                   | 23        |
| 2.5        | CONCLUSÕES.....                                                                                                                               | 26        |
|            | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                        | <b>27</b> |
|            | <b>CAPÍTULO III - OXIDAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PARICÁ.....</b>                                                                                 | <b>29</b> |
| 3.1        | RESUMO.....                                                                                                                                   | 29        |
| 3.2        | INTRODUÇÃO.....                                                                                                                               | 30        |
| <b>3.3</b> | <b>Ação de diferentes antioxidantes no controle da oxidação em segmentos caulinar de paricá.....</b>                                          | <b>31</b> |
| 3.3.1      | Material e Métodos.....                                                                                                                       | 31        |
| 3.3.2      | Resultados e Discussão.....                                                                                                                   | 31        |
| 3.3.3      | Conclusões.....                                                                                                                               | 33        |
| <b>3.4</b> | <b>Efeito de diferentes concentrações de nitrato de amônio no controle da oxidação <i>in vitro</i> em segmento caulinar de paricá.....</b>    | <b>33</b> |
| 3.4.1      | Material e Métodos.....                                                                                                                       | 33        |
| 3.4.2      | Resultados e Discussão.....                                                                                                                   | 34        |
| 3.4.3      | Conclusões.....                                                                                                                               | 37        |
|            | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                        | <b>38</b> |
|            | <b>CAPITULO IV - MICROPROPAGAÇÃO DE PARICÁ A PARTIR DE SEGMENTO NODAL.....</b>                                                                | <b>40</b> |
| 4.1        | RESUMO.....                                                                                                                                   | 40        |
| 4.2        | INTRODUÇÃO.....                                                                                                                               | 41        |
| <b>4.3</b> | <b>Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a propagação de brotos <i>in vitro</i> de <i>Schizolobium amazonicum</i> Huber Ex Ducke.....</b> | <b>42</b> |
| 4.3.1      | Material e Métodos.....                                                                                                                       | 42        |
| 4.3.2      | Resultados e Discussão.....                                                                                                                   | 43        |
| 4.3.3      | Conclusões.....                                                                                                                               | 47        |
| <b>4.4</b> | <b>Efeito da concentração de cinetina para obtenção de brotações em segmentos nodais de paricá.....</b>                                       | <b>47</b> |
| 4.4.1      | Material e Métodos.....                                                                                                                       | 47        |
| 4.4.2      | Resultados e Discussão.....                                                                                                                   | 48        |
| 4.4.3      | Conclusões.....                                                                                                                               | 51        |

|            |                                                                                  |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.4</b> | <b>Otimização da Micropropagação de paricá usando material de campo.....</b>     | <b>51</b> |
| 4.5.1      | Material e Métodos.....                                                          | 51        |
| 4.5.2      | Resultados e Discussão.....                                                      | 52        |
| 4.5.2.1    | Diferenciação dos Explantes em Brotações.....                                    | 52        |
| 4.5.2.2    | Diferenciação e Desenvolvimento do Sistema Radicular a Partir das Brotações..... | 56        |
| 4.5.3      | Conclusões.....                                                                  | 56        |
|            | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                           | <b>57</b> |
|            | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                 | <b>60</b> |

**LISTA DE TABELAS**

|           |                                                                                                                                                             |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. | Composição do meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962).....                                                                                                 | 22 |
| Tabela 2. | Resumo da análise de variância de germinação de sementes.....                                                                                               | 23 |
| Tabela 3. | Comportamento germinativo de sementes de paricá.....                                                                                                        | 25 |
| Tabela 4. | Intensidade de oxidação em segmento caulinar de paricá em função de diferentes antioxidantes.....                                                           | 32 |
| Tabela 5. | Resumo da análise de variância para presença de oxidação em segmento caulinar de paricá em função da concentração de nitrato de amônia e antioxidantes..... | 34 |
| Tabela 6. | Resumo da análise de variância para o número e comprimento de brotações em função das concentrações de BAP.....                                             | 43 |
| Tabela 7. | Resumo da análise de variância para o número e comprimento de brotações de paricá em função do efeito das concentrações de KIN.....                         | 48 |

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1  | Aspecto de Sementes (a); Ramos com flores (b); Flores (c) e Folha (d) da árvore de <i>Schizolobium amazinicum</i> Huber Ex Ducke.....                                                                                                     | 13 |
| Figura 2  | Plântulas de paricá germinadas <i>in vitro</i> em diferentes estádios de desenvolvimento após 5 dias de inoculação.....                                                                                                                   | 24 |
| Figura 3  | Número de plântulas de paricá com 15 dias após a inoculação.....                                                                                                                                                                          | 25 |
| Figura 4  | Representação gráfica e equação de regressão para oxidação em explantes de paricá cultivados em meio MS com diferentes concentrações de nitrato de amônia com adição de ácido cítrico e ácido ascórbico.....                              | 35 |
| Figura 5  | Aspectos da formação de calos, brotos e oxidação em segmentos nodais de paricá em meio de cultura básico MS, na presença de antioxidantes.....                                                                                            | 36 |
| Figura 6  | Efeito de diferentes concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de BAP no número médio de brotações de paricá induzido em meio MS.....                                                                                                          | 44 |
| Figura 7  | Efeito de diferentes concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de BAP no comprimento de brotos de paricá induzido em meio MS.....                                                                                                              | 46 |
| Figura 8  | Aspectos de brotações de paricá a partir de segmentos nodais em meio MS suplementado com BAP. A) Início de lançamento de brotos com presença de calo; B) Alongamento de brotos no meio $\frac{1}{2}$ MS sem regulador de crescimento..... | 47 |
| Figura 9  | Efeito de diferentes concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de KIN no número médio de brotações de paricá induzidas em meio MS.....                                                                                                         | 49 |
| Figura 10 | Efeito de diferentes concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de KIN no comprimento de brotos de paricá induzidos em meio MS modificado.....                                                                                                  | 50 |
| Figura 11 | Brotações de paricá a partir de segmentos nodais em meio MS modificado suplementado com KIN. A) Brotações com presença de calos e lenticelas; B) Brotação com presença de calos e início de oxidação na base dos explantes.....           | 51 |
| Figura 12 | Aspecto de brotações de estacas com 10 dias de cultivo em câmara úmida..                                                                                                                                                                  | 53 |
| Figura 13 | Aspecto de brotações. A) Broto proveniente de semente; B) Broto oriundo de material de campo rejuvenescido.....                                                                                                                           | 54 |
| Figura 14 | Aspecto de proliferação de brotações.....                                                                                                                                                                                                 | 55 |
| Figura 15 | Brotos com 45 dias de cultivo em condições de serem transferidos para formação de sistema radicular.....                                                                                                                                  | 55 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AIB - Ácido indol butírico

AA - Ácido ascórbico

AC - Ácido cítrico

BAP - 6-benzilaminopurina

CA - Carvão ativado

AG<sub>3</sub> - Ácido giberélico

HCl - Ácido Clorídrico

KIN - Cinetina

MS - Murashige e Skoog (1962)

MS/2 - Metade da força do meio MS

NaOH - Hidróxido de Sódio

NaOCl - Hipoclorito de Sódio

pH - Concentração de hidrogênio

PVP - Polivinilpirrolidone

## CAPITULO I - INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 RESUMO GERAL

A ausência de material genético melhorado de paricá se apresenta como entrave para plantios de árvores com características superiores que possibilitem a exploração econômica da espécie. Assim sendo, as diversas técnicas de cultura de tecidos apresentam-se como alternativa para micropropagação de genótipos de alto valor comercial. O trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo básico para micropropagação de paricá, avaliar as respostas morfogênicas de explantes de paricá quando submetidos a diferentes condições de cultivo *in vitro*; e adequar o protocolo para plantas advindas do campo. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Para a germinação de sementes e obtenção de explantes assépticos foi avaliado o meio de cultura básico MS na presença e ausência de AG<sub>3</sub>. Para o estudo de oxidação foram utilizados segmentos nodais em meio MS adicionado com os antioxidantes ácido cítrico, PVP, carvão ativado e ácido ascórbico e, MS com as concentrações de nitrato de amônio reduzido a 0, ¼ e ½, com adição de ácido cítrico e ácido ascórbico. Nos dois experimentos o meio de cultura foi suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Para o estudo da capacidade de regeneração direta foram utilizados segmentos nodais de plântulas obtidas *in vitro*. Os explantes foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP e MS com a concentração de nitrato de amônio reduzido a ¼ e suplementado com 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de Cinetina. Para otimizar o protocolo de micropropagação foram utilizados como explantes tecidos rejuvenescidos, coletados das árvores matrizes do reflorestamento da fazenda Tramontina. Os resultados obtidos permitiram verificar que as sementes de paricá apresentaram acelerado processo de germinação *in vitro* independente do meio de cultura utilizado proporcionando a produção de explantes assépticos para serem utilizados no processo inicial de micropropagação; a presença de AG<sub>3</sub> no meio básico MS contendo a metade das concentrações de sais de macro e micronutrientes não se faz necessário para emergência de plântulas de paricá *in vitro*. Os antioxidantes PVP e carvão ativado não são indicados para redução da oxidação no paricá. Os segmentos nodais apresentaram menor intensidade de oxidação em meio MS com a concentração de nitrato de amônio reduzido a ½ na presença do regulador de crescimento não havendo diferença entre os antioxidantes ácido cítrico e ácido ascórbico. Para indução de brotação o meio de cultura mais eficiente foi o MS acrescido com 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Foi observado tendência de diminuição no comprimento dos brotos com o aumento da citocinina no meio de cultura. As brotações foram multiplicadas e transferidas para meio de enraizamento. Os resultados deram suporte para propagação *in vitro* com material advindo do campo.

**Palavras-chave:** *Schizolobium amazonicum*; Antioxidantes; Regulador de Crescimento; Micropropagação; Cultura de Tecidos.

## ABSTRACT

The absence of improved genetic plants of parica presents itself as impediment for cultivate with trees with superior characteristics that make possible the economic exploration of the species. Thus being, the diverse techniques of fabric culture are presented as alternative for micropropagation of genotypes of high commercial value. The work had as objective to establish a basic protocol for parica propagation, evaluate the morphogenetic answers of explants when submitted the different conditions of culture *in vitro* and to adjust the protocol for happened plants of the field. The experiments had been lead in the Genetic laboratory of Resources and Biotechnology of Embrapa Eastern Amazonia, Belem, Para. For germination of seeds and attainment of aseptic explants the basic medium MS was evaluated in presence and GA<sub>3</sub> absence. For the oxidation study nodal segments in medium MS had been used added with antirust substances acid citric, PVP activated charcoal and ascorbic acid and MS with the reduced ammonium nitrate concentrations the 0, ¼ and ½, with citric acid addition of and ascorbic acid. In the two experiments the medium culture was supplemented with 3 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. For the study of the direct capacity regeneration nodal segments of plantlets had been used gotten *in vitro*. The explants had been cultivated in MS medium supplemented with different BAP and MS concentrations with the reduced ammonium nitrate concentration ¼ and supplemented with 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 and 3,0 mg.L<sup>-1</sup> of kinetin. To optimize the parica clonal micropropagation protocol developed with sights to produce clones of first plant. They had been used as younger explants fabrics, collected of the first trees of the area of reforestation of the Tramontina farm. The gotten results had allowed to verify that the seeds of parica present fast *in vitro* germination process independent of the used culture medium providing the production of aseptic explants to be used in the initial process of micropropagation; the presence of GA<sub>3</sub> in basic medium MS contend the half of the concentrations of macro and micronutrients not if vitro makes necessary for emergency of plantlets of parica *in vitro*. The antirust substances PVP and activated charcoal are not indicated for reduction of the oxidation in parica. The nodal segments had presented less intensity of oxidation in MS with the reduced ammonium nitrate concentration ½ in presence of the growth regulator not having difference between antirust substances citric acid and ascorbic acid. For shoot induction the medium MS supplemented with 3 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. A trend of reduction in the length of the shoots with the increase of the citocinine in the medium was observed. The shoots had been multiplied and transferred to rooting. The results got support to *in vitro* propagation with happened plants of the field.

**Key words:** *Schizolobium amazonicum*; Germination; Antioxidant; Growth Regulator; Micropropagation; Tissue Culture.

## 1.2 APRESENTAÇÃO

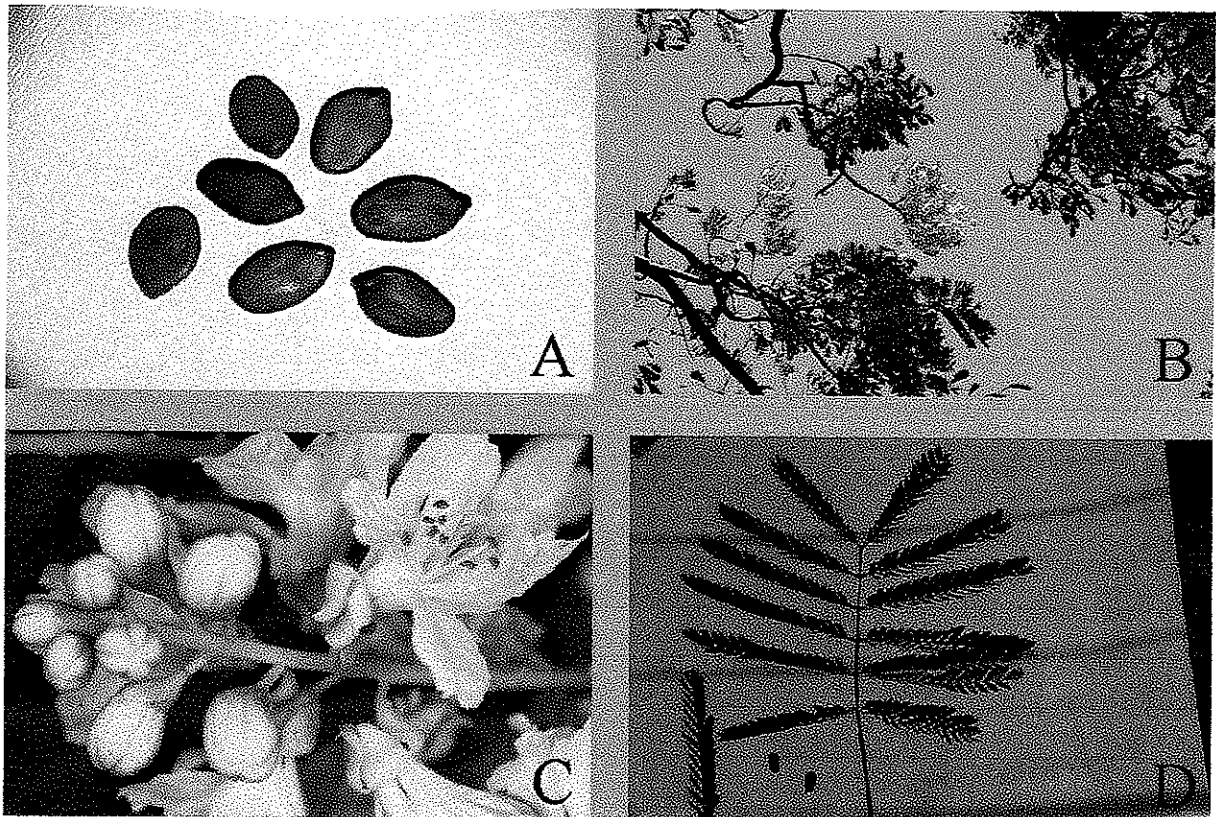
A atual situação que o Estado do Pará vivencia, originada pelas rápidas e substanciais alterações sofridas com o crescimento da comercialização dos produtos derivados da madeira e da implantação de grandes projetos minerometalúrgicos, tem sido destaque no cenário mundial, onde tem prevalecido a preocupação com a sustentabilidade da exploração desses recursos. Todo esse processo de mudança tem levado, pesquisadores, empresários e o governo a buscar alternativas de melhoria na produtividade dos povoamentos florestais. Assim sendo, um dos itens fundamentais da política ambiental do Estado reside no estímulo às ações de reflorestamento, reincorporando, desta maneira ao sistema produtivo áreas degradadas, visando atender a demanda futura, sem contudo causar danos ao meio ambiente.

Neste sentido, investigações a respeito de espécies florestais, de rápido crescimento, têm avançado constantemente, sobretudo no que se refere a multiplicação rápida de uma determinada espécie e a uniformização de atributos tecnológicos da madeira. A estratégia de produzir material genético melhorado de espécies florestais é de grande importância e foi incorporada aos princípios que integram a Agenda 21, que em seu Capítulo 11 – Combate ao Desflorestamento – prevê uma série de atividades, entre elas a melhoria genética e sanitária (Martins e Neto, 1998), o que contempla o presente trabalho.

Em virtude da espécie florestal *Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke (paricá), está sendo largamente cultivada em plantios de reflorestamento devido aos atributos tecnológicos de sua madeira, destinada a: fabricação de forros, palitos, fósforos, papel, compensados, pasta de celulose, laminados de alta qualidade (Melo *et al*, 1983) é que se vem buscando, de forma bastante acelerada, a propagação de plantas que sejam superiores em características desejáveis, tais como: volume, resistência a pragas e doenças, qualidade do fuste, quantidade de casca, densidade da madeira, rendimento e qualidade de celulose, dentre outros parâmetros que variam de acordo com a finalidade que se deseja a madeira, para que haja melhoria da produtividade e a qualidade dos povoamentos de paricá.

A espécie de *Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke, é conhecida vulgarmente como Paricá, Pinho Cuiabano e Faveira, entre outros. Pertence a classe das Dicotiledôneas, família Leguminosae, tribo Caesalpinieae (Vidal e Vidal, 2000). Ocorre em uma gama de condições ambientais que vão desde áreas de terra firme, até as de várzea alta em solos de alta e baixa fertilidade (Pereira *et al*, 1982). Toda essa diversidade ambiental concentra-se na Amazônia Brasileira, apresentando também ocorrências no Peru e na Colômbia (Medina, 1966).

Árvore de grande porte podendo alcançar até 30 m de altura, com ramificação cimosa e copa mediana, características morfológicas que propiciam a preferência dos pássaros João-de-barro (Kuhlmann, 1947) e japiins para instalação de seus ninhos. Segundo Albuquerque (1995), a árvore é muito parecida com o *Schizolobium parahyba*, distinguindo-se desta por florescer sem folhas e pelas flores e frutos duas vezes menores, bem como pelas pétalas oblongas, mais firmes e glabras; as folhas atingem até dois metros na fase jovem. A inflorescência ocorre de junho a agosto cuja flor possui cálice creme-esverdeado e corola amarela, sendo seu principal vetor de polinização as abelhas (Venturieri, 2000). O período de frutificação é de outubro a novembro e seu fruto tem semente oblongo-achatada, com testa negra, glabra, fosca e levemente áspera, com hilo circular (Figura 1).



**FIGURA 1** – Aspecto de Sementes (A); Ramos com flores (B); Flor (C) e Folha (D) da árvore de *Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke. Embrapa Amazônia Oriental. Belém - PA, 2002.

Sua madeira é branca, mole e leve com  $0,30 \text{ g/cm}^3$  (Menezes Filho *et al*, 1995). Nas plantas jovens a casca é verde e quando adultas sua casca apresenta-se esbranquiçada. A germinação da semente de paricá é epígia criptocotilar, iniciando ao quarto dia após o semeio, a qual é favorecida pelos processos de escarificação mecânicos, físicos ou químicos. É pouco

exigente em fertilidade, podendo ser utilizada em reflorestamentos mistos, recomposição de áreas depauperadas, substituir plantios de espécies exóticas de baixo desenvolvimento.

A propagação convencional ou sexual de espécies florestais é de grande importância no estabelecimento de programas de melhoramento genético porque garante a biodiversidade, no entanto, apresenta como inconveniente o fato de produzir plantas muito heterogêneas com povoamentos de baixa produtividade. Este problema pode ser superado através da multiplicação de forma assexual, que gera material clonal com características desejáveis (Delwaulle, 1983). Cada planta, individualmente produzida pelo método assexual, é, na maioria das vezes, geneticamente idêntica a planta-mãe, constituindo, assim, o motivo da aplicação da micropropagação.

A cultura de tecidos, além de se constituir importante ferramenta auxiliar do melhoramento florestal, principalmente na formação de pomares de sementes, presta outras importantes contribuições no sentido da obtenção de materiais superiores, livres de patógenos além de exigir menor espaço e tempo (Mantell, 1994). Outro ponto importante é que esta propagação pode ser feita em qualquer época do ano, independentemente das limitações de natureza sazonal, desde que lhes sejam fornecidas condições apropriadas (Pasqual, 1985).

Os tipos de cultivo *in vitro* utilizados para propagação de espécies lenhosas não diferem muito dos tipos utilizados para outra espécie de planta, todavia o estabelecimento de espécies lenhosas é mais difícil se comparadas com as herbáceas (Pierik, 1990).

Na sua grande maioria, os trabalhos de regeneração de plantas lenhosas, têm sido desenvolvidos com explantes juvenis oriundos de sementes, em virtude do raro sucesso em tecidos maduros, especialmente em árvores e arbustos. Pierik (1990) explica que o processo é mais difícil de ocorrer nestes casos, devido a perda gradativa da capacidade regenerativa de plantas, por isso tende-se a utilizar material procedente de plantas jovens, em especial embriões e sementes. Apesar da dificuldade de regeneração de explantes de espécies lenhosas, Bonga e Durzan (1987c) relatam que os primeiros tipos de cultivos foram experimentalmente utilizados com sucesso.

No Brasil, várias empresas do setor florestal têm utilizado a micropropagação isolada ou integrada a outros métodos de propagação, visando a produção de clones selecionados para o melhoramento genético, produção em larga escala com vistas ao reflorestamento, produção bioenergética e para uso paisagístico. Em muitos casos a regeneração de plantas tem sido obtida com sucesso em várias espécies lenhosas, como é o caso do *Eucalyptus* spp. A maioria dos protocolos desenvolvidos em cultura de tecidos de espécies florestais envolve coníferas entretanto, pesquisadores como Franco *et al.* (1996), Lopes (2000) e Lameira *et al.* (2000)

vêm desenvolvendo estudos com as espécies tropicais de *Schefflera morototoni* (morototó), *Swietenia macrophylla* (mogno) e *Cedrela odorata* (cedro), respectivamente. Há de se ressaltar que a preferência pelo paricá reside em algumas vantagens, tais como: rápido crescimento, habilidade de regeneração após o corte, relativamente imune a pragas e doenças. Estes fatos aliados a variabilidade existente entre as mudas produzidas pelo método tradicional despertou o interesse de empresas e pesquisadores para o estudo de potencialidade da técnica de micropropagação da espécie.

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* consiste na reprodução de plantas idênticas à planta mãe pela capacidade natural da multiplicação vegetativa das espécies, entretanto, grande parte do sucesso da micropropagação depende dos meios nutritivos utilizados para a cultura de células, de tecidos e órgãos de plantas (Ferreira *et al*, 1998). George (1993a) relata que os meios baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações que forneçam substâncias essenciais para o crescimento e ao mesmo tempo controlam em grande parte o padrão de desenvolvimento. O tipo de explante (ápices caulinares, segmentos nodais e internodais) utilizado no sistema de micropropagação é importante, pois determina a rapidez e eficiência do processo. Hussey (1980) afirma que o número de propágulos teoricamente a obter, começando por um broto simples ou explante, está entre  $10^3$  a  $10^6$  ou mais por ano, dependendo da espécie. Em vários tecidos cultivados *in vitro* a utilização de substâncias reguladoras de crescimento é de fundamental importância para o estabelecimento da competência e determinação.

Em espécies lenhosas, um dos fatores que dificultam o estabelecimento do processo de micropropagação é a presença de substâncias oxidantes. O escurecimento dos explantes se deve muito provavelmente aos compostos fenólicos que são liberados quando os tecidos são feridos. O processo oxidativo nestas espécies pode estar relacionado a certos eventos como intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura e a concentração dos sais minerais do meio de cultura provocando a perda do material vegetal. Para Torres *et al* (1999) além dos fatores citados, a idade fisiológica do explante, o nível endógeno de fitorreguladores, a presença de agentes gelificantes, influenciam consideravelmente na intensidade de oxidação da espécie a ser cultivada.

Considerando o estágio atual das pesquisas, a empresa Tramontina Belém S.A visualiza a necessidade de aprimorar cada etapa da cadeia produtiva, em diferentes fases e processos vislumbrando o aumento da produtividade da espécie e alavancando o interesse empresarial em termos de investimento. Ademais, a clonagem proporcionará diferentes técnicas de cultivo, do mesmo modo que dará um salto qualitativo e quantitativo na

propagação vegetativa e na regeneração de espécies de grande interesse comercial. É importante ressaltar, também, que o interesse da referida empresa em continuar pesquisando a espécie, se relaciona aos resultados observados e constatados em seus plantios, localizados no Município de Aurora do Pará (PA).

Dentro desse panorama e considerando a carência de estudos sobre a micropropagação da espécie, este trabalho teve como objetivo geral avaliar as respostas morfogênicas de paricá e como objetivos específicos:

- identificar a melhor condição *in vitro* para germinação de sementes;
- determinar uma metodologia para o controle da oxidação *in vitro*;
- testar concentrações de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro*; ajustar e otimizar a metodologia estabelecida para micropropagação de paricá usando material de campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, J.M. de. **Notas de aula prática do curso de sistemática vegetal**. Belém: FCAP. 1995. 13p. (apostila)
- BONGA, J.M., DURZAN, D.J. **Cell and tissue culture in forestry. Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms**. 1ª edição. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishes, 1987c. 3º volume.
- DELWAULLE, J.C., **Création et Multiplication Végétative par bouturage d'Eucalyptus hybrids en République Populaire de Congo**. *Silvicultura* 8: 775-778. 1983.
- FERREIRA, M. E., CALDAS, L. S., PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.N., BUSO, J. A (Eds.). **Cultura de Tecidos e transformação Genética de Plantas**, Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.21-43.
- FRANCO, E. T. H.; MONTOVANI, N. C.; STEFANCELO, S.; ANGONESI, L. G.; VESTENA, S. **Reunião Estadual de Biotecnologia Vegetal**. Porto Alegre-RS, 1996. Livro de resumos.
- GEORGE, E. F. Factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E. F.(ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993c. Cap.8. p.231-272.
- HUSSEY, G. *In vitro* propagation. In: INGRAND. D. S.; HELGESON, J. P. **Tissue culture methods for plant pathologist**. Blackwell Scientific Publication. 1980. p.51-61.
- KUHLMANN, M., **A flora do distrito de Ibiti**. São Paulo: SAGRI- Instituto Botânico, 1947.
- LAMEIRA, O. A.; GOMES, A. P. do R.; LOPES, S. da C.; LEÃO, N. V. M. **Efeito da escarificação sobre a germinação de sementes de paricá (*Schizolobium amazonicum*) in vitro**. EMBRAPA, Comunicado Técnico 21. Belém, Pará, 2000.
- LAMEIRA, O. A.; GOMES, A. P. do ROSÁRIO; LOPES, S. da C. **Efeito da sacarose e luminosidade sobre a germinação in vitro de embriões de cedro**. Comunicado Técnico. nº 20, julho/00, p.1-3. Embrapa Amazônia Oriental.
- LOPES, S. da C. **Micropropagação de Mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Pelotas: UFP, 2000. 53p. Dissert. (Mestrado em Fisiologia vegetal)
- MANTELL, J. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: Uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.
- MARTINS. I. D. M. & NETO, F. C. **Programa Nacional de Sementes Florestais Nativas**. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Secretaria de Implantação de Políticas e Normas Ambientais (SIPNA) Departamento de Articulação e Coordenação e Instrumentos de Política Ambiental (DACIPA). Paragominas-Pa. 1998.
- MEDINA, J. C., **Flora do Brasil**: dicotiledôneas arbóreas úteis. [s.l.]: [s.n.], 1966.vol.

MENEZES, F. L. C.; FERRAZ, P.A.; PINHA, J.F.M.; FERREIRA, L.A.; BRILHANTE, N.A. **Comportamento de 24 espécies arbóreas tropicais madeireiras introduzidas no Parque Zoobotânico, Rio Branco-ACRE**. Rio Branco: UFAC/PZ, 1995.v.1

MELO, J. E. de; CARVALHO, G. M. de; MARTINS, V. A. **Espécies madeireiras substitutas do mogno**(*Swietenia macrophylla* King.). Brasília:IBAMA,1983.16p. (Série Técnica, 6)

PASQUAL, M. Obtenção de plantas por cultura de tecidos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 11 (124): 63-8, abr. 1985.

PEREIRA, A. P., MELO, C. F.M. de., ALVES, S.M., O paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber), características gerais da espécie e suas potencialidades de aproveitamento na indústria de papel e celulose. **Revista Instituto Florestal**. São Paulo. V.16<sup>A</sup>, n.2 p.1340-1344, 1982. (Trabalho apresentado no Congresso sobre essências nativas, São Paulo, set, 1982).

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Tradução por Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. 3ª ed. Madrid: EDICIONES Mundi-Prensa, 1990. 326p. Cap. 12, Tradução de: *In vitro* culture of higher plants.

TORRES, A. C., CALDAS, L. S., FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas, In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1996. v.1, p.11-20.

VENTURIERI, G. C., A ecologia reprodutiva do taxi-branco (*Sclerobium paniculatum* var. *paniculatum* Vogel) e do paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) LEG: **Caesalpinoideae e a influência da melitofilia na polinização dessas árvores amazônicas**. São Paulo. 2000 (Tese de Doutorado)

VIDAL, W. N. e VIDAL, M. R. R., **Taxonomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2000. 89p. (Cadernos didáticos, 57).

## CAPITULO II - GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke)

### 2.1 RESUMO

O objetivo desse trabalho foi induzir a germinação de paricá *in vitro* em dois diferentes meios de cultura, visando obtenção de plântulas como fonte de explantes sadios para o processo inicial de micropropagação. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-Pará. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com dois tratamentos e dez repetições, sendo cada unidade experimental constituída de dez tubos de ensaio com uma semente por tubo. Foram utilizados meio de cultura básico MS, com a metade das concentrações de sais de macro e micronutrientes, suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, adicionado com 0,1 de PVP e 0,6% de ágar. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 utilizando-se NaOH e/ou HCl em solução 0.5 N. A assepsia foi realizada com detergente comercial e NaOCl a 3%. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os dois tratamentos adotados, indicando que a espécie apresenta eficiente germinação independente do meio de cultura utilizado. A presença do AG<sub>3</sub> no meio básico, não se faz necessário para emergência de plântulas. A germinação *in vitro* propicia a produção de explantes assépticos para serem usados no processo inicial de micropropagação.

### ABSTRACT

The objective of this work was to induce the germination of parica *in vitro* in two different ways of culture, aiming at attainment of plantlets as source of healthy explants for the initial micropropagation process. The work was developed in the Laboratory of Genetic Resources and Biotechnology of the Embrapa Eastern Amazonia, Belem-Para. The experimental delineation was entirely to with two treatments and ten repetitions, perhaps being each experimental unit consisting of ten pipes of assay with a seed by pipe. They had been used half of basic culture MS, with half macro and micronutrients concentrations, supplemented with 3 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, added with 0,1 of PVP and agar 0.6%. Ways PH was adjusted for 5,8 using NaOH and/or HCl in solution 0,5 N. The asepsis was carried through with commercial detergent and NaOCl 3%. The results had indicated that it did not have significant difference between the two adopted treatments, confirming that the species presents efficient independent germination of the used way of culture. The presence of the GA<sub>3</sub> in the basic way, if does not make necessary for emergency of plantlets. The germination *in vitro* propitiates the production of aseptic explants to be used in the initial micropropagation process.

## 2.2 INTRODUÇÃO

O *Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke, vulgarmente conhecido como paricá, é uma das espécies madeireiras da região amazônica que foi identificada por Costa *et al.*, (1998) como de grande potencial para plantios em áreas degradadas, reflorestamento e em sistemas agroflorestais. Para garantir o pleno sucesso da sua utilização em plantios comerciais, pesquisas em diversas linhas vêm sendo desenvolvidas visando propiciar maior produtividade de sua madeira.

As sementes de paricá apresentam elevado percentual de germinação (Nepstad *et al.*, 1982), principalmente, se forem viáveis e submetidas a processos de escarificação mecânicos, físicos ou químicos que abreviem o processo. No entanto, a maioria dos estudos relacionados com a germinação dessa espécie se refere basicamente ao método tradicional, porém, atualmente, com o crescente interesse pela espécie, pesquisas sobre a germinação *in vitro* vêm sendo desenvolvidas. É importante ressaltar que, a vantagem da germinação de sementes *in vitro* quando comparadas com as plântulas germinadas pelos métodos convencionais é a garantia de uma germinação rápida e uniforme, além do que, as plântulas obtidas são saudáveis e apresentam crescimento inicial superior.

Germinação – Do Latim *germinatio* - que pode ser definida como o início do desenvolvimento de um novo indivíduo vegetal, a partir de uma semente colocada sob condições favoráveis (Larousse, 1998) dando origem a uma plântula normal (Filho *et al.*, 1987). Labouriau (1983) define botanicamente como um fenômeno biológico com uma série de conversões metabólicas que levam ao rompimento do tegumento pela radícula. Do ponto de vista dos tecnólogos de semente, o processo é reconhecido desde que as plântulas apresentem tamanhos suficientes, para que possam avaliar a normalidade de suas partes e a sua possibilidade de sobrevivência.

Conforme Borges e Rena (1993), para ocorrer a retomada do crescimento das estruturas essenciais do embrião (germinação), a semente deve estar madura, ser bem constituída e ter conservado o poder germinativo e ao mesmo tempo deve receber do meio exterior água e oxigênio em quantidade suficiente para assegurar um intenso metabolismo. Por outro lado, Mayer e Poljakoff-MAYBER (1989) afirmam que fatores como composição química e balanço hormonal influenciam sobremaneira no processo germinativo.

Temperatura, disponibilidade de água, luz, são fatores ambientais que influenciam consideravelmente no processo de germinação, sendo que a quantidade desses fatores varia

de acordo com as espécies e cultivares. De acordo com Carvalho e Wakagawa (1988), quando a temperatura é elevada maior absorção de água ocorrerá, afetando significativamente na germinação. Por outro lado, Evanari (1965) considera o elemento luz essencial no processo, visto que é indicador de classificação de espécies. O mesmo autor designa a sensibilidade das sementes a luz como fotoblastismo positivo ou negativo. Desse modo, Gomes (1999) afirma que condições ambientais apropriadas para o processo de germinação podem ser fornecidas em laboratórios.

Considerando que as sementes de paricá, uma vez escarificadas, possuem eficiência de germinação independente do uso do meio de cultura, o presente trabalho teve como objetivo induzir a germinação da semente de paricá, *in vitro* em dois diferentes meios de cultura, visando a obtenção de plântulas uniformes, como fonte de explantes saudáveis para o processo inicial de micropropagação.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental. As sementes de paricá utilizadas eram de procedência das populações do município de Ji-Paraná, no Estado de Rondônia e foram doadas pela empresa Tramontina Belém S.A.

As sementes de paricá foram escarificadas mecanicamente com lixa e colocadas em becker com 100 ml de água. Na bancada do laboratório foram submetidas a várias lavagens com água corrente e detergente comercial. Na câmara de fluxo laminar, previamente esterelizada com álcool a 70%, as sementes foram imersas em solução de NaOCl a 3%, por dez minutos, sendo cinco minutos em agitação e lavadas por cinco vezes com água destilada e autoclavada. Após a lavagem, as sementes foram distribuídas em placas de Petri e posteriormente inoculadas no meio de cultura.

Para o tratamento um, o meio de iniciação foi composto do meio de cultura básico MS estabelecido por Murashige e Skoog, 1962 (Tabela 1) contendo a metade das concentrações de sais de macro e micronutrientes, suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, adicionado com 0,1% de PVP e 0,6% de ágar e no tratamento dois foi utilizado o mesmo meio de cultura na ausência de AG<sub>3</sub>. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, utilizando-se NaOH e/ou HCl em solução de 0,5 N. Os meios de cultura foram distribuídos na quantidade de 10 ml por tubo de ensaio de 20 x 150 mm. A autoclavagem foi realizada a

120°C e 1,2 atm durante 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar previamente esterelizada com álcool 70 % e com auxílio de placas de Petri e pinças, esterelizadas em autoclave durante 20 minutos, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio. Após a inoculação das sementes, os tubos de ensaio foram tampados com forminhas de alumínio de dimensão 24 x 16 mm, lacrados com parafilm e mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz, irradiância de  $25\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25^\circ\text{C} + 1^\circ\text{C}$ .

**TABELA 1 - Composição do meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962)**

| Composto                                 | Concentração<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | Solução estoque (SE) |            | Volume (SE) /1000ml |
|------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|------------|---------------------|
|                                          |                                       | Concentração         | mg/1000ml  |                     |
| <b>Macronutrientes</b>                   |                                       |                      |            |                     |
| (1) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 1,650                                 | 50 X                 | 82,500     | 20 ml               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>          | 170                                   | 50 X                 | 8,500      |                     |
| (2) KNO <sub>3</sub>                     | 1,900                                 | 50 X                 | 95,000     | 20 ml               |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O     | 370                                   | 50 X                 | 18,500     |                     |
| (3) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 440                                   | 50 X                 | 22,000     | 20 ml               |
| <b>FeEDTA</b>                            |                                       |                      |            |                     |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O     | 27,8                                  | 100 X                | 2,780      | 10 ml               |
| Na <sub>2</sub> EDTA                     | 37,3                                  | 100 X                | 3,730      |                     |
| <b>Micronutrientes</b>                   |                                       |                      |            |                     |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O     | 22,3                                  | 100 X                | 2,230      | 10 ml               |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O     | 8,6                                   | 100 X                | 860        |                     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>           | 6,2                                   | 100 X                | 620        |                     |
| KI                                       | 0,83                                  | 100 X                | 83         |                     |
| NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O    | 0,25                                  | 100 X                | 25         |                     |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O     | 0,025                                 | 100 X                | 2,5        |                     |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O     | 0,025                                 | 100 X                | 2,5        |                     |
| <b>Vitaminas</b>                         |                                       |                      |            |                     |
|                                          |                                       |                      | (mg/100ml) |                     |
| Tiamina-HCl                              | 0,10                                  | 500 X                | 5,00       | 2 ml                |
| Piridoxina-HCl                           | 0,50                                  | 500 X                | 25,00      |                     |
| Ácido nicotínico                         | 0,50                                  | 500 X                | 25,00      |                     |
| Glicina                                  | 2,00                                  | 500 X                | 100,00     |                     |
| Mio-inositol                             | 100,00                                | 500 X                | 5.000,00   |                     |
| <b>Fonte de carbono</b>                  |                                       |                      |            |                     |
| Sacarose                                 | 30,000                                | 3%                   |            |                     |
| PH                                       |                                       |                      |            | 5,8                 |

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado utilizando-se dois tratamentos que constaram de 100 sementes para cada tratamento, divididas em dez repetições. Cada unidade experimental foi constituída de dez (10) tubos de ensaio contendo uma semente por tubo. As observações foram feitas em dias intercalados até o décimo quinto

dia após a inoculação. Os dados referentes ao número de sementes germinadas e oxidação presente nos tubos foram tabulados. A análise estatística da variável de resposta 1, nº de sementes germinadas, foram transformadas pelo Arcseno  $\sqrt{x+0,5}$ , onde x é a percentagem de germinação, e para a variável de resposta 2, oxidação o percentual.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com análise de variância (Tabela 2), não houve diferença estatística entre os dois meios de cultura utilizados. Constatou-se que a metodologia adotada acelera o processo de germinação das sementes de paricá. Isto indica que a espécie apresenta melhor desempenho germinativo se comparada com espécies florestais que não apresentam boa germinação *in vitro* ou levam período mais longo para germinar, como é o caso da Sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth) e do Pau rosa (*Aniba roseodora* Ducke), estudadas por Coelho (1999) e França *et al.* (1997), respectivamente.

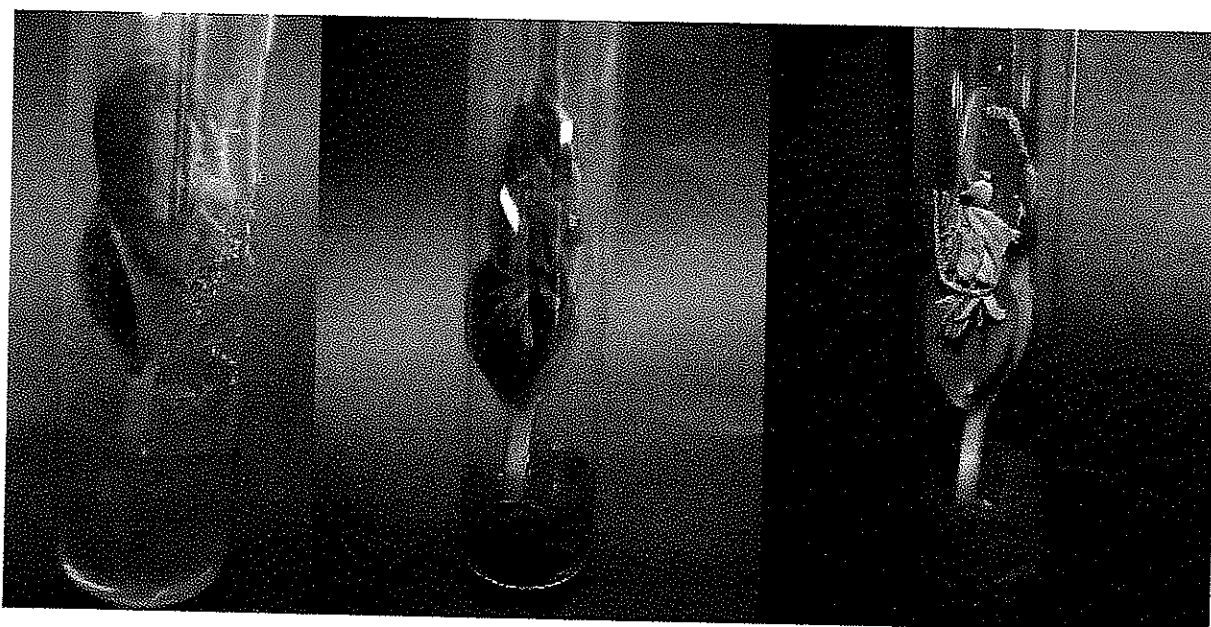
**TABELA 2 - Resumo da Análise de Variância de Germinação de Sementes**

| Fonte de Variação | G.L. | S.Q.    | Q.M.   | F                    |
|-------------------|------|---------|--------|----------------------|
| Meios de Cultura  | 1    | 17,00   | 17,00  | 0,1489 <sup>NS</sup> |
| Erro Experimental | 18   | 2054,99 | 114,16 | -                    |
| Total             | 19   | 2071,99 | -      | -                    |

NS - Não Significativo, ( $P > 0,05$ ) pelo teste F

O teste de germinação *in vitro* de sementes escarificadas de paricá possibilita detalhamento do comportamento da semente em diferentes meios de cultura. Geralmente, as sementes que sofrem escarificação apresentam altos índices de germinação e desenvolvimento quando comparadas com outros métodos de superação de dormência comumente utilizados em laboratórios. Este processo é propiciado pela embebição da semente que favorece o rápido metabolismo de germinação.

A partir do terceiro dia após a inoculação, as sementes começaram a germinar com o aparecimento do eixo embrionário. O epicótilo das plântulas apresenta crescimento rápido, sendo possível observar o surgimento de plântulas a partir do quinto dia. Resultados semelhantes foram obtidos por Lopes (2000), com o mogno (*Swietenia Macrophylla* King), no qual verificou que o surgimento de plântulas *in vitro*, em meio MS suplementado com vitaminas, inicia no sexto dia pós-inoculação. Na figura 2 é possível observar três estádios de desenvolvimento das plântulas após a germinação de sementes.



**FIGURA 2** - Plântulas de paricá germinadas *in vitro* em diferentes estádios de desenvolvimento após 5 dias de inoculação. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA, 2002.

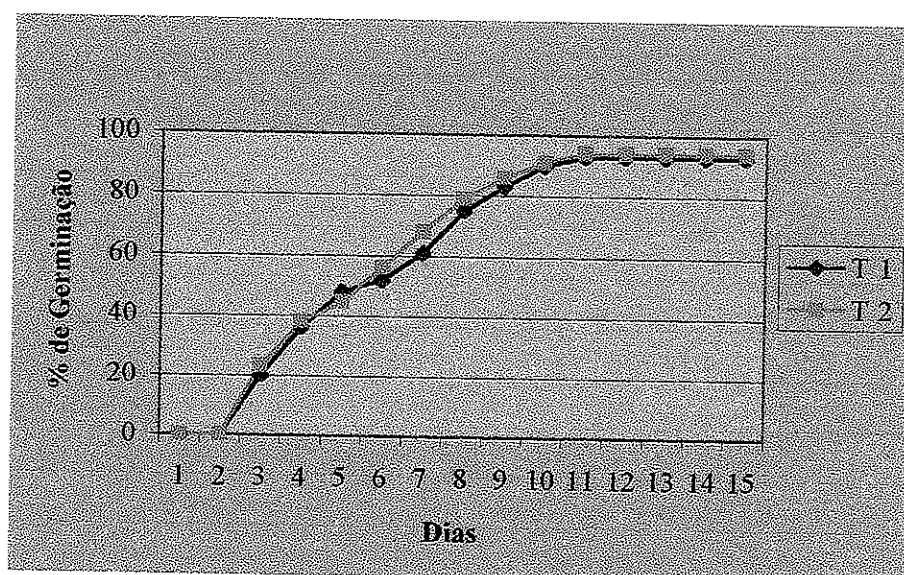
No sexto dia, foi observado que havia diferença quanto ao surgimento das radículas em relação aos dois diferentes tipos de meio de cultura, entretanto, no décimo primeiro dia quando 94 % das sementes já haviam germinado, as plântulas apresentavam uniformidade nas radículas. O estágio de plântulas completas foi alcançado ao final da 2ª semana de cultivo *in vitro*. A Tabela 3 proporciona melhor detalhamento do comportamento germinativo e do desenvolvimento das estruturas essenciais das plântulas.

A percentagem de germinação *in vitro* ao longo de quinze dias de cultivo foi de 94% para o tratamento contendo AG<sub>3</sub> e 93% para o tratamento na ausência desse regulador de crescimento. As sementes de paricá cultivadas na ausência de AG<sub>3</sub> tiveram desempenho germinativo semelhante ao tratamento contendo esse regulador de crescimento, no entanto, apresenta uma certa vantagem quanto à redução de custos.

**TABELA 3 – Comportamento germinativo de sementes de paricá**

| Intervalo (dias) | Germinação (%) | Observações                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 – 5            | 45             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• aparecimento do eixo embrionário;</li> <li>• exteriorização da radícula;</li> <li>• exposição do caulículo;</li> <li>• elevação dos cotilédones.</li> </ul>                                 |
| 6 – 10           | 76             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• desenvolvimento do meristema apical;</li> <li>• radícula transforma-se em raiz;</li> <li>• caulículo transforma-se em hipocótilo;</li> <li>• formação das folhas e do epicótilo.</li> </ul> |
| 11 – 15          | 94             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• formação de plântula completa.</li> </ul>                                                                                                                                                   |

De maneira geral a germinação, na proporção de plântulas emergidas, foi uniforme para os dois meios utilizados, atingindo a máxima germinação no décimo primeiro dia de cultivo (Figura 3). Similaridade de resultados foram obtidos por Lameira *et al.* (2000), em experimento com sementes de paricá, onde 96 % das sementes germinadas foram convertidas em plântulas



**FIGURA 3** - Número de plântulas de paricá germinadas *in vitro* com 15 dias após a inoculação. Embrapa Amazônia Oriental. Belém - PA, 2002.

Neste experimento, o cultivo das sementes de paricá *in vitro*, não apresentou contaminação, demonstrando que a aplicação de NaOCl no momento da assepsia eliminou a possibilidade de ocorrência de patógenos. Harry e Thorpe (1994) afirmam que às sementes de espécies tropicais, utilizadas para explantes devem passar por procedimento de desinfestação rigoroso, por causa do alto grau de contaminação natural, com a combinação de HgCl<sub>2</sub>, NaOCl e etanol.

A presença de PVP reduziu a oxidação em sementes de paricá a níveis não prejudiciais para a germinação, resultando todas as observações, nos dois meios de cultura testados, valores iguais a zero para a variável oxidação. Por essa razão, não foi realizada a análise de variância. Acredita-se assim, que o principal efeito do PVP no meio de cultura esteja relacionado com a capacidade de inibir a liberação de produtos fenólicos, os quais são prejudiciais aos tecidos cultivados *in vitro*. Segundo Siqueira e Inoque (1991), o processo de oxidação ocorre, principalmente com a intoxicação dos tecidos por fenóis liberados por tecidos recém-feridos.

As respostas fisiológicas das sementes de paricá desencadeiam processo de germinação uniforme e rápido. Portanto, a germinação de paricá nos meios utilizados possibilitou a produção de plântulas vigorosas e bem homogêneas, manifestando, dessa maneira, a capacidade da espécie em dar origem a uma plântula bem formada, nas condições de laboratório. Este resultado proporcionou a produção de explantes juvenis e assépticos para o estabelecimento de experimentos *in vitro*, levando a crer que a espécie apresenta potencial para o processo inicial de micropropagação.

## 2.5 CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho, conclui-se que:

- a) As sementes de paricá apresentam eficiente germinação *in vitro* independente do meio de cultura utilizado, não se fazendo necessário a presença de AG<sub>3</sub> no meio básico MS para emergência de plântulas;
- b) A presença de PVP reduziu a oxidação na germinação de sementes de paricá;
- c) A germinação *in vitro* de paricá proporciona a produção de explantes assépticos para serem utilizados no processo inicial de micropropagação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORGES, E. E. de L. & RENA, A. B. **Germinação de sementes**. In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES – Comitê Técnico de Sementes Florestais. 1993. c.3. p.83-135.
- CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988, 429p.
- COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]** Lavras: UFLA, 1999. 119p. Dissert. (Mestrado em Fitotecnia)
- COSTA, D. H. M.; REBELO, F. K.; D'AVILA, J. L.; SANTOS, M. A. S. dos.; LOPES, M. L. B., Alguns Aspectos Silviculturais sobre o paricá. Belém, 1998.23p. **BASA - Série rural**.2.
- EVENARI, M. Light and seed dormancy. In: W. Ruhland (ed.) **Encyclopedia of Plant Physiology**. Berlim: Spriger-Verlaag, 1965, v. 15, t.2, p.844-847.
- FILHO, M. J.; CÍCERO, M. S.; SILVA, W. R. da. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 320p.
- FRANÇA, R. B.; SANTOS, D. S. B.; MOTA, M. G. da C.; VIEIRA, I. M. da S., CABRAL, B. L. R. Indução e crescimento de plântulas de pau-rosa (*Aniba roseodora* Ducke) *in vitro*. In: REUNIÃO DOS BOTÂNICOS DA AMAZÔNIA, 2, Salinópolis, Pará, 1997. **Resumos...** Salinópolis, 1997. p. 54
- GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de moreira (*Maclura tinctoria*)** Lavras: UFLA, 1999. 92p. il. Dissertação (Mestrado)- UFLA, 1999.
- HARTMANN, H. T. & KESTER, D. E., **Propagação de Plantas, princípios e práticas**. Ed México Continental. 1976,810p.
- HARRY, I. S.; THORPE, T. A. In vitro culture of forest trees. In: VASIL, J. K.; THORPE, T. A. (eds). **Plant cell end tissue culture**. Dordrecht, 1994. Cap. 21, p.539-560.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. OEA: Washington, 1983. 174p.
- LAMEIRA, O. A.; GOMES, A. P. do R.; LOPES, S. da C.; LEÃO, N. V. M. Efeito da escarificação sobre a germinação de sementes de paricá (*Schizolobium amazonicum*) *in vitro*. **EMBRAPA, Comunicado Técnico 21**. Belém, Pará, 2000.
- LAROUSSE, **Grande Enciclopédia Delta**. Nova Cultural, vol.11, p.2701, 1998.
- LOPES, S. da C. **Micropropagação de Mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Pelotas: UFP, 2000. 53p. Dissert.(Mestrado em Fisiologia vegetal)
- MAYER, A. M. POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon Press, 1989. 210p.

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

NEPSTAD, D. & PEREIRA, C., Conceitualização: Extensão e contextualização de áreas alteradas da região amazônica, In: **Seminário Sobre Recuperação de Áreas Degradadas. Woods Hole Resesrch Center/ EMBRAPA - CPATU/SUDAM**. 1982.

SIQUEIRA, E. R. de, INOQUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.26, n 7, p.949-953, jul. 1991.

## CAPÍTULO III - OXIDAÇÃO *IN VITRO* DE PARICÁ

### 3.1 RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação de diferentes antioxidantes e concentrações de nitrato de amônio, na oxidação *in vitro* de paricá. Segmentos nodais foram submetidos a várias condições de cultura *in vitro*. Experimentos foram conduzidos no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, utilizando-se explantes, oriundos de plântulas obtidas *in vitro*. O primeiro experimento constou da avaliação de quatro antioxidantes: ácido cítrico; PVP; carvão ativado e ácido ascórbico no meio de cultura MS. No segundo testou-se a ação dos antioxidantes ácido cítrico e ácido ascórbico no meio MS com as concentrações de nitrato de amônia reduzida a  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  e 0. Nos dois experimentos os meios de cultura foram suplementados com  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, acrescido de 3 % de sacarose e solidificado com ágar. O material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância. Avaliou-se a intensidade de oxidação através do teste qui-quadrado e da análise de variância. Pelos dados obtidos, constatou-se que os antioxidantes ácido cítrico e ácido ascórbico, foram os mais eficientes na redução da oxidação, todavia não foi possível evitá-la e a interação entre esses ácidos no meio MS com nitrato de amônio reduzido a  $\frac{1}{2}$  apresentou-se como o mais indicado no controle da oxidação de paricá. Houve diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade na intensidade de oxidação dos explantes. Foram observadas formações de calos e proliferação de brotos.

### ABSTRACT

The objectives of this work were to evaluate the antirust substance action different and ammonium nitrate concentrations, in the oxidation of parica nodals segments had been submitted to some conditions of culture *in vitro*. Experiments had been lead in the Laboratory of Genetic Resources and Biotechnology of the Embrapa Eastern Amazonia, using themselves explants, deriving of plantlets gotten *in vitro*. The first experiment consisted of the evaluation of four antirust substances: acid citric; PVP; activated coal and acid ascorbic in the basic medium MS as tested it action of antirust substances acid citric and acid ascorbic in the half MS with the reduced ammonia nitrate concentrations  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  and 0. In the two experiments the medium basic of culture had been supplemented with  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$  of BAP, increased of 3 % of sucrose and made solid with agar. The material was kept in room of growth with photoperiod of 16 h of light and 25 luminous intensity of  $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  of irradiance. It was evaluated intensity of oxidation through the test qui squared and of the analysis of variance. For the gotten data, one evidenced that antirust substances acid citric and acid ascorbic, had been most efficient in the reduction of the oxidation, however it was not possible to prevent it and the interaction enters this acid in the half MS with reduced ammonium nitrate  $\frac{1}{2}$  was presented as the most indicated in the control of the parica oxidation. It had significant differences to the level of 5% of probability in the intensity of oxidation of the explants. Formations of calluses and proliferation of shoots had been observed.

### 3.2 INTRODUÇÃO

A regeneração *in vitro* vem sendo utilizada com muita frequência, constituindo-se uma prática rotineira para a produção de plantas mais homogêneas e livres de doenças, levando ao significativo incremento na produtividade de algumas espécies. Entretanto, as plantas lenhosas, como o paricá, apresentam maiores dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, se comparada com as herbáceas. Dentre os fatores considerados mais sérios ao estabelecimento da cultura de tecidos, destaca-se a oxidação no material vegetal.

Fortes (1992), relata que o processo oxidativo em espécies lenhosas pode está relacionado a certos eventos como intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura e a concentração dos sais minerais do meio de cultura, especialmente o nitrogênio, a partir do nitrato de amônio. Para Torres *et al* (1999) além dos fatores citados, a idade fisiológica do explante, o nível endógeno de fitoreguladores, a presença de agentes gelificantes, influenciam consideravelmente na intensidade de oxidação da espécie a ser cultivada.

O escurecimento do tecido também tem sido atribuído a liberação de compostos fenólicos durante a excisão dos explantes inibindo o crescimento da plântula, levando-a morte. Conforme Andrade *et al* (2000) as plantas lenhosas acumulam polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e absorção dos metabólitos.

Para o controle da oxidação, diversos mecanismos têm sido adotados como: pré-tratamento dos explantes, adição de antioxidantes ao meio de cultura, incubação inicial dos explantes no escuro e redução da concentração de sais ao meio de cultura, tem sido recomendadas por Grattapaglia e Machado (1998); Caldas *et al* (1998).

Nas espécies tropicais, especialmente o paricá, a presença de oxidação tem sido constante, sendo necessário o desenvolvimento de metodologia específica para superar este entrave. Baseado nesta observação, objetivou-se estudar a ação de quatro diferentes antioxidantes e o efeito da concentração de nitrato de amônio na presença dos antioxidantes, ácido cítrico e ácido ascórbico, no controle da oxidação *in vitro* de segmento caulinar de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke) com a finalidade de obter plântulas para posterior multiplicação.

### 3.3 Ação de diferentes antioxidantes no controle da oxidação em segmentos caulinar de paricá

#### 3.3.1 Material e Métodos

Segmentos nodais de 10 mm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio com 15 ml de meio de cultura básico MS contendo  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, acrescido de 30 g/L de sacarose e solidificado com 0,6% de Agar. Os tratamentos consistiram de: MS + 0,1% ácido cítrico (AC); MS + 0,1% (PVP); MS + 0,1% carvão ativado (CA) e MS + 0,1% ácido ascórbico (AA). Após inoculação, o material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz, irradiância de  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ .

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado constituído de quatro tratamentos e cinco repetições totalizando vinte unidades experimentais, onde cada parcela constou de dez tubos de ensaio contendo um explante por tubo.

A coleta dos dados foi efetuada após duas semanas da inoculação com a contagem de presença e ausência de oxidação. Os resultados foram avaliados através do teste qui-quadrado.

#### 3.3.2 Resultados e Discussão

O resultado do teste qui-quadrado mostrou haver diferenças altamente significativas entre os antioxidantes estudados ao nível de 1% de probabilidade, permitindo a identificação do tratamento com menor incidência de oxidação.

Ficou evidente que a adição de antioxidantes ao meio de cultura retardou o processo oxidativo, entretanto, não foi suficiente para controlar a oxidação de explantes de paricá (Tabela 4). Vários autores têm reportado que a oxidação basal do explante é um ponto que deve ser observado, pois causa dano, fazendo com que a planta não absorva os nutrientes do meio, sobretudo os reguladores de crescimento.

Os segmentos nodais cultivados no meio MS acrescido com ácido ascórbico e ácido cítrico apresentaram menor intensidade de oxidação. A utilização desses ácidos tem sido relatada por autores como Siqueira e Inoue (1991); Biasi *et al* (1994), com satisfatória para retardar a oxidação. Por outro lado, pesquisadores como Reuveni e Lilien-Kipnis (1974) constataram a não eficiência desses antioxidantes com explantes da palmeira *Phoenix*

*dactylifera* L. Apesar desses autores terem trabalhado com outras espécies, os resultados indicam que a eficiência de antioxidantes varia de acordo com a espécie.

**TABELA 4 - Intensidade de oxidação em segmento caulinar de paricá em função de diferentes antioxidantes. Embrapa Amazônia Oriental – Belém, Pará, 2002.**

| Meio de Cultura + Antioxidante | Intensidade de Oxidação (%) | Total |
|--------------------------------|-----------------------------|-------|
| MS + Ácido Cítrico             | 69,04% (29)                 | 42    |
| MS + PVP                       | 85,71% (42)                 | 49    |
| MS + Carvão Ativado            | 86,71% (40)                 | 46    |
| MS + Ácido Ascórbico           | 64 % (32)                   | 50    |
| X <sup>2</sup>                 |                             | 120** |

\*\* diferença altamente significativa pelo teste qui-quadrado ao nível de 1% de probabilidade

Dentre os antioxidantes químicos utilizados em diversos protocolos, George (1993) destaca o carvão ativado e o PVP. O primeiro pelo poder de adsorção dos exudatos liberados pelos explantes e o segundo pela capacidade de reagir com os compostos oxidantes. No entanto, de acordo com a pesquisa realizada, a utilização de carvão ativado e PVP, acrescido ao meio de cultura não foram eficientes no controle de oxidação de paricá. Resultados similares foram obtidos por Crespo (1997) em seus estudos com *Bactris gasipaes* H. B. K. (pupunha). Efeito negativo também foi relatado por Silva (2000) em seu estudo com *Carapa guianensis* (andiroba). Por outro lado, Baleiriolla – Lucas *et al* (1982) em seus experimentos com explantes nodais de macieira, conseguiram reduzir a oxidação quando adicionaram PVP ao meio de cultura com alta concentração de Ca<sup>++</sup>.

Foi observado que a adição de antioxidantes ao meio puderam diminuir a frequência da oxidação, todavia, não foi possível evitá-la, ficando demonstrado que somente a utilização desse procedimento não é suficiente para equacionar o problema de oxidação em cultura *in vitro* de segmentos nodais de paricá. Muitas evidências indicam que o fenômeno oxidativo pode estar associado a fatores complementares como: intensidade de luz e concentração de sais no meio de cultura. Esta hipótese pode ser reforçada pelo fato de que a eficiência do antioxidante no meio de cultura tem variado em diversas espécies lenhosas.

Deve-se ressaltar ainda, que embora esses resultados não ofereçam explicações totalmente satisfatórias possivelmente, o escurecimento dos tecidos para espécies lenhosas poderá ser reduzido ou até mesmo impedido, com adoção de medidas conjuntas, conforme

recomendações de Grattapaglia e Machado (1998), haja vista que, a utilização dessas medidas na micropropagação de espécies lenhosas tem sido aplicada com resultados satisfatórios na redução da oxidação.

### 3.3.3 Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que:

- a) A adição dos ácidos ascórbico e cítrico proporcionou melhor redução na frequência de oxidação em segmento caulinar de paricá.
- b) Os antioxidantes com menor eficiência no controle do processo oxidativo em segmento caulinar de paricá foram o carvão ativado e o PVP.

## 3.4 Efeito de diferentes concentrações de nitrato de amônio no controle da oxidação *In Vitro* em segmento caulinar de paricá.

### 3.4.1 Material e Métodos

Os explantes medindo 10mm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio de 20 x 150 mm contendo 10ml de meio de cultura MS solidificado com 0,6% de agar, suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Nesse experimento foram utilizados os seguintes tratamentos: MS + 0,1% AC; MS (½ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) + 0,1% AC; MS (¼ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) + 0,1% AC; MS (Sem NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) + 0,1% AC; MS + 0,1% AA; MS (½ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) + 0,1% AA; MS (¼ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) + 0,1% AA e MS (Sem NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) + 0,1% AA. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, utilizando-se NaOH e/ou HCl em solução de 0,5 N. O material vegetal foi levado para sala de incubação com temperatura variando de 26°C ± 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70% com fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de 25 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

O Delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado constituído de oito tratamentos e cinco repetições totalizando quarenta unidades experimentais, onde cada parcela constou de cinco tubos de ensaio contendo um explante por tubo.

A coleta dos dados foi efetuada no décimo terceiro dia do cultivo com a contagem de presença e ausência de oxidação. Para esta variável os dados foram transformados em Arcoseno  $\sqrt{\%Ox/100}$  e avaliados através da análise de variância. A observação visual foi o método utilizado para verificação de frequência de calos e proliferação de brotos, não sendo realizado análise estatística para essas duas variáveis.

### 3.4.2 Resultados e Discussão

A oxidação é um dos principais fatores que mais negativamente afetam o desenvolvimento de ensaios com espécies lenhosas. No caso em estudo, a oxidação se fez presente em todos os tratamentos, entretanto, a análise de variância indicou existir diferenças significativas somente para concentração de nitrato de amônio. O antioxidante e a interação de antioxidante e nitrato de amônio estatisticamente não apresentam diferenças significativas (Tabela 5), porém os antioxidantes tendem reduzir a oxidação, conforme observado no experimento anterior.

**TABELA 5 - Resumo da análise de variância para presença de oxidação em segmento caulinar de paricá em função da concentração de nitrato de amônio e antioxidantes. Embrapa Amazônia Oriental – Belém, Pará, 2002.**

| Fonte de Variação      | G.L. | S.Q.       | Q.M.       | F                    |
|------------------------|------|------------|------------|----------------------|
| Antioxidantes (AO)     | 1    | 0.04151415 | 0.04151415 | 0.4548 <sup>ns</sup> |
| Nitrato de Amônia (NA) | 3    | 0.62002315 | 0.20667438 | 2.2640*              |
| AO X NA                | 3    | 0.11262915 | 0.03754305 | 0.4113 <sup>ns</sup> |
| Resíduo                | 32   | 2.92115442 | 0.09128608 | -                    |
| Total                  | 39   | 3.69532088 |            | -                    |

\*, ns – Significativo e Não Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

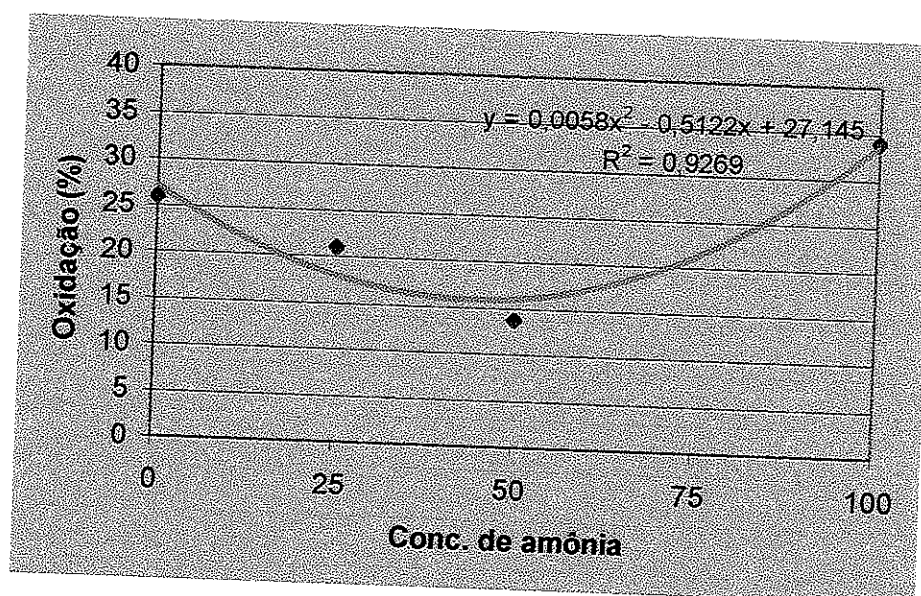
C.V (%): 70.24

Média: 23,66

Siqueira e Inoue (1991) em experimentos com *Cocos nucifera* L. conseguiram reduzir 50% da oxidação quando adicionaram estes ácidos ao meio. A utilização desses ácidos tem sido relatada como eficiente para retardar a oxidação de tecidos (Murashige, 1974; El

Hennawy e Wally, 1980). Similaridade de resultado foi obtido por Melo *et al* (2001) com guarirrobeira, onde o ácido ascórbico foi o antioxidante mais eficiente no controle da oxidação. Para George citado por Melo *et al* (2001) a eficiência desses antioxidantes se deve ao fato de que eles reagem com os metais pesados do meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para oxidarem. Outros antioxidantes têm sido utilizados em espécies lenhosas, com resultados satisfatórios.

Os tratamentos mais eficientes foram aqueles em que o nitrato de amônio foi reduzido a  $\frac{1}{2}$ , independente do antioxidante utilizado. A curva de regressão mostra claramente que a intensidade de oxidação varia de acordo com a concentração do nitrato de amônio (Figura 4). Assim, verifica-se que reduzindo a concentração de nitrato de amônio a metade, diminui-se a oxidação. Porém se este não for adicionado ao meio de cultura o processo oxidativo tende a aumentar. A análise de regressão indica ainda que, a redução da oxidação para um mínimo de 15,83% pode ser alcançada se a concentração de nitrato de amônio girar em torno de 44,15%.

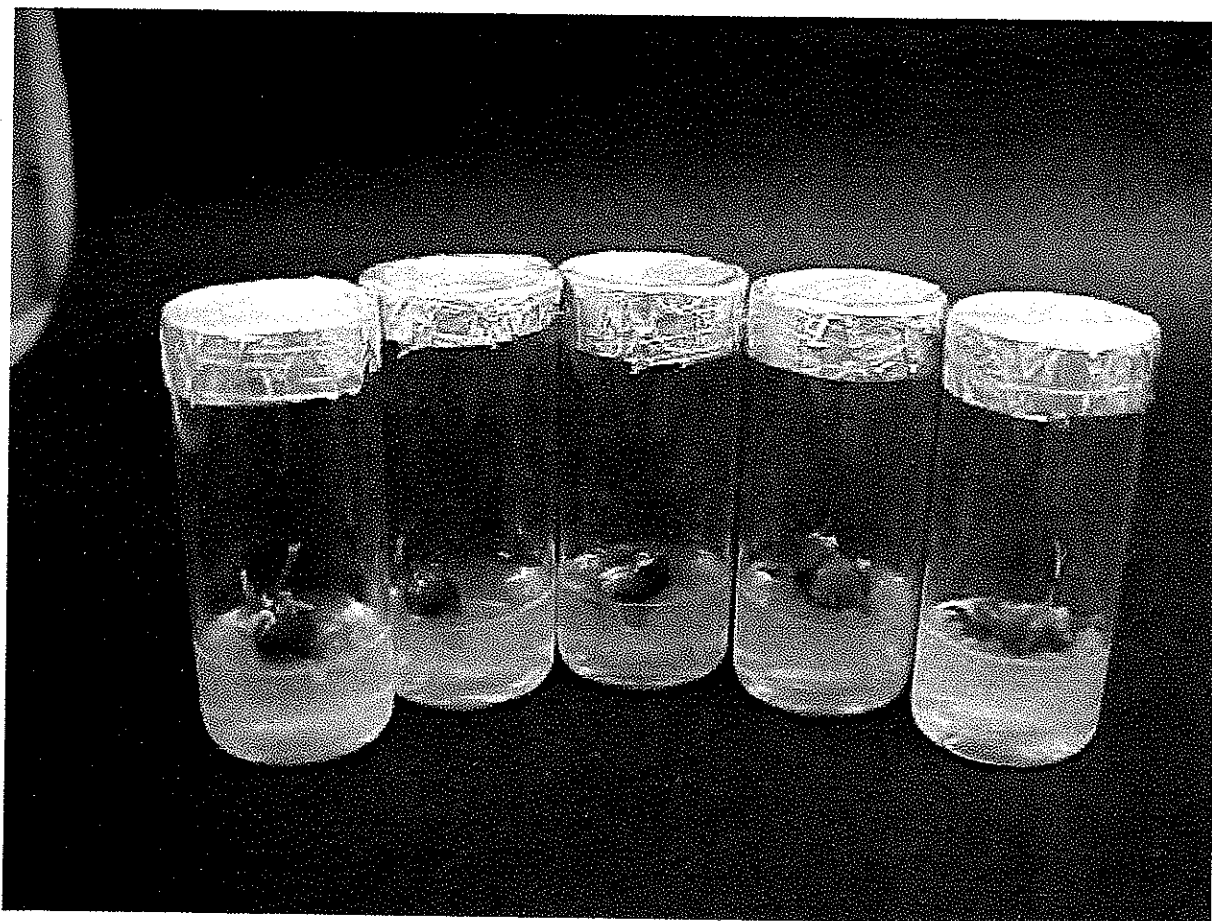


**FIGURA 4** - Representação gráfica e equação de regressão para oxidação em explantes de paricá cultivados em meio MS com diferentes concentrações de nitrato de amônio com adição de ácido cítrico e ácido ascórbico. Embrapa Amazônia Oriental – Belém, Pará, 2002.

Tem sido documentado que em muitas espécies o crescimento e desenvolvimento das plântulas são influenciados pelas concentrações de sais minerais, especialmente o nitrogênio. Demeyer e Dejaegere (1992); Terry e Raab (1994) relatam que a variação da oxidação pode está relacionada ao fato do íon de amônio ser imediatamente assimilado pelas plantas

provocando acidez da cultura ao redor do explante. Os mesmos autores explicam ainda que o pH do meio faz com que o nitrogênio exerça efeitos tóxicos nos explantes, bem como, a amônia desfaz a concentração de açúcar provocando diferentes modificações nas funções metabólicas das plantas. Isso demonstra que a assimilação de elevadas concentrações de nitrato de amônio tende a ser altamente promotoras de oxidação entre as espécies lenhosas. O nitrogênio se constitui o principal nutriente das plantas, entretanto, a concentração ótima e a forma usada parecem ser dependentes da auxina do meio e também pela característica própria de cada planta.

Apesar de não ter sido feito análise para as variáveis, número de brotos e frequência de calos, foi possível observar a presença destas a partir do quarto dia de incubação da cultura (Figura 5).



**FIGURA 5** - Aspectos da formação de calos, brotos e oxidação em segmentos nodais de paricá em meio de cultura MS, na presença de antioxidantes. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002.

A citocinina (BAP) favoreceu o surgimento de pequenos brotos em todos os tratamentos, entretanto o entumescimento na base do explante comprometeu a sobrevivência das brotações, sendo necessário no décimo quarto dia realizar a transferência do material para um novo meio de cultura. Os explantes mostraram pequena formação de calos compactos e friáveis sugerindo que a redução do nitrato de amônio é capaz de diminuir a formação destes.

A gravidade da oxidação tem levado a pré-tratamentos dos explantes e a adição de substâncias ao meio de cultura. Para Oliveira *et al* (1994); Flores *et al* (1998); Torres *et al* (1999) além do meio de cultura fatores como luz, idade fisiológica do explante, nível endógeno de fitoreguladores, agentes gelificantes, influenciam consideravelmente na intensidade de oxidação da espécie a ser cultivada. Deste modo, apesar da baixa oxidação neste meio, há necessidade de ajustes para aumentar a eficácia do processo

### 3.4.3 Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que:

- a) A oxidação de segmentos caulinar de paricá diminui quando a concentração de nitrato de amônia no meio MS é reduzida a  $\frac{1}{2}$  ;
- b) A adição dos antioxidantes, ácido ascórbico e ácido cítrico, ao meio MS tende a reduzir o processo oxidativo;
- c) A frequência de calos diminui na presença do meio MS com a redução na concentração de nitrato de amônia;
- d) O BAP favorece o surgimento dos brotos, entretanto ocorre entumescimento na base dos explantes o que afeta negativamente no desenvolvimento dos mesmos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. W. de., LUZ, J. M. Q., LACERDA, A. S. MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) In: **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v.24, n.1, p.174-180, jan/mar., 2000
- BALEIRIOLLA-LUCAS, C.; MULLINS, M. G; SRISKAN DA RAJAH, S. **Micropropagation of apple: control of browning of explants and medium during culture estabeleshement.** Res. Rep.(10); 32, 1982.
- BIASI, L.A., KOLLER, O.C., KAMPF, A.N. Micropropagação do Abacateiro "Ouro Verde" a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** Brasília (DF), v. 29, n. 7, p. 1051-1058, jul. 1994.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. P.87-132.
- CRESPO, L. E. de C. **Técnicas de clonagem in vitro de pupunha (Bractris gasipaes H. B. K)** UNEF (Universidade Estadual do Norte Fluminense). Centro de ciências e Tecnologia Agropecuária. Campos de Goytacazes. RJ. 1997 (Dissertação, Mestrado em Produção Vegetal). 66p.
- DEMEYER, K. e DEJAEGERE R. Effect of the nitrogen form used in the growth medium ( $\text{NO}_3\text{.NH}_4^+$ ) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. **Plant and Soil** 147: 79-86, 1992.
- EL - HENNAWY, H. M.; WALLY, A. Vegetative propagation of date palm *Phoenix dactylifera* l. by explant culture in vitro. **Egyptian Journal of Horticulture**, Cairo, v. 7, p.211-220, 1980.
- FLORES, R.; OLIVEIRA, M. F.; CAMARGO, J. T.; ANDRADE, L. B.; PETERS, J. A; FORTES, G. R. L. Calogênese e organogênese in vitro de duas cultivares de morangueira (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, 1998.
- FORTES, G. R. de L. **Calogênese e organogênese in vitro de macieira (Malus spp) afetados por fatores físicos, químicos e biológicos.** Viçosa, UFV, 1992. 163p. Fitotecnia. (tese "Doctor Scientia").
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-CNPq. 1998. p.183-260.
- GEORGE, E. F. Factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E. F.(ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology.** 2.ed. Edington: Exegetics, 1993a. Cap.8. p.231-272
- MELO, B. de., PINTO, J. E. B. P., LUZ, J. M. Q., PEIXOTO, J. R., JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das

plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v.25,n.6,p.1301-1306. 2001

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

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, CA, v.25, p.135-166, 1974.

OLIVEIRA, R. P.; MENDES, B. M. J.; TULMANN NETO, A. A cultura de células em suspensão de dois porta-enxertos de citrus. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.2, p.141-144, 1994.

REUVENI, O. e LILIE-KIPNIS, H. Studies of *In Vitro* culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissue and organs. Bet Dagan: **Volcani Institute Agricultural Research**, 1974. 40p. (Pamphelt, 145).

SILVA, A. T. de A. **Propagação e indução de calos *in vitro* de andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl.)**. Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 2000, 49p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – FCAP, 2000.

SIQUEIRA, E. R. de., INOUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília: v.26, n.7,p.949-953,1991.

TERRY, N e RAAB, T. K. **Nitrogen Source Regulation of Growth and Photosynthesis in *Beta vulgaris* L.** Plant Biology Department, University of California, Berkeley, California. 105: 1159-1166. 1994.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1999.

## CAPITULO IV - MICROPROPAGAÇÃO DE PARICÁ A PARTIR DE SEGMENTO NODAL

### 4.1 RESUMO

A propagação do paricá através da semente não permite que a nova planta mantenha as características originais da planta mãe. Este problema pode ser superado com a micropropagação. O trabalho objetivou testar concentrações de reguladores de crescimento na indução de brotações e adequar o protocolo desenvolvido para plantas advindas do campo. Os explantes foram excisados e inoculados em meio MS sólido, suplementado com 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP adicionados com 3% de sacarose e 0,1% de PVP e no meio MS com a concentração de nitrato de amônio reduzido à ¼, suplementado com 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina, com 0,1% de ácido ascórbico e 3% de sacarose. As culturas foram mantidas por 16 horas diárias de luz a 25 ± 1°C de temperatura. O número de brotações aumentou linearmente com o aumento das concentrações dos reguladores de crescimento, entretanto, houve diminuição no comprimento dos brotos. O cultivo dos segmentos nodais nas concentrações de 3,0mg.L<sup>-1</sup> BAP e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN, produziram em média 2,14 e 1,18, brotos por explante, respectivamente. Posteriormente os brotos foram transferidos para o meio MS suplementado com AIB para enraizamento, nas mesmas condições de cultivo. A obtenção de mudas clonadas de planta matriz ainda não atingiu os resultados esperados. Porém, algumas constatações foram feitas em relação ao controle de contaminação, oxidação e formação de brotações.

### ABSTRACT

The propagation of parica through the seed does not allow that the new plant keeps the original characteristics of the plant mother. This problem can be surpassed with the micropropagation. The study objectified to test concentrations of regulators of growth in the shoots induction and adjust the protocol for happened plants of the field. The explants had been excised and inoculated in half solid MS, supplemented with 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 and 3,0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP added with 3% of sucrose and 0.1% of PVP and in the half MS with reduced the ammonium nitrate concentration to ¼, supplemented with 0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 and 3,0 mg L<sup>-1</sup> of cinetin, with 0,1% of acid ascorbic and 3% of sucrose. The cultures had been kept by 16 daily hours of light 25 ± 1°C of temperature. The number of shoots increased linearly with the increase of the concentrations of the growth regulators, however, had reduction in the length of the shoots. The culture of the segments of plantlets in the concentrations of 3,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP and 2,0 mg.L<sup>-1</sup> of KIN, had produced in average 2,14 and 1,18, shoots for explant, respectively. Later the sprouts had been transferred to the half MS supplemented with AIB for rooting, in the same conditions of culture. The clonal seedling attainment in the first tree still did not reach the waited results. However, some constatactions had been made in relation to the control of contamination, oxidation and induction of formation shoots and calluses.

## 4.2 INTRODUÇÃO

A intensiva exploração dos recursos naturais da Amazônia nas últimas décadas levou a sociedade a mobilizar-se no sentido de criar mecanismos visando minimizar as perdas econômicas, sociais e ambientais decorrentes deste processo.

Neste sentido, empresas florestais têm apresentado interesse na utilização dessa tecnologia à geração da árvore ideal que permitam a formação de povoamentos florestais melhorados com características de interesse. A utilização da cultura de tecidos apresenta-se como uma importante ferramenta quando se pretende multiplicar e propagar vegetal promissor do mesmo modo que diminui a pressão e o predatismo sobre as florestas.

Esta estratégia de desenvolvimento possui vantagens de prevenir a disseminação de pragas e doenças de uma geração para outra, obter um número elevado de plantas num curto espaço de tempo (Souza *et al.*, 1995), do mesmo modo que propicia a conservação dos recursos naturais, manutenção do patrimônio genético e da biodiversidade (Gomes, 1987). Grattapaglia e Machado (1990) destacam a técnica como a mais difundida, precisa e concreta.

O paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke) é preferencialmente propagado por semente, é uma espécie rústica pouco exigente em adubação e de fácil adaptação em diversos tipos de solo, razão pela qual vem sendo bastante cultivada. No entanto, tem sido observado que existe grande desuniformidade nos plantios. Sendo assim, a cultura de tecidos aparece como alternativa que possibilita a produção de dezenas ou centenas de mudas, uniformes a partir de uma semente ou matriz selecionada (Melo *et al.*, 1998).

A micropropagação atualmente tem sido muito utilizada, principalmente com a finalidade de clonar árvores selecionadas para o melhoramento genético (Pasqual e Barros, 1991), produção em larga escala visando o reflorestamento, revitalização de áreas depauperadas e produção bioenergética.

Nos últimos anos, a técnica de cultura de tecidos vegetais *in vitro* tem sido aplicada para propagar e multiplicar plantas lenhosas (Sommer e Wetzstein, 1984) através do uso de calos, órgãos, células e culturas de protoplastos com resultados satisfatórios, não diferindo muito dos tipos utilizados para outras espécies de plantas. O potencial de obter maiores e melhores plantas mediante técnicas de clonagem, se origina da capacidade do explante (pequena parte do tecido) ser colocado em condições físicas e químicas artificiais (Serra, 1999), induzindo o vegetal a capturar os componentes genéticos aditivos e não aditivos (Assis, 1996) promovendo seu melhor desenvolvimento e crescimento.

Todos os seres vivos respondem a estímulos físicos e químicos como mudança de luminosidade, de temperatura, de pressão ou de composição química do ambiente em que vivem. Deste modo, a formação de plântulas através da técnica de cultura de tecidos se dá na presença de “reguladores de crescimento”. Produto químico sintético com atividade fisiológica similar as substâncias de crescimento natural da planta. Dentre estas substâncias estão: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (George, 1993a).

As auxinas, citocininas e associação auxina-citocinina são as mais utilizadas na micropropagação. As auxinas quando incorporadas ao meio de cultura induzem a formação de calos, crescimentos de células em suspensão e órgãos, já as citocininas, são reguladores que participam de um grande número de processos fisiológicos que promovem a maturação dos cloroplastos, retardam a senescência das folhas e anulam a dominância apical. A associação destes dois reguladores estimula a divisão celular e regulam a morfogênese (Garttapaglia e Machado, 1998).

A micropropagação de espécies lenhosas apresenta alguns fatores limitantes se comparadas com as espécies herbáceas, o que tem dificultado o processo. Para superar este problema, o desenvolvimento de metodologias específicas, que otimizem a utilização da técnica faz-se necessário.

No contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento na indução de brotações de paricá a partir de explantes obtidos de plântulas assépticas germinadas *in vitro* com a finalidade de micropropagar a espécie, e adequar e otimizar o protocolo para plantas advindas do campo.

### **4.3 Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a propagação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke**

#### **4.3.1 Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental. Foram utilizados explantes de paricá de plântulas assépticas cultivadas *in vitro*. Explantes constituído de segmentos nodais com aproximadamente 0,5 cm foram inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP.

O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, solidificado com ágar a 6 mg.L<sup>-1</sup> e autoclavado a 121°C, 1,2 atm por 15 minutos. O meio foi distribuído

em tubos de ensaio na quantidade de 10 ml. Os explantes foram inoculados um em cada tubo de ensaio, em câmara asséptica de fluxo laminar e, após a inoculação, os tubos foram tampados e lacrados com filme pvc e levados para sala de crescimento, com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas de luz diárias e irradiância de  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Foram testadas cinco concentrações de BAP (0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0  $\text{mg.L}^{-1}$ ).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições sendo cada unidade experimental constituída de cinco tubos com um explante por tubo. As avaliações foram realizadas 20 dias após o cultivo inicial tomando-se o número e comprimento dos brotos.

A análise estatística foi feita através da análise de variação e teste de regressão. Os dados do número de brotos foram transformados para  $\sqrt{0,5+x}$  e os dados comprimento dos brotos não sofreram transformação.

#### 4.3.2 Resultados e Discussão

O resumo da análise de variância obtido para número e comprimento de brotos de paricá, encontra-se na Tabela 6. Pode-se observar que houve diferenças significativas nas concentrações de BAP testadas.

**TABELA 6 - Resumo da análise da variância para o número e comprimento de brotações de paricá em função das concentrações de BAP. Embrapa Amazônia Oriental. Belém – PA. 2002.**

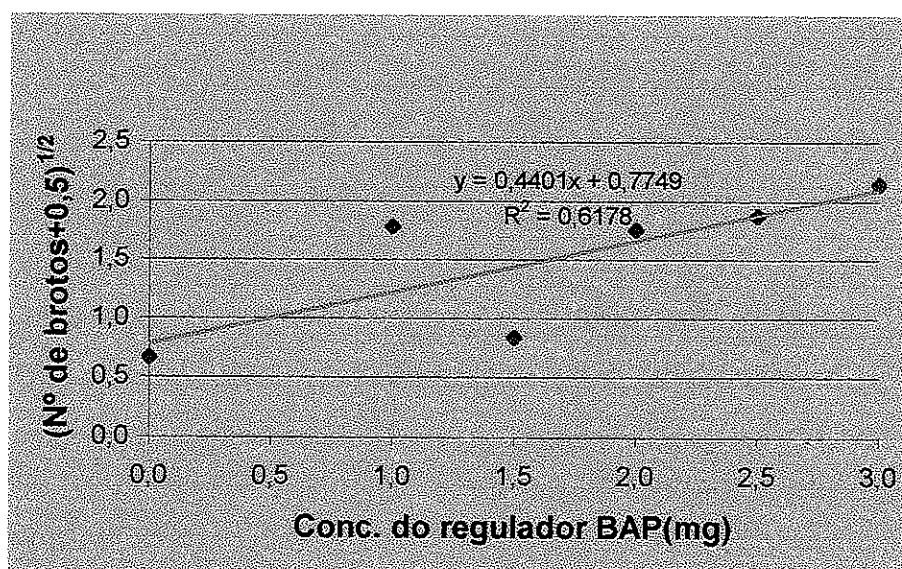
| Causas da<br>Variação<br>(mg) | G.L             |                    | Quadrados Médios             |                    | F               |                    |
|-------------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
|                               | Nº<br>de brotos | Comp.<br>de brotos | Nº<br>de brotos <sup>1</sup> | Comp.<br>de brotos | Nº<br>de brotos | Comp.<br>de brotos |
| Conc. BAP                     | 5               | 5                  | 1,01929015                   | 0,63135914         | 10,57**         | 4,15*              |
| Resíduo                       | 114             | 99                 | 0,09643701                   | 0,15219505         |                 |                    |
| CV(%)                         |                 |                    | 22,15                        | 58,00              |                 |                    |
| Média                         |                 |                    | 1,4                          | 0,67               |                 |                    |

\*e \*\* Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>1</sup>Dados transformados em  $\sqrt{0,5+x}$

O tratamento que resultou em maior número médio de brotações foi o que continha a concentração de 3 mg.L<sup>-1</sup>. Observa-se na equação de regressão que o número total de brotos obtidos por morfogênese direta apresentou uma tendência de aumento linear no número de brotos produzidos por explante à medida que aumenta a concentração do regulador de crescimento. Porém, nota-se que os tratamentos com as concentrações 1,0 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup> não seguem a mesma tendência observada (Figura 6). Para esta diferença de comportamento deve-se levar em consideração que o material utilizado no trabalho foi proveniente de sementes de genótipos variados, podendo assim ter uma alta variabilidade dentro do material.

Deve-se ressaltar ainda que a variabilidade experimental pode estar ligada a variação no tamanho do explante e condições *in vitro* parcialmente controladas. Segundo Izquierdo e Lopez (1991) a heterogeneidade nos cultivos *in vitro* é subestimado atribuindo que existe um controle nas condições de laboratório, o que nem sempre é verificado em diversos trabalhos publicados.



**FIGURA 6** - Efeito de diferentes concentrações(mg.L<sup>-1</sup>) de BAP no número médio de brotações de paricá induzidos em meio MS. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002.

$$r = 0,7860$$

O efeito benéfico do BAP na multiplicação de brotações, relaciona-se com a influencia deste regulador de crescimento na divisão celular e na liberação das gemas auxiliares emitidas pela dominância apical. Os dados obtidos são concordantes com as afirmações de Barbosa (1986) que identificou ótimo estímulo ao desenvolvimento das gemas de macieira, em meio

MS acrescido de BAP com as concentrações de 2,0 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup>. Estes resultados coincidem também com os registrados por Pasqual e Barros (1992) em segmento caulinar de barbatimão (*Strynodendron adstringens* (Mart.), Do mesmo modo, com os resultados observados por Correia e Graça (1995) com acácia negra (*Acácia mearsii* De Wild).

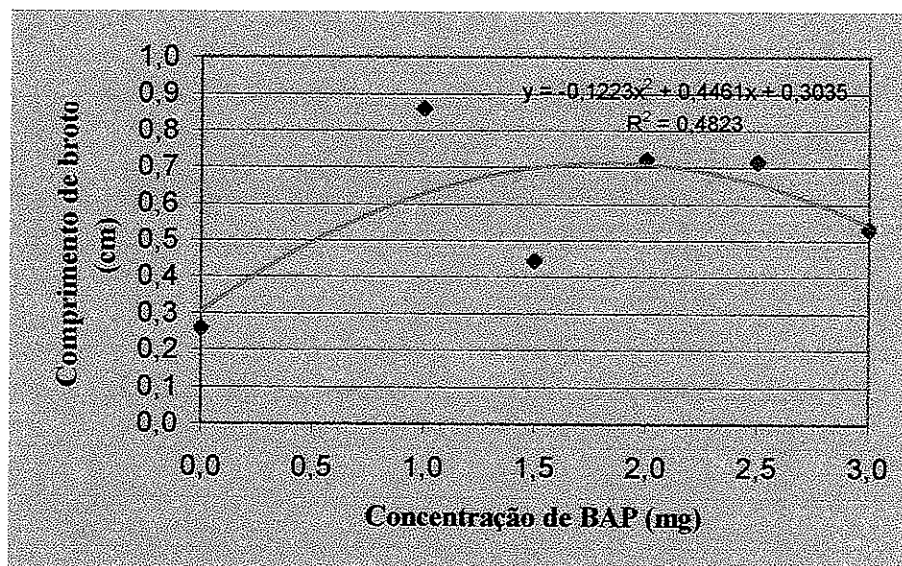
Altas concentrações de citocinina têm sido usadas para proliferação de brotos de algumas espécies com resultados satisfatórios, como é o caso do pau santo (*Kielmeyera coriacea*, Martius) estudado por Arello e Pinto (1993) em seus experimentos com segmento nodal nos quais utilizaram 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP associado com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA.

Por outro lado, o uso de baixas concentrações de BAP ao meio também tem sido indicada p.ra espécies lenhosas como *Eucalyptus globulus* ssp. Globulus Labill e sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.], espécies estudadas por Ponte (1999) e Coelho (1999), respectivamente, utilizando concentrações mais baixas do que as usadas neste trabalho.

A taxa de multiplicação obtidas no presente trabalho, em que se conseguiu em média 2,14 brotos por explante, indica que, provavelmente, a baixa proliferação de brotos esteja relacionada com as características da própria planta. Resultado similar foi obtido por Andrade *et al* (2000) na propagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) onde apenas um broto por explante foi obtido.

A curva de regressão para o comprimento das brotações em relação às concentrações encontra-se na Figura 7. Nota-se que a curva forma uma parábola chegando ao ponto máximo na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup>. Esta 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 a espécie, e a partir desta, ocorre um efeito tóxico, que se caracteriza pela falta de alongamento das culturas (Garttapaglia e Machado, 1998).

Os mesmos autores citam que os sintomas que mais caracterizam a toxidez da citocinina no meio são: excessivo estufamento e falta de alongamento das brotações; redução no tamanho das folhas; encurtamento nos entrenós; engrossamento excessivo dos caules e vitrificação generalizada das culturas. Estes resultados equivalem ao observado por Chee e Poll (1989) que constataram uma redução do crescimento das brotações em concentrações mais elevadas. Bavieria *et al* (1989), conseguiram uma correlação positiva entre concentração de BAP e taxa de multiplicação na cultura da pereira 'Conference'

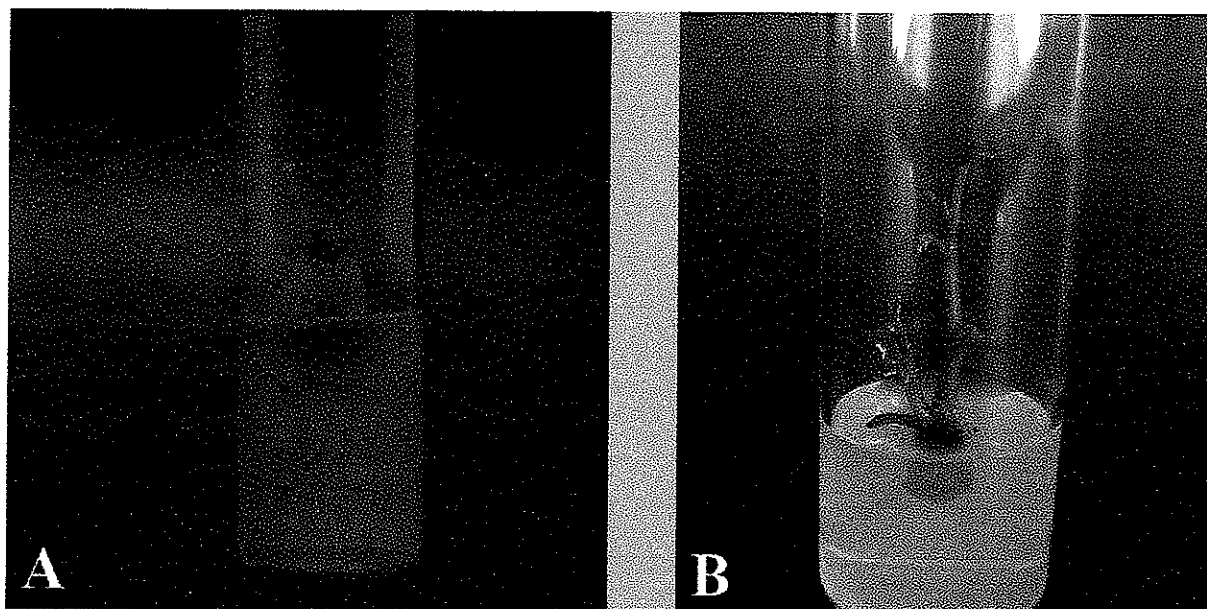


**FIGURA 7** - Efeito de diferentes concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de BAP no comprimento de brotos de paricá induzidos em meio MS. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002.

Apesar de não ter sido feita análise para as variáveis, oxidação e calogênese, foi observado que os explantes, mesmo nas concentrações mais baixas apresentaram essas formações. Há evidências que espécies lenhosas liberam maior quantidade de compostos fenólicos ao meio favorecendo a oxidação.

No que concerne a formação calos, observou-se que a medida que se aumentou a concentração do regulador maior é a incidência dessa formação. Isto se deve provavelmente, ao desbalanceamento nos níveis de fitohormônios contidos no explantes. Segundo Santos (1998) elevadas concentrações de citocinina parecem reagir com a quantidade de auxina endógena do explante o que leva a formação de calos provocando certa inibição no surgimento dos brotos (Figura 8A).

Após vinte dias de cultivo o fraco padrão de desenvolvimento dos brotos pode ter sido ocasionado pela elevada concentração de sais meio do MS. A transferência dos brotos para o meio MS com a metade da concentração dos sais e na ausência de regulador de crescimento induziu um maior crescimento dos mesmos (Figura 8B), demonstrando que para o paricá a concentração dos sais deve ser reduzida à metade e que a presença da citocinina em subcultivos deve ser evitada pois o regulador em excesso acaba por inibir o alongamento dos brotos. McCown e Sellmer citados por Coelho (1999) explicam que baixa concentração de sais no meio de cultura jamais é prejudicial para o desenvolvimento de explantes.



**FIGURA 8** - Aspectos de brotações de paricá a partir de segmentos nodais em meio MS suplementado com BAP. **A** – início de lançamento de brotos com presença de calo; **B** – Alongamento de brotos no meio  $\frac{1}{2}$  MS sem regulador de crescimento. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002.

#### 4.3.3 Conclusões

- a) O regulador de crescimento BAP na concentração de  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  proporciona maior proliferação de brotos de paricá, porém causou toxidez e por conseguinte uma redução no desenvolvimento dos brotos.
- b) O comprimento das brotações em função das concentrações de BAP não segue uma tendência linear, tendo uma faixa ótima entre  $2,0$  e  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .
- c) O maior comprimento dos brotos de paricá ocorre na presença do meio MS com a metade das concentrações dos sais e ausência de regulador de crescimento.

### 4.4 Efeito da concentração de cinetina para obtenção de brotações em segmentos nodais de paricá

#### 4.4.1 Material e Métodos

Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS com a concentração de nitrato de amônio reduzido a  $\frac{1}{4}$ , solidificado com ágar a  $0,6 \%$  e suplementado com  $0$ ;  $1,0$ ;  $1,5$ ;  $2,0$ ;  $2,5$  e  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de cinetina, acrescido de  $30\text{g/L}$  sacarose e  $0,1\%$  de ácido cítrico. O pH dos

meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Tubos de ensaio de 20mm x 150 mm contendo 15ml de meio de cultura foram autoclavados à 121°C por 15 minutos. Em seguida, os explantes medindo 10mm de comprimento foram inoculados em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas. A cultura foi mantida em sala de crescimento nas mesmas condições do experimento anterior.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições sendo cada unidade experimental constituída de cinco tubos com um explante em cada.

A coleta dos dados foi efetuada no décimo quinto dia do cultivo com a contagem de número e comprimento de brotações. A análise estatística foi feita através da análise de variação e teste de regressão. Para variável número de brotos os dados foram transformados para  $\sqrt{0,5+x}$  e os dados comprimento dos brotos não sofreram transformação.

#### 4.4.2 Resultados e Discussão

A análise de variância do número e comprimento de brotações, encontra-se na Tabela 7. Os resultados mostram haver diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade, para as duas variáveis em relação às concentrações de cinetina utilizadas no experimento.

**TABELA 7 – Resumo da análise de variância para o número e comprimento de brotações de paricá em função do efeito de concentrações de KIN. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002.**

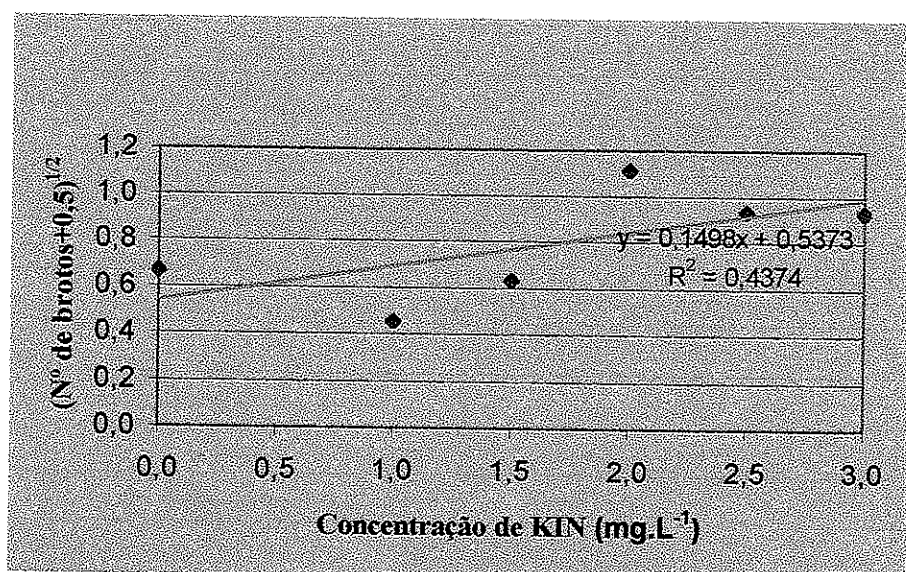
| Causas da<br>Variação<br>(mg) | G.L             |                    | Quadrados Médios             |                    | F               |                    |
|-------------------------------|-----------------|--------------------|------------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
|                               | Nº<br>de brotos | Comp.<br>de brotos | Nº<br>de brotos <sup>1</sup> | Comp.<br>de brotos | Nº<br>de brotos | Comp.<br>de brotos |
| Conc. KIN                     | 5               | 5                  | 0,23677734                   | 0,63135914         | 1,85*           | 4,52**             |
| Resíduo                       | 114             | 99                 | 0,12777902                   | 0,15219505         |                 |                    |
| CV(%)                         |                 |                    | 31,63                        | 51,93              |                 |                    |
| Média                         |                 |                    | 1,13                         | 0,62               |                 |                    |

\*e \*\* Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>1</sup>Dados transformados em  $\sqrt{0,5+x}$

Embora tenha ocorrido diferença significativa no número de brotos formados, o tratamento mais eficiente ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) apresentou apenas uma média de 1,18 broto por explante.

A linha de regressão mostrou tendência linear crescente com o aumento da concentração de KIN no meio de cultura, indicando que provavelmente em concentrações maiores poderia apresentar melhores resultados. Porém, verifica-se alta amplitude de variação no número de brotos por explante. Este fato muito provavelmente está relacionado a fatores genéticos, uma vez que cada explante apresenta características únicas e as necessidades para cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas (Figura 9). Deve-se ressaltar que a capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo mas também a atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos e ambientais (Izquierdo e Lopez, 1991).



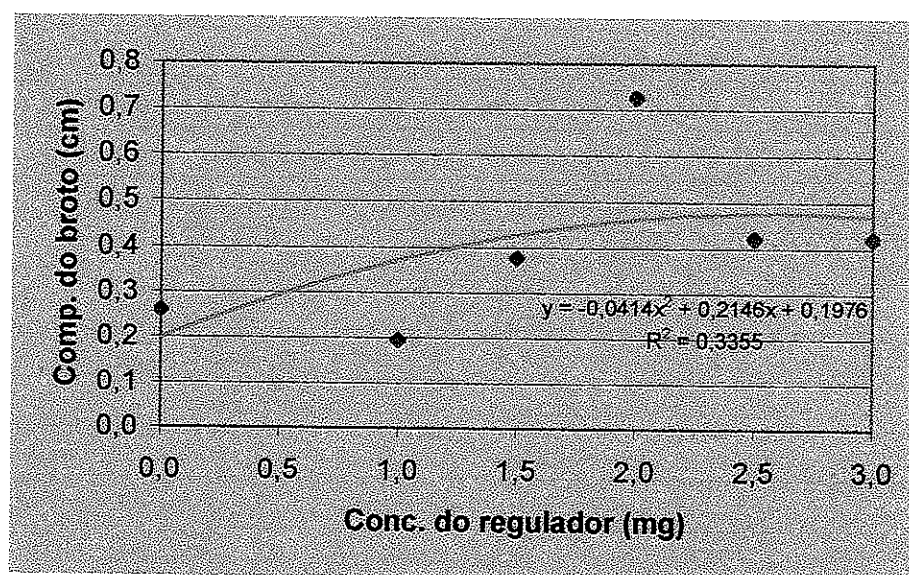
**FIGURA 9** - Efeito de diferentes concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de KIN no número médio de brotações de paricá induzidos em meio MS. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002.

$$r = \sqrt{R^2} = 0,6613$$

Barve e Mehta (1993) trabalhando com este mesmo regulador em *Commiphora wightii* (mirra) relataram que em concentrações acima ( $18 \mu\text{M}$ ) altos índices de brotações foram obtidos. Lameira (1997) em seu estudo com *Cordia verbenácea* L. (erva-baleeira), arbusto perene, verificou que a KIN a  $5 \mu\text{mol}$  associado com  $0,01 \mu\text{mol}$  de ANA foi mais favorável a multiplicação *in vitro* quanto ao número de brotações.

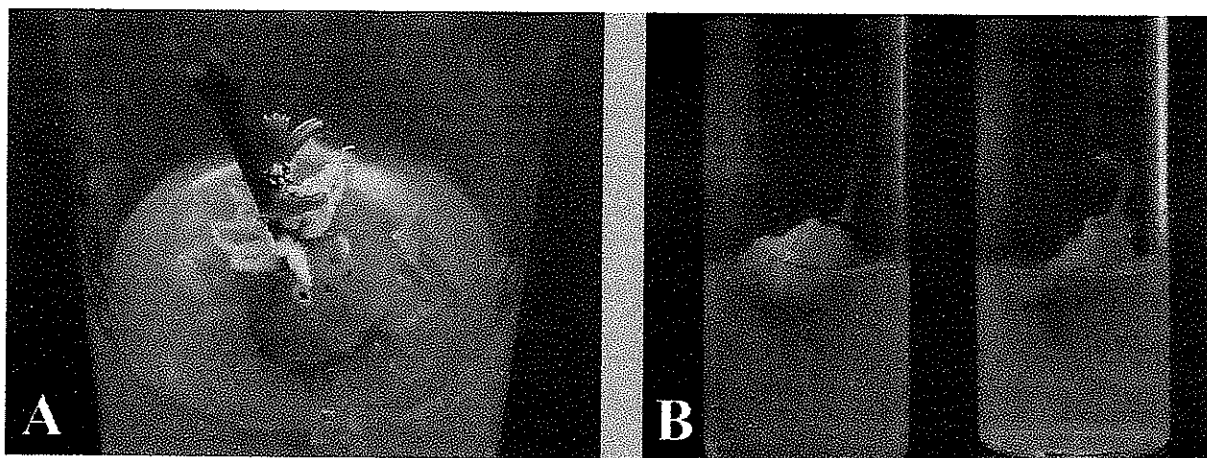
De acordo com Pierik (1990) altas concentrações de citocininas ( $1$  a  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura podem induzir a formação de brotos adventícios, porem normalmente o enraizamento é inibido.

A curva de regressão para comprimento das brotações em relação às concentrações testadas, encontra-se na Figura 10. Nota-se que a curva indica um comportamento ascendente até o ponto máximo atingido com a concentração de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . Pode-se observar ainda, que o menor tamanho das brotações ocorre no tratamento com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  deste regulador de crescimento. Usando  $5 \text{ } \mu\text{M}$  de KIN no meio WPM, Oltramari *et al* (2002) obtiveram melhor média de comprimento das brotações com a espécie *Acca sellowiana* (Berg) (goiabeira serrana).



**FIGURA 10** - Efeito de diferentes concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de KIN no comprimento de brotos de paricá induzidos em meio MS modificado. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002.

O aparecimento das brotações ocorreu após 6 dias do início do cultivo. Com vinte dias de cultivo, 86 % dos explantes apresentavam brotações. Durante o período de três semanas de cultivo foi observada a presença de calos friáveis, de lenticelas e o início de oxidação nos explantes (Figura 11A e 11B), sendo necessário à transferência dos brotos para novo meio de cultura.



**FIGURA 11** - Brotações de paricá a partir de segmentos nodais em meio MS modificado suplementado com KIN. **A** – brotação com presença de calo e lenticelas; **B** – brotação com a presença de calos e início de oxidação na base do explante. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002.

#### 4.4.3 Conclusões

- a) A concentração de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  do regulador de crescimento de KIN é a mais eficiente na multiplicação de brotos de paricá.
- b) O comprimento médio de brotos de paricá apresenta comportamento ascendente atingindo seu ponto máximo com a concentração de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de KIN.

### 4.4 Otimização da Micropropagação de paricá usando material de campo

#### 4.5.1 Material e Métodos

A coleta do material de ramos de plantas matrizes com perfil fenotípico superior, de sete anos de idade, se deu no período da manhã. As estacas foram lavadas em água corrente e imersas em solução de benomyl ( $12\text{ml}/20\text{l}$ ) por duas horas. Posteriormente foram acondicionadas em frascos contendo  $150 \text{ ml}$  de solução de ácido indol butírico (AIB) a  $500 \text{ ppm}$  por 24 horas. Após este período, em casa de vegetação da Embrapa Amazônia Oriental, as estacas foram afixadas em câmara úmida com substrato de areia e serragem tratados com benomyl.

As brotações novas provenientes de ramos juvenis da planta matriz foram retiradas com auxílio do bisturi e levadas para o laboratório. Em câmara de fluxo laminar asséptica, o material foi excisado e tratado por 2 horas em água destilada, 2 minutos em álcool a  $70 \%$  e

15 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 3 %. Foram realizadas três lavagens com água dionizada estéril. Imediatamente após o tratamento introduziram-se os explantes em tubos de ensaio com 10 ml de meio básico de cultura MS, com a metade das concentrações dos sais.

No quinto dia após inoculação os explantes foram transferidos para o meio básico MS com a concentração de nitrato de amônio reduzida à  $\frac{1}{2}$ , com 0,6% de ágar, suplementado com BAP  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , indicado como o mais eficiente em experimento anterior, sob condições de cultivo no escuro por 7 dias. Temperatura média  $26^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz por dia por cerca de 2 semanas.

As brotações foram individualizadas e transferidas para tubos de ensaio com 15 ml de meio básico MS com a metade das concentrações dos sais, adicionado 3 % de sacarose, 0,1 % de ácido ascórbico e solidificando com ágar a 0,6 % sem regulador de crescimento sob condições de cultivo semelhante ao citado anteriormente. As brotações das plantas propagadas serviram como fonte de propágulos vegetativos. A cada três semanas os brotos foram isolados e transferidos para o mesmo meio de multiplicação a fim de aumentar o número de plantas.

Brotos com tamanho variando de 2 a 3 cm foram transferidos para o meio de cultura de enraizamento composto do meio MS com a metade das concentrações de sais suplementado com 30 g de sacarose e de  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB. As culturas foram cultivadas nos cinco primeiros dias no escuro nas mesmas condições ambientais anteriores.

Quando as plântulas tiverem completas serão retirados das condições *in vitro* e lavadas com água corrente para retirada do meio de cultura e transferidas para casa de vegetação para teste de substrato e aclimação da cultura.

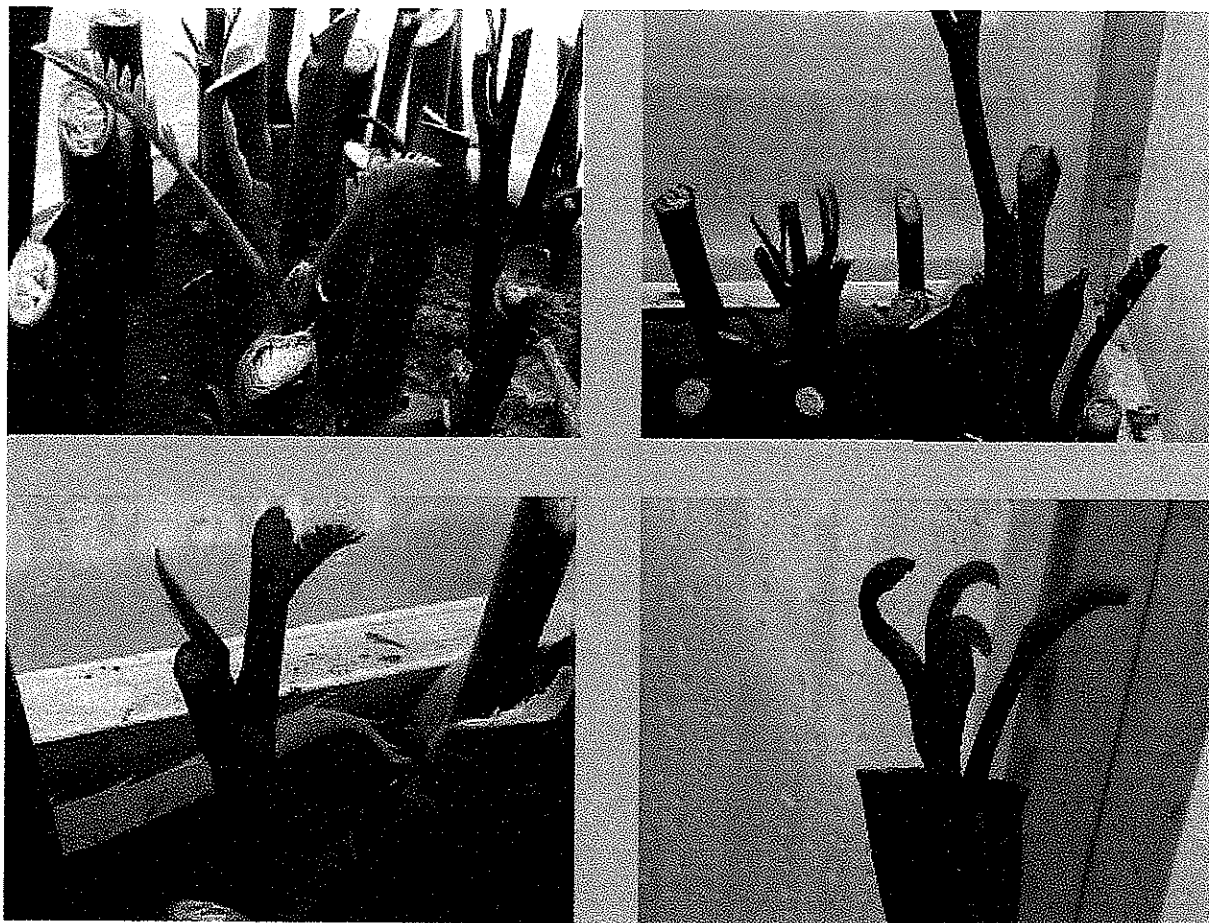
Pela falta de material para montagem de experimentos e posterior análise estatística o método visual foi o empregado.

#### 4.5.2 Resultados e Discussão

##### 4.5.2.1 Diferenciação dos Explantes em Brotações

A partir do décimo dia foi possível observar o lançamento da parte aérea das estacas oriundas das plantas adultas de paricá. No intervalo de 15 a 20 dias, as estacas de diferentes partes de uma mesma árvore cresceram e se desenvolveram diferentemente. A medida que os

rametes propagados apresentaram-se vigorosos, foram sendo coletados e levados ao laboratório para serem utilizados como fonte de propágulos vegetativo (Figura 12).

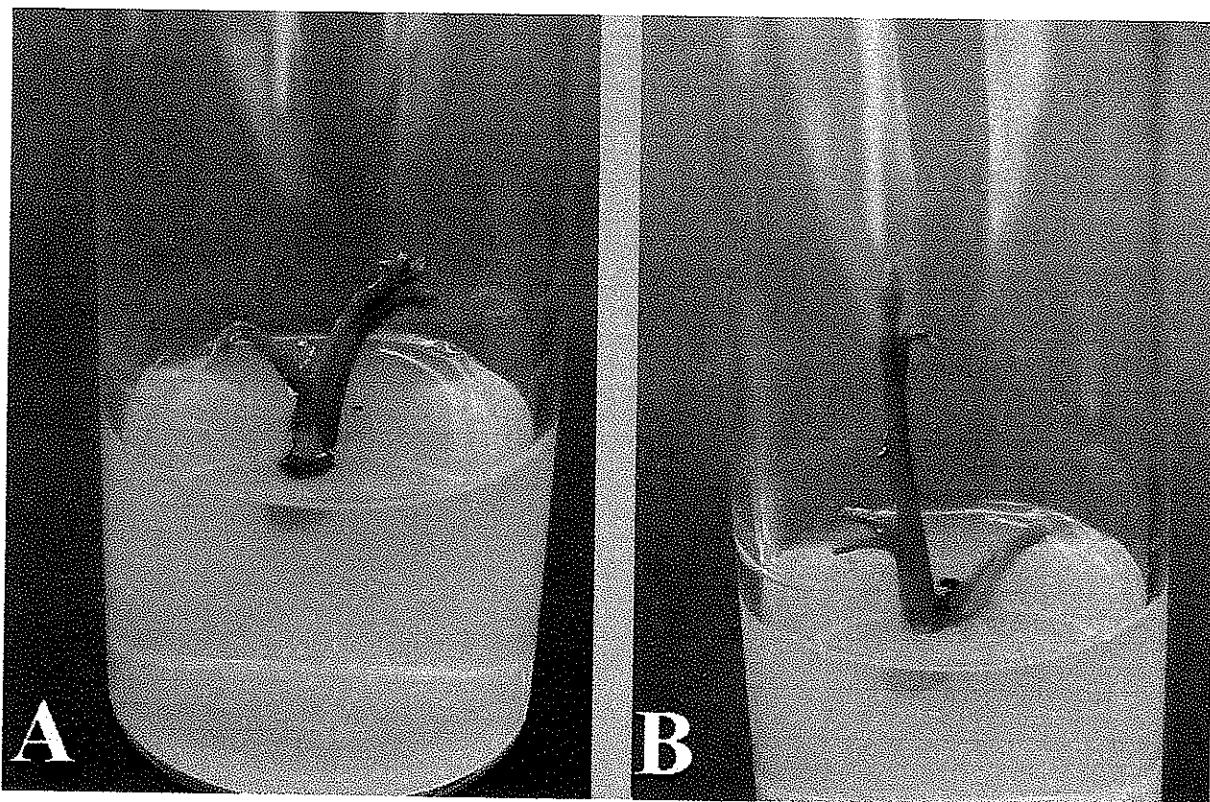


**FIGURA 12** - Aspectos de brotações de estacas com dez dias de cultivo em câmara úmida. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, Pará. 2002.

Com oito dias após a inoculação no meio básico MS acrescido de BAP, os segmentos nodais provenientes das brotações rejuvenescidas de árvores adultas apresentaram formação de brotos com aspecto normal, porém com variações fenotípicas. As causas das variações são, provavelmente, ambientais e devidos a fatores relacionados ao propágulo. Vale ressaltar que propágulos de árvores mais velhas, geralmente, crescem diferentemente daqueles derivados de árvores jovens.

Os propágulos no primeiro cultivo produziram em média de 2 brotos por explante sendo similar as formações provenientes de plântulas obtidas de sementes (Figura 13 A e B). Resultados similares foram também obtidos por Franco *et al* (2002) com as espécies *Schefflera morototoni*; *Cordia trichotoma* e *Maytenus ilicifolia*.

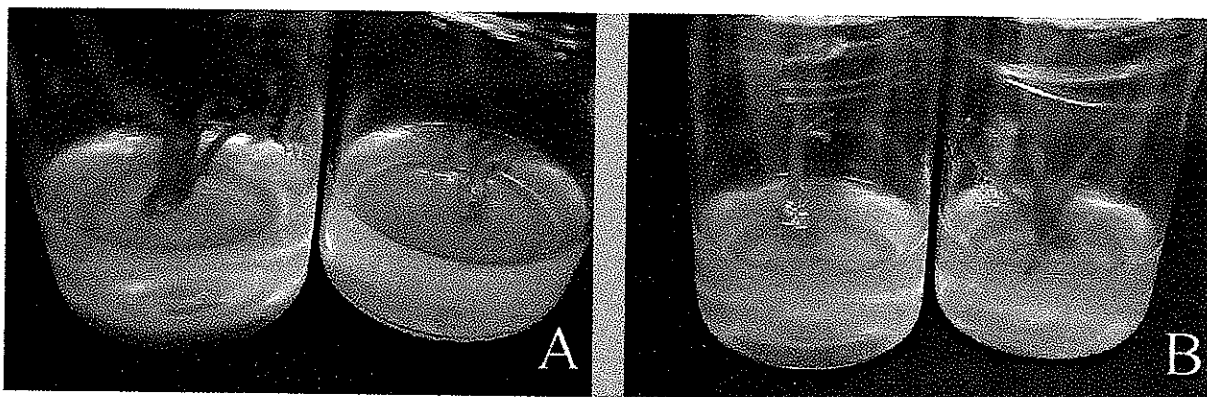
De todo material vegetal inoculado houve perda de 60% por ocasião da manipulação e contaminação. No caso específico de plantas lenhosas esses fatores dificultam os estudos de propagação *in vitro*, além disso, a frequência de regeneração diminui em função da idade da fonte de explante (Rao e Venkateswara, 1996).



**FIGURA 13** - Aspecto de brotações. **A** - Broto proveniente de semente; **B** - Broto oriundo de material de campo rejuvenescido.

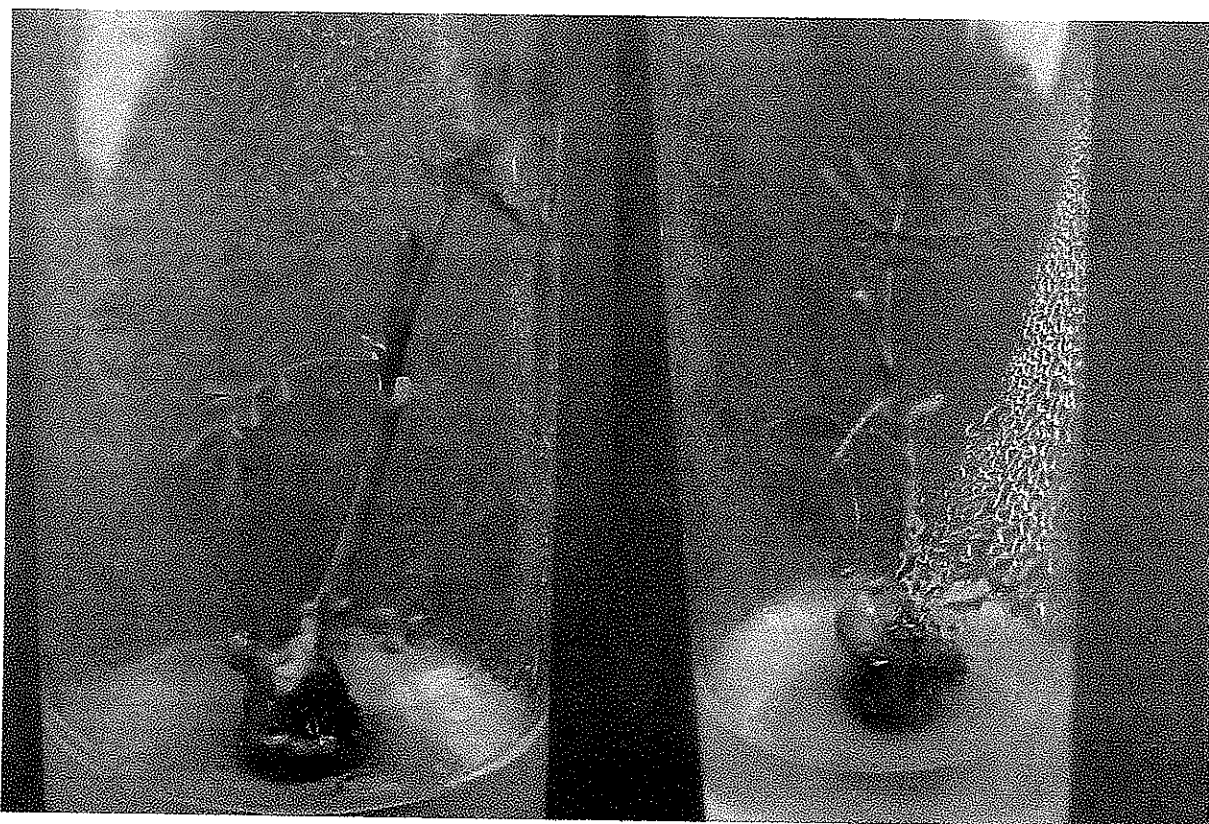
Os brotos geralmente apresentaram folhas de tamanho reduzido e brotações de pequeno comprimento. Estes sintomas são característicos dos efeitos residuais das citocininas, que podem persistir de um subcultivo para outro (Grattapaglia e Machado, 1990). Os mesmos autores explicam que no processo de rejuvenescimento *in vitro* de espécies lenhosas esses sintomas são observados constantemente sendo problemático pois afeta o alongamento, tornando-se fator limitante para fase de enraizamento.

A individualização das brotações para o meio novo promoveu intensa proliferação de novas brotações, com média de 3 brotos por explante, possibilitando manutenção e propagação (Figura 14 A e B).



**FIGURA 14 - A e B** – Aspecto de proliferação de brotações

Com quarenta e cinco dias de cultivo as brotações apresentavam-se bem formadas com tamanho variando 2 a 3 cm de comprimento, entretanto com a presença de oxidação. Com esta performance, as brotações foram transferidas para o meio de enraizamento (Figura 15).



**FIGURA 15** – Brotações com 45 dias de cultivo em condições de serem transferidas para a formação de sistema radicular.

#### 4.5.2.2 Diferenciação e Desenvolvimento do Sistema Radicular a Partir das Brotações

Após a transferência de porções de brotações para o meio de cultura suplementado com auxina aos 60 dias de cultivo foi evidenciado o surgimento de primórdios de raízes adventícias na parte basilar dos brotos. Entretanto, ainda não se apresentam suficientes para manutenção da cultura. Certas espécies, entre as quais estão muitas plantas lenhosas, apresentam inúmeros mecanismos que podem contribuir para a falha na indução de raízes.

Segundo Normaly (1997) espécies lenhosas que não formam raízes podem apresentar alta atividade de enzimas que inativam a auxina por degradação oxidativa ou por conjugação., Peres e Kerbaux (2000) explicam que para haver formação do sistema radicular o desenvolvimento das raízes passa por uma somatória de processos que vão desde a iniciação da radícula no embrião, ou a indução de raízes secundárias e adventícia, até a extensão longitudinal ou radial nos novos órgãos formados.

É de amplo conhecimento que as auxinas estimulam e as citocininas inibem a iniciação de raízes. De acordo com George (1993), o uso de auxinas no meio normalmente é responsável pela indução do enraizamento, entretanto em muitas espécies, a recalcitrância em formar raízes também pode ser provocada pela presença de substâncias inibidoras da iniciação radicular (citocininas) e pela falta de resposta do tecido à auxina acumulada. Em muitos casos a rizogênese pode ocorrer sem a presença dessas. No caso do paricá, em condições de laboratório, até o momento não se conhece a concentração ideal para formação e alongamento radicular.

#### 4.5.3 Conclusões

Neste trabalho verificou-se que:

- a) Os propágulos provenientes de campo produzem em média até 2 brotos por explante;
- b) Propágulos provenientes da cultura *in vitro* produzem em média até 3 brotos por explante;
- c) Houve formação de primórdios de raízes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. W. de., LUZ, J. M. Q., LACERDA, A. S., MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, jan/mar., 2000.
- ARELLO, E. F. e PINTO, J. E. P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.1, p.25-31, jan 1993.
- ASSIS, T. F., Melhoramento genético do eucalipto. In: **Informe Agropecuário-EPAMIG**, v.18, n.185,1996.
- BARBOSA, W. Propagação vegetativa *in vitro* de cultivares de macieira **Bragantina**. Campinas. V.45. n.1. p. 143- 154. 1986.
- BARVE, D. M. e MEHTA, A. R. Clonal propagation of nature elite tree of *Commiphora wightii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, p.237-244. 1993.
- BAVIEIRA, J., GARCIA, J. L., IBARRA, M. Commercial *in vitro* micropropagation of pear cv. Conference. **Acta Horticulturae**. N.256. p. 63-68, 1989.
- CHEE, R., POLL, R. M. Morphogenic responses to propaguls trimming spectral irradiance, and photoperiod of grapevine shoots recultured *in vitro*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.2,p.350-354.1989 CITAÇ da CIT
- COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]** Lavras: UFLA, 1999. 119p. Dissert.(Mestrado em Fitotecnica)
- CORREIA, D. e GRAÇA, M. E. C., *In vitro* propagation of black wattle (*Acácia mearnsii* De Wild). Piracicaba. **IPEF** (48/49): 117-125. 1995.
- FRANCO, E. T. H., MONTAVANI, N.C., STEFANELLO, S., ANGONESI, L. G., VESTENA, S. **Regeneração *in vitro* de espécies lenhosas**. Disponibilizado na internet 2002
- GEORGE, E. F. Factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E. F.(ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993a. Cap.8. p.231-272
- GOMES, A. L., **Propagação Clonal: Princípios e Particularidades**. Vila Real, Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro.1987,69p. (Série Didática Ciências Aplicadas.1).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH. 1990. 433p.

- 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/CBAB, p. 183-260. 1998.
- IZQUIERDO, J. A.; LOPEZ F., Y. Análisis e interpretación estadística de la experimentación *in vitro*. In: Roca, W. M.; Mroginski, L. A. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos e Aplicaciones**. Cali: CIAT. p. 375-399, 1991.
- LAMEIRA, O. A.; **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenácea* L.)**. Lavras:UFLA, 1997. 88p. (Tese de Doutorado em Fitotecnia).
- MELO, J. T. de; SILVA, J. A. da; TORRES, R. A. de A.; SILVEIRA, C. E. dos S. da; CALDAS, L. S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. (eds). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina; EMBRAPA-CPAC. 1998. 556P. Cap.V.p.195-231.
- MURASHIGE, T. SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NORMANLY, J. Auxin metabolism. **Physiologia Plantarum**, 100: 431-442, 1997.
- OLTRAMARI, A. C., DAL VESCO, L. L., PEDROTTI E. L., DUCROQUET, J. P. H. J., NODARI, R. O., GUERRA, M. P., **Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret)**. UFSC - Departamento de Fitotecnia/Centro de ciências agrárias(CCA).. Florianópolis-SC 2002.p..61-68. (Resumo internet)
- PASQUAL, M. e BARROS, I de. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Struphmodendron adstringens* (Mart.) coville). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.27, n.7, p.1017-1019, jul.1992.
- PASQUAL, M. & BARROS, I. de. Efeito de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na proliferação e alongamento de brotações micropropagadas em *Coffea arabica* L. "*in vitro*". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília(DF), v. 26 n. 2, p. 201-204, fev.1991.
- PERES, L. E. P e KERBAUY, G. B. **Controle hormonal do desenvolvimento das raízes**. Univers, v.8: p 181-195. 2000.
- PIERIK, R. L. M., **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Tradução por Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. 3ª ed. Madrid: EDICIONES Mundi-Prensa, 1990. 326p. Cap. 12, Tradução de: *In vitro* culture of higer plants.
- PONTE, E. M. D. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus* ssp. *Globulus* Labill.** Pelotas – RS. 47p. 1999 Dissert. (Mestrado em Produção Vegetal).
- RAO, K. S.; VENKATESWARA, K. Tissue culture of Forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 45, p.185-190, 1996.

SANTOS, M. R. A. dos. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach** Lavras:UFLA, 1998. 81p. Il (Dissertação)-UFLA, 1998.

SERRA, A. G. P. **Análises bioquímicas de calos e estudo da divergência genética em CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. Lavras: UFLA, 1999. 72p. il. Dissertação (Mestrado)- UFLA,1999.

SOMMER, H. E.; WETZSTEIN, H. Y. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; YAMADA, Y.(eds). **Handbook of plant cell culture. Crop species**. New York: Macmillan Publishing Company. 1984. v.3, cap.19, p.511-540.

SOUZA, A. S.; PAZ, O. P. da.; MONTARROYOS, A. V. V.; GESTEIRA, A. da S. **Protocolo de micropropagação rápida da mandioca**. Cruz das Almas (BA): MAARA-EMBRAPA-CNPMF, 1995. não paginado (biotecnologia em foco,8).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, cujo objetivo identificar a melhor condição *in vitro* para germinação de sementes; testar concentrações de reguladores de crescimento no desenvolvimento de plântulas e determinar uma metodologia para micropropagação *in vitro*, foi realizado uma série de estudos preliminares.

Inicialmente, foram utilizados explantes provenientes de plântulas obtidas de germinação *in vitro* para o estabelecimento de uma metodologia básica de micropropagação, incluindo testes de diferentes meios nutritivos básicos e diferentes combinações de concentrações de reguladores auxiliares na indução de brotos, alongamento e enraizamento de segmentos nodais. Quando a metodologia básica foi estabelecida, a mesma foi testada para explantes de árvores adultas.

A utilização de técnicas biotecnológicas mostra-se viável no estudo de fenômenos morfogênicos do cultivo *in vitro* de *Schizolobium amazonicum*. O comportamento da espécie no laboratório é similar ao observado em campo.

As observações sinalizam os passos a serem seguidos para o objetivo de clonagem *in vitro* de paricá. A utilização de BAP na concentração  $3\text{mg.L}^{-1}$  proporcionou maior número de brotos e a oxidação pôde ser reduzida com a modificação do meio MS. Entretanto, a formação constante de massa globular no explante em meio com diferentes dosagens e reguladores de crescimento sinaliza estudos mais aprofundados de regeneração através da embriogênese somática.

No presente trabalho, a auxina foi adicionada ao meio, todavia ainda não se obteve uma metodologia bem definida. Dessa maneira a rizogênese é uma questão que deve ser estudada.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial para micropropagação da espécie a partir de segmentos nodais, ainda que se façam necessários estudos mais detalhados, notadamente no que se refere à otimização do protocolo, buscando reduzir o período de residência dos cultivos. O que sempre deve ser levado em consideração para minimizar os custos do processo.

Neste trabalho verificou-se que a obtenção de plântulas de paricá, pelo processo de micropropagação a partir de tecidos rejuvenescidos, ainda não se obteve os resultados esperados, sendo que os meios testados para enraizamento ainda não se apresentam eficientes para o desenvolvimento de plântulas e possível transferência para casa de vegetação. Porém,

algumas constatações foram feitas em relação ao controle de contaminação, oxidação e indução de brotações.

Uma outra consideração é a necessidades de abordagens futuras do trabalho para o processo de aclimatização de plantas propagadas *in vitro*.

Os dados obtidos até o momento sugerem que é possível obter um maior número de plântulas por unidade de tempo e com um maior crescimento de parte aérea, otimizando o processo de produção de mudas da espécie em tela.

Da mesma forma, a cultura de tecidos vegetais parece ser uma alternativa viável, uma vez que possibilita a obtenção de taxas de multiplicação maiores, permitindo a propagação massal da espécie isentas de fungos e bactérias.