

Cultivo *In Vitro* de Embriões Zigóticos de Paricá

Iulla Naiff Rabelo de Souza Reis¹, Osmar Alves Lameira², Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro³, Joseane de Nazaré Oliveira Cardoso⁴, Sérgio Augusto Oliveira Alves⁵, Fernando da Costa Brito Lacerda⁶, Deivison Mendes Pinheiro⁷

Introdução

O *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby, vulgarmente conhecido como paricá, é uma planta de ocorrência na Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana, peruana e boliviana [1]. Segundo Falesi & Santos [2], a cultura do paricá vem despertando interesse entre produtores rurais e madeiros devido ao valor comercial da madeira para a produção de laminados de excelente qualidade, como também pelo crescimento rápido da espécie, principalmente nos primeiros anos.

Segundo Pasqual & Pinto [3], embriões cultivados *in vitro* permitem: estudar as necessidades nutricionais e físicas para o seu desenvolvimento; superar a dormência em certos tipos de sementes; testar a viabilidade das sementes; obter híbridos interespecíficos viáveis e aplicar técnicas *in vitro* de duplicação cromossômica. Acrescenta-se a isso o fato de que tecidos embrionários são excelentes explantes para serem usados em estudos, visando a propagação clonal *in vitro* em virtude de sua natureza juvenil e alto potencial regenerativo [4]. O objetivo do trabalho foi estudar o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de paricá a partir da adição de ácido giberélico, ácido cítrico e 6-benzilaminopurina (BAP) ao meio de cultura.

Material e métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental (Belém/PA). As sementes de paricá procedentes do município de Ji-Paraná, no Estado de Rondônia, foram obtidas através da Associação das Indústrias Exportadoras de Madeiras do Estado do Pará (AIMEX).

A. Efeito do AG₃ e ácido cítrico

Os embriões maduros foram extraídos das sementes e inoculados imediatamente em frascos contendo meio de cultura básico MS [5], em concentrações normais e concentrações dos sais reduzidas a metade, sacarose (3%), ágar (0,6%), pH 5,8, suplementados ou não com

o antioxidante ácido cítrico (0,1%) e com ácido giberélico (AG₃), na concentração de 3 mg.L⁻¹, totalizando 6 tratamentos e 7 repetições, cada uma constituída de um frasco contendo 3 embriões.

B. Interação entre BAP e AG₃

Foram utilizadas 1, 2 e 3 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) combinadas ou não com 3 mg.L⁻¹ de AG₃ acrescidos ao meio de cultura básico MS, com as concentrações dos sais reduzidas a metade, sacarose (3%), ágar (0,6%) e pH 5,8. Os tratamentos constituíram um fatorial 3 x 2 (3 concentrações de BAP e 2 de AG₃), com 5 repetições, cada uma constituída de um frasco contendo 3 embriões.

C. Condições de cultivo e análise estatística

Os meios de cultura foram distribuídos na quantidade de 40 mL por frasco e autoclavados a 120°C e 1,2 atm durante 20 minutos. Os embriões foram mantidos em sala de crescimento na temperatura de 24 ± 1°C, sob fotoperíodo de 16h luz branca fria e irradiância de 25 μmol.m⁻².s⁻¹. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado.

As avaliações foram realizadas semanalmente, levando em consideração as seguintes variáveis: comprimento da haste caulinar, comprimento do sistema radicular e número médio de raízes. Para análise estatística foram considerados os dados coletados aos 30 dias de cultivo, os quais foram submetidos a análise de variância e quando efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade através do programa estatístico Sisvar. Antes da análise, os dados de número de raízes foram transformados para $(X + 0,5)^{1/2}$.

Resultados e Discussão

A germinação dos embriões teve início a partir do segundo dia de cultivo, com o alongamento deste e a partir daí o desenvolvimento ocorreu de acordo com a presença ou não de ácido giberélico (AG₃).

1. Mestre em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530. Bolsista CAPES. E-mail: naiff_agro@yahoo.com.br.

2. Orientador/Pesquisador, Dr. da Embrapa Amazônia Oriental Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/nº, Caixa Postal 48, Belém-PA, CEP 66095-100.

3. Doutoranda em Sistemas Agroflorestais. Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Belém-PA, CEP 66077-530.

4. Graduanda do 8º semestre de Agronomia. Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Belém-PA, CEP 66077-530.

5. Mestre em Botânica Tropical, Museu Emílio Goeldi. Av. Tancredo Neves, 1901, Terra Firme, Belém-PA, CEP 66077-530.

6. Graduando do 4º semestre de Eng. Florestal, Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Belém-PA, CEP 66077-530.

7. Graduando do 4º semestre de Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Belém-PA, CEP 66077-530.

A. Efeito do AG₃ e ácido cítrico

De acordo com análise de variância (Tabela 1), não houve diferença estatística entre os tratamentos utilizados para o comprimento da haste caulinar, os quais apresentaram plântulas com em média 3,77cm de comprimento. No entanto, vale ressaltar que nos tratamentos em que foi adicionado AG₃ ao meio de cultura, as plântulas geralmente apresentaram alongamento do hipocótilo com coloração bege-amarelado, com pouco desenvolvimento do epicótilo e sem aparecimento de folhas ou segmentos nodais (Figura 1A e 1B), sugerindo que esse regulador de crescimento não deve ser usado para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de paricá. Verificou-se ainda que o uso do ácido cítrico foi desnecessário, uma vez que não foi observada a presença de oxidação em nenhum dos tratamentos, assim como também não houve diferença significativa entre os meios MS normal e com as concentrações dos sais reduzidas à metade.

Souza *et al.* [6] ao estudar a germinação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart, verificou que meios menos concentrados permitem melhor germinação dos embriões. Por outro lado, Ribeiro *et al.* [7] observaram que a suplementação de baixa concentração de AG₃ (0,01 mg.L⁻¹) ao meio MS favoreceu o desenvolvimento e o crescimento de embriões do híbrido *Citrus limonia* Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., cultivados *in vitro*.

Observou-se que os maiores comprimentos da raiz principal ocorreram nos tratamentos com ausência de AG₃, não havendo diferença significativa entre si. Por sua vez, nos tratamentos em que houve suplementação com esse regulador de crescimento, ficou evidenciado visualmente o atrofiamento da raiz principal, contudo, estes tratamentos obtiveram os maiores números de raízes (Tabela 2). A Figura 2A e 2B ilustra o sistema radicular das plântulas desenvolvidas na ausência e presença de AG₃, respectivamente. Da mesma forma, a adição de AG₃ afetou o processo de emergência das raízes em embriões de cafeeiro cv. Acaiaí [8]. George [9] afirmou que a presença de AG₃ no meio de cultura frequentemente impede ou diminui a formação de raízes, e que a inibição no desenvolvimento do sistema radicular ocorre principalmente se a concentração de AG₃ utilizada promover o crescimento de meristemas isolados ou extremidades de brotações.

B. Interação entre BAP e AG₃

Conforme é observado na Figura 3, os tratamentos em que houve suplementação somente com BAP, não apresentaram diferença significativa entre as concentrações utilizadas. Por sua vez, quando foi adicionado AG₃ ao meio de cultivo, o tratamento contendo 2 mg.L⁻¹ de BAP apresentou maior comprimento da haste caulinar (1,33 cm) em relação às outras concentrações estudadas. Ficou evidente que nas concentrações de 1 e 3 mg.L⁻¹ de BAP, o comprimento da haste caulinar foi maior quando não houve suplementação de AG₃ ao meio de cultivo. Já nos tratamentos que continham 2 mg.L⁻¹ de BAP, na presença ou não de AG₃, não se verificou diferença estatística entre os mesmos. Quando se combinou AG₃

com BAP, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Em relação aos valores obtidos na presença ou ausência de AG₃, dentro de cada concentração de BAP, só verificou diferença estatística quando se utilizou 1 mg.L⁻¹ deste regulador (Figura 3).

Houve formação de calos em todos os tratamentos (Figura 4), com inibição total do desenvolvimento radicular, e inibição parcial da parte aérea, onde não foi verificada a formação de folhas. Isso demonstra que possivelmente existia uma concentração endógena muito elevada de auxina, proporcionando condições favoráveis para a formação de calos.

Em muitas espécies, observa-se que a giberelina atua inibindo a retomada do crescimento do embrião, e que a citocinina atua de forma benéfica neste crescimento. Valio [10] afirmou que uma elevada taxa de germinação está relacionada com baixos teores de substâncias semelhantes ao ácido abscísico e giberélico e com altas concentrações de substâncias semelhantes às citocininas. De acordo com Nogueira *et al.* [11], os meios de cultura mais eficientes para a germinação de sementes e embriões de *Byrsonima intermedia* A. Juss. são o MS e WPM com suas concentrações reduzidas a metade, e que não se faz necessária a adição de BAP para germinação *in vitro* de embriões.

Referências

- [1] SOUSA, D.B.de; CARVALHO, G.S.; RAMOS, E.J.A. 2005 [Online]. Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). Manaus: INPA. n.13. 2p. (Informativo Técnico Rede Sementes da Amazônia). Homepage: <http://www.rsa.ufam.edu.br/8080sementesespeciespdfdoc13.pdf>.
- [2] FALESI, I. C. SANTOS, J. C. dos. 1996. Produção de mudas de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber). Belém: FCAP. 16p. transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa/SPI p.183-260.
- [3] PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. 1988. Cultura de embriões. Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, Brasília, v. 9, p. 2-12.
- [4] PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Martins Nijhoff. 326p.
- [5] MURASHIGE, T.; SKOOG, 1962. F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 15, p. 473-497.
- [6] SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M.; CASTRO, E.M. de. 2003. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. Ciência & Agrotecnologia, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538.
- [7] RIBEIRO, V.G.; SANÁBIO, D.; SOUZA, C.N. de; LOPES, P.S.N.; BOCARDO, M.R.; PASQUAL, M. 2000. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.35, n.1, p.27-30.
- [8] CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R.J.; MENDES, A.N.G.; ANTUNES, L.E.C.; SILVA, A.T.da. 1998. [Online]. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaia. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.33, n.6. Homepage: <[http://atlas.sct.embrapa.br/pab/pab.nsf/0/59d0393e1f583d9e83256662004f5030/\\$FILE/pab031_96.doc](http://atlas.sct.embrapa.br/pab/pab.nsf/0/59d0393e1f583d9e83256662004f5030/$FILE/pab031_96.doc)>.
- [9] GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. The technology. 2.ed. Edington: Exegetics. 574p.
- [10] VALIO, I.F.M. 1976. Germination of coffee seeds *Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo). Journal of Experimental Botany, London, v.27, n.100, p.983-991.
- [11] NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; CASTRO, A.H. de; VIEIRA, C.L.; ABBADE, L.C.; ALVARENGA, A.A. 2004. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Ciência e Agrotecnologia. Lavras, v.28, n.5, p.1053-1059.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para comprimento da haste caulinar. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	5	1,2118	0,2424	0,68 ^{NS}
Resíduo	36	12,7614	0,3545	
Total	41	13,9732		
CV (%)	15,8			
Média	3,77			

NS: Não significativo pelo teste F

Tabela 2 - Comprimento médio da raiz principal e número médio de raízes por plântula de paricá obtida a partir de embriões zigóticos inoculados em meio MS. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.

Composição do meio de cultura	Comprimento médio da raiz principal (cm)	Número médio de raiz
½ MS	1,44 a	8,21 b
½ MS + AC	1,43 a	8,27 b
½ MS + AC + AG ₃	0,49 b	21,83 a
MS	1,55 a	4,53 b
MS + AC	1,43 a	8,30 b
MS + AC + AG ₃	0,67 b	17,61 a

Médias seguidas por letras distintas entre si comparam os tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. MS: meio de cultura Murashige & Skoog; AC: ácido cítrico; AG₃: ácido giberélico.



Figura 1 – Plântulas oriundas de embriões zigóticos de paricá cultivados em meio MS contendo as concentrações dos sais reduzidas à metade, sem adição de regulador de crescimento (A) e com suplementação de AG₃ (B). Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.

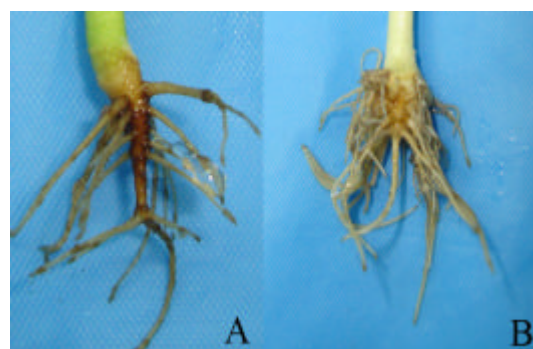


Figura 2 – Aspectos das raízes de plântulas oriundas de embriões zigóticos de paricá cultivados em meio MS na ausência (A) e presença de AG₃ (B). Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.

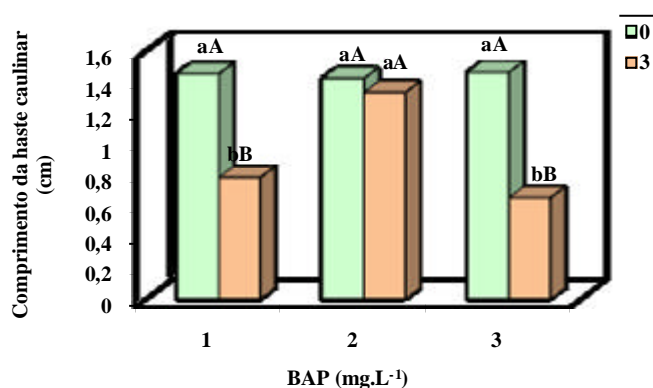


Figura 3 – Comprimento da haste caulinar de plântulas oriundas de embriões zigóticos de paricá, submetidas a diferentes concentrações de BAP, na ausência (■) ou presença (■) de AG₃. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007. Letras distintas entre si comparam: minúsculas, as concentrações de BAP, e maiúsculas a presença ou ausência de AG₃, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.



Figura 4 – Plântula oriunda de embrião zigótico de paricá inoculado em meio ½ MS suplementado com 1mg.L⁻¹ de BAP com formação de calos de coloração bege. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.