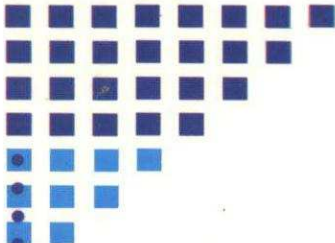




MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - MAARA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental - CPATU



JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY



GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO

Convênio EMBRAPA-CPATU/JICA
1990 - 1995

00326

Geração de tecnologia

1996

LV-2005.00326

Belém, PA
1996



30936-1

EMBRAPA - CPATU. Documentos, 85

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

EMBRAPA - CPATU

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (091) 226 - 6612, 226 - 6622

Telex: (91) 1210

Fax: (091) 226 - 9845

Caixa Postal, 48

66095 - 100 - Belém, PA

Tiragem: 200 exemplares

Unidade:	AI-Sede
Valor aquisição:	
Data aquisição:	
N.º N. Fiscal/Fatura:	
Fornecedor:	
N.º OCS:	
Origem:	Doores
N.º Registro:	326/05

Comissão Editorial

Coordenação: Célio Francisco Marques de Melo

Dilson Augusto Capucho Frazão

Francisco José Câmara Figueirêdo

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Composição: Ana Mirtes Maciel Fouro

Paulo Sérgio Oliveira

Silvia Helena Carneiro Matos

Vitor Guilherme de Sousa

Capa: Euclides Pereira dos Santos Filho

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). **Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido.** Belém: EMBRAPA - CPATU / JICA, 1996. p. 305 (EMBRAPA - CPATU. Documentos, 85).

Convênio EMBRAPA - CPATU / JICA

1. Agroindústria - Tecnologia - Brasil - Amazônia.

I. Título. II. Série

CDD: 630.720811

© EMBRAPA - 1996

ISSN 0101-2835



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - MAARA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental - CPATU



JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY

GERAÇÃO DE TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRÓPICO ÚMIDO

Convênio EMBRAPA-CPATU/JICA
1990-1995

Belém, PA
1996

MELHORAMENTO DE PLANTAS DE INTERESSE ECONÔMICO PARA A REGIÃO AMAZÔNICA ATRAVÉS DE TÉCNICAS "IN VITRO"

Oriel Filgueira de Lemos¹
Osmar Alves Lameira¹
Ilmarina Campos de Menezes²
Milton Guilherme da C. Mota³
Seibi Oka⁴
Takeo Saito⁴
Masatoshi Sato⁴

Resumo: No projeto "Melhoramento de plantas de interesse econômico para a região amazônica", através de técnicas "in vitro", estão sendo desenvolvidos métodos de propagação clonal, obtenção de variação somaclonal e suspensão de células de espécies vegetais inseticidas, medicinais, condimentares e frutíferas. Foram estudados procedimentos de assepsia de material vegetal proveniente de campo, meios básicos de cultivo, e concentrações e combinações de fitorreguladores para obtenção de protocolos. Dentre os trabalhos desenvolvidos estão a propagação clonal através de ápice caulinares e segmentos nodais, obtenção de calo, formação de embriões somáticos e teste de germinação "in vitro". Na micropropagação do bacuri (*Platonia insignis*) e castanha-do-brasil (*Bertolletia excelsa*) os resultados não são conclusivos. Algumas espécies como pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) são facilmente propagadas utilizando-se segmentos nodais e ápices caulinares. Uma das dificuldades encontradas foi o estabelecimento de um método eficiente de assepsia do material proveniente do campo.

¹ Eng. Agr. M.Sc., EMBRAPA - CPATU. Caixa Postal 48, CEP 66.017-970. Belém, PA.

² Eng. Agr., EMBRAPA - CPATU.

³ Eng. Agr., Ph.D., EMBRAPA - CPATU.

⁴ Consultor da Japan International Cooperation Agency - JICA. Av. Nazaré 272, Sala 105. Ed. Clube de Engenharia, CEP 66.035-170. Belém, PA.

IMPROVEMENT OF ECONOMICALLY IMPORTANT PLANTS TO THE AMAZON REGION THROUGH "IN VITRO" TECHNIQUES

Abstract: The objective of this project is to develop tissue culture techniques to provide decisive aid to the programs of Genetic Improvement and Germoplasm Conservation, as well as to discover efficient micropropagation systems for fruit, medicinal and condiment-producing species. In the project: Improvement of plants economically important to the Amazon region through "In vitro" techniques are being developed for clonal propagation, on obtention of somal variation and cell suspension of different plants: insecticides, medicinal, condiments and fruit species. For such, methods have been studied as to assepsia of plant material coming from the field, basic cultivation methods, concentrations and combinations of phytohormones to obtain protocols. Within the work developed, there are studies on clonal propagation through stem tips and nodal segments, "callus" obtention, somatic embryo formation and "in vitro" germination tests. Results have not been conclusive for micropropagation of bacuri (*Platonia insignis*) and Brazilnut (*Bertholletia excelsia*). Some species, such as black pepper (*Piper nigrum*) and ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) are easily propagated using nodal segments and stem tips. One of the difficulties encountered has been to establish an efficient method for providing assepsia of material brought in from the field.

Objetivo

Este projeto tem como objetivo desenvolver técnicas de cultura de tecidos que auxiliem, de maneira decisiva, os programas de melhoramento genético e de conservação de germoplasma, assim como sistemas eficientes de micropropagação de espécies frutíferas, medicinais e condimentares.

Justificativa

Algumas espécies medicinais, inseticidas e frutíferas, que ocorrem na Amazônia, apresentam grande potencial para exploração econômica. Entretanto, não se dispõe de informações sobre a reprodução, a propagação e, principalmente, sobre o sistema de cultivo racional, pois a exploração é feita basicamente através de extrativismo. Esses aspectos, aliados à expansão da fronteira agrícola e à

forte demanda por seus produtos, têm provocado devastação de áreas de ocorrência natural dessas espécies, com ameaça de erosão genética e extinção de parte da biodiversidade existente.

Nesse aspecto há necessidade de uma ação rápida no sentido de desenvolver técnicas de domesticação, sistema de cultivo, preservação de germoplasma e trabalho de melhoramento genético que possam colocar à disposição do setor produtivo, material de grande potencial para cultivo. As técnicas desenvolvidas dentro da biotecnologia, que envolve propagação através de segmento de tecido, suspensão de células e obtenção de híbridos somáticos, surgem como alternativas promissoras, tanto para propagação em larga escala de plantas saudáveis, quanto para auxiliar em programas de melhoramento genético. O desenvolvimento de sistema de regeneração de plantas eficiente dependerá, dentre outras coisas, de método eficiente de assepsia, diferenciação e aclimação de plantas.

Resultados parciais

Considerando-se a biotecnologia de plantas uma alternativa promissora, tanto para micropropagação de plantas quanto para auxiliar programas de melhoramento genético vegetal, foram executadas atividades de pesquisa visando desenvolver protocolos para micropropagação, exploração da variação somaclonal e obtenção de suspensão de células, envolvendo as seguintes espécies: timbó (*Derris urucu*), quina (*Quassia amara*), ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), bacuri (*Platonia insignis*), urucu (*Bixa orellana*), guaraná (*Paullinia cupana*) e açaí (*Euterpe oleracea*).

- Timbó

O timbó é uma planta amazônica usada, principalmente, pelas populações ribeirinhas, na captura de peixes. Este uso deve-se, particularmente, pela rotenona contida nas raízes de plantas do gênero *Derris*. Mais recentemente, o timbó vem sendo usado para o controle de pragas de lavoura, o que constitui uma alternativa de uso como inseticida, por ser potencialmente tão eficaz quanto outros produtos sintéticos. Objetivando a substituição do extrativismo desta espécie, estão sendo conduzidos estudos para a domesticação do timbó.

Neste contexto estão sendo desenvolvidos testes de micropropagação para obtenção rápida de material clonado, para posterior estudos fisiológicos e agrônômicos. Para propagação do timbó em laboratório, o problema crucial é o elevado índice de contaminação de explantes em cultura, provenientes de plantas crescidas diretamente no campo.

Nos experimentos utilizaram-se folhas novas e segmentos jovens de caule, como explantes, provenientes de plantas do Banco de Germoplasma do CPATU. Para assepsia dos explantes foram realizados vários testes utilizando-se detergente e lavagens em água corrente, choque térmico em temperaturas de 50°C e 5°C, imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a várias concentrações e tempo, imersão em solução de sulfato de estreptomicina (10 mg/100 ml H₂O) e tratamento das plantas em campo, antes da retirada dos explantes, com solução de benlate a 200 ppm.

As respostas observadas quando do uso de choque térmico e imersão dos explantes em solução de hipoclorito de sódio a 1,0; 2,0; 3,0 e 3,5% de cloro ativo, durante 10, 15, 20 e 30 minutos, respectivamente, foram de contaminação total. Porém, quando as plantas do campo foram tratadas, antes da retirada dos explantes, com solução de benlate, e esses explantes lavados previamente em água destilada com detergente em aparelho ultrasonic, em seguida tratados com solução de hipoclorito de sódio, a diferentes tempos de duração, e imersos em solução de sulfato de estreptomicina e ácido ascórbico, apresentaram respostas conforme mostra a Tabela 47.

TABELA 47 - Efeito da ação de hipoclorito de sódio (NaClO a 1%) a diferentes tempos de imersão, para assepsia de explantes de timbó após quinze dias de cultura.

Tempo imersão (min.)	Explante não-contaminado (%)
10	3,03
20	15,15
30	54,54

Esses resultados indicaram que existem grandes dificuldades em obter explantes assépticos para iniciar as etapas subseqüentes de estabelecimento de protocolo para

micropropagação. Ressalta-se que quanto maior a concentração ou o tempo de imersão dos explantes, em solução de hipoclorito de sódio, maiores são os danos observados nos tecidos e, conseqüentemente, as respostas desses à ação de meios de cultura com reguladores de crescimento têm sido prejudicadas. Observou-se raro êxito para emissão de brotos. Portanto, é necessária, para superar essa primeira etapa (asepsia de explantes), a condução de plantas matrizes em casa-de-vegetação sob condições controladas e com tratamentos fitossanitários.

- Quina

A espécie quina é uma planta arbustiva comum na América Tropical que tem como princípio ativo a quassina, alcalóide de ação inseticida e biodegradável. Estão sendo realizados estudos visando à sua domesticação e estabelecimento de sistema de cultivo. Uma das etapas dos estudos com esta espécie é a de estabelecer o protocolo de micropropagação para obtenção rápida de mudas.

Para asepsia dos explantes, obtidos de mudas e de plantas crescidas diretamente no campo, estes foram lavados em água por várias vezes e imersos em álcool 70%, por cinco segundos, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio a várias concentrações e tempo de imersão, com posterior lavagem em água destilada autoclavada e inoculação em meio de cultura sob câmara de fluxo laminar.

As Tabelas 48 e 49 mostram os resultados de dois experimentos para asepsia de explantes, porém no segundo experimento (Tabela 49), antes da imersão em hipoclorito de sódio, os explantes foram lavados com água destilada autoclavada e detergente em aparelho ultrasonic.

TABELA 48 - Efeito da ação de hipoclorito de sódio (NaClO a 1%) a diferentes tempos de imersão, para asepsia de explantes de quina após dez dias de cultura.

Tempo imersão (min.)	Explante não-contaminado (%)
10	35,0
20	68,0
30	75,0

TABELA 49 - Efeito da ação de hipoclorito de sódio (NaClO a 1%) a diferentes tempos de imersão, para assepsia de explantes de quina após quinze dias de culturas.

Tempo imersão (min.)	Explante não-contaminado (%)
20	66,67
30	86,67

Nesses experimentos observou-se que quanto maior o tempo de imersão dos explantes, em solução de hipoclorito de sódio, maior a eficiência de assepsia, porém, maiores são os danos nos tecidos. Por conseguinte, a obtenção de plantas matrizes sob casa-de-vegetação, com tratamentos fitossanitários, certamente minimizará esse problema e tornará mais eficiente o processo de assepsia.

Os explantes não-contaminados foram transferidos para meio B5 (Gamborg et al., 1968), suplementado com BAP 2,5 mg/l, no qual alguns explantes emitiram brotações. Outrossim, quando foram transferidos para meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com várias combinações de 6-benzilaminopurina (BAP 1,0; 5,0 e 10,0 mg/l) e ácido naftalenoacético (ANA 0,1; 0,5 e 1,0 mg/l) induziram calos (Fig. 77). Entretanto, ao submeter os calos ao mesmo meio, mas apenas com BAP (1,0; 5,0 e 10,0 mg/l) não favoreceram diferenciação, assim como, após cerca de 45 dias, após serem transferidos para novo meio, metade da concentração de sais básico MS (1/2 MS) suplementado com zeatina (0,0; 0,05; 0,1 e 0,5 mg/l), também não permitiram diferenciação dos calos em plântulas via embriogênese ou organogênese.

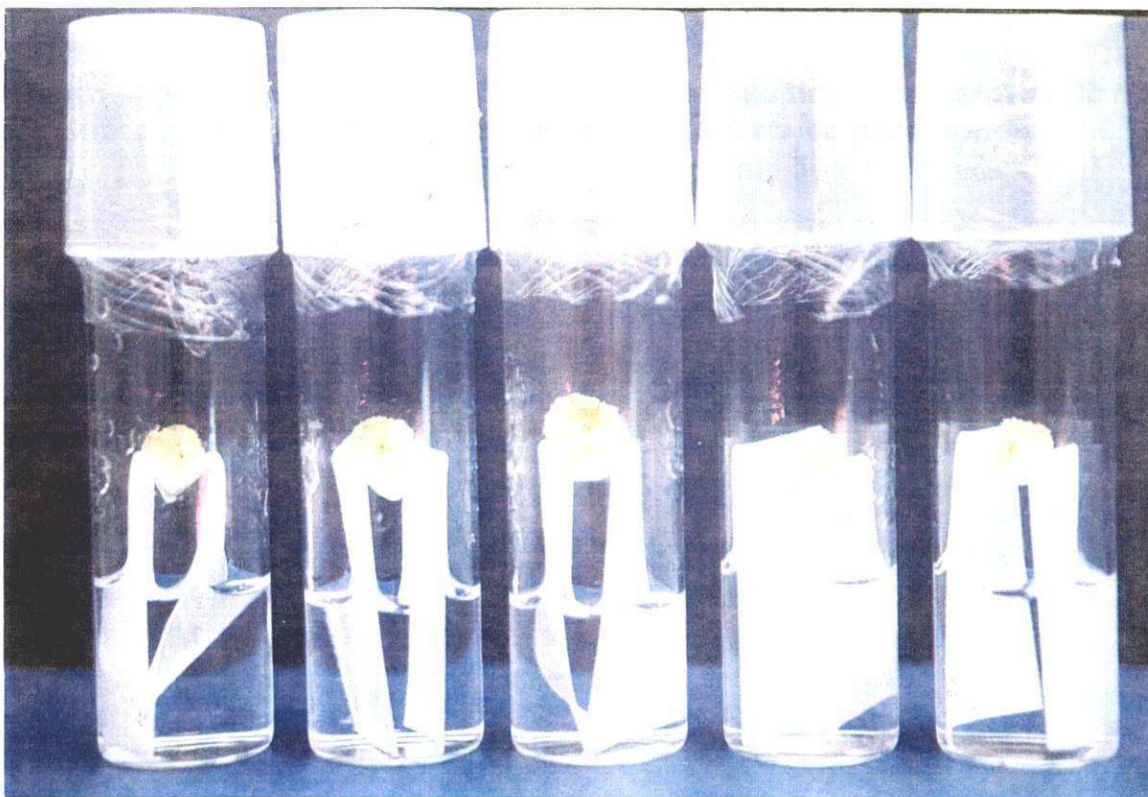


FIG. 77 - Indução de calos a partir de segmentos de caule de quina.

- Ipeca

A ipeca é uma planta herbácea nativa de regiões úmidas. A principal característica é a formação, nas raízes, de dois alcalóides (cefalina e emetina) usados em medicamentos. Devido ao desmatamento e à coleta indiscriminada, a área de ocorrência da espécie vem se reduzindo gradativamente. São necessários, dentre outros, estudos de propagação rápida para viabilizar o sistema de produção racional. No trabalho de micropropagação de ipeca foram usados segmentos nodais e internodais de caule. A Tabela 50 mostra as médias de brotações induzidas em diferentes meios de cultura.

TABELA 50 - Brotações emitidas em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e cinetina, no estado semi-sólido ou líquido, após 35 dias de cultivo.

Meio de cultura	Estado do meio	Tipo de explante	Média de brotações/explante
B5B _{1,5} ¹	Semi-sólido	seg. nodal	3,0
B5B _{1,5}	Líquido	seg. nodal	4,1
B5B _{3,0} ²	Semi-sólido	seg. nodal	1,0
B5B _{3,0}	Líquido	seg. nodal	2,3
B5K _{1,5}	Semi-sólido	seg. nodal	2,0
B5K _{1,5} ³	Líquido	seg. nodal	2,9
B5K _{3,0} ⁴	Semi-sólido	seg. nodal	3,0
B5K _{3,0}	Líquido	seg. nodal	1,1
B5B _{1,5}	Semi-sólido	seg. internodal	5,5
B5B _{1,5}	Líquido	seg. internodal	6,2
B5B _{3,0}	Semi-sólido	seg. internodal	1,1
B5B _{3,0}	Líquido	seg. internodal	3,1
B5K _{1,5}	Semi-sólido	seg. internodal	4,1
B5K _{1,5}	Líquido	seg. internodal	1,0
B5K _{3,0}	Semi-sólido	seg. internodal	1,3
B5K _{3,0}	Líquido	seg. internodal	3,9

¹ Meio básico B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 1,5 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina)

² Meio básico B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 3,0 mg/l de BAP (6-benzilaminopurina)

³ Meio básico B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 1,5 mg/l de Cinetina

⁴ Meio básico B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 3,0 mg/l de Cinetina

Melhores respostas para indução de brotações foram obtidas em meio B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com BAP (6-benzilaminopurina) ou cinetina (6-furfurilamino-purina) a 1,5 mg/l (Fig. 78), tanto no estado semi-sólido como líquido. Ressalta-se que explantes do tipo internodal apresentaram maior número de brotações.

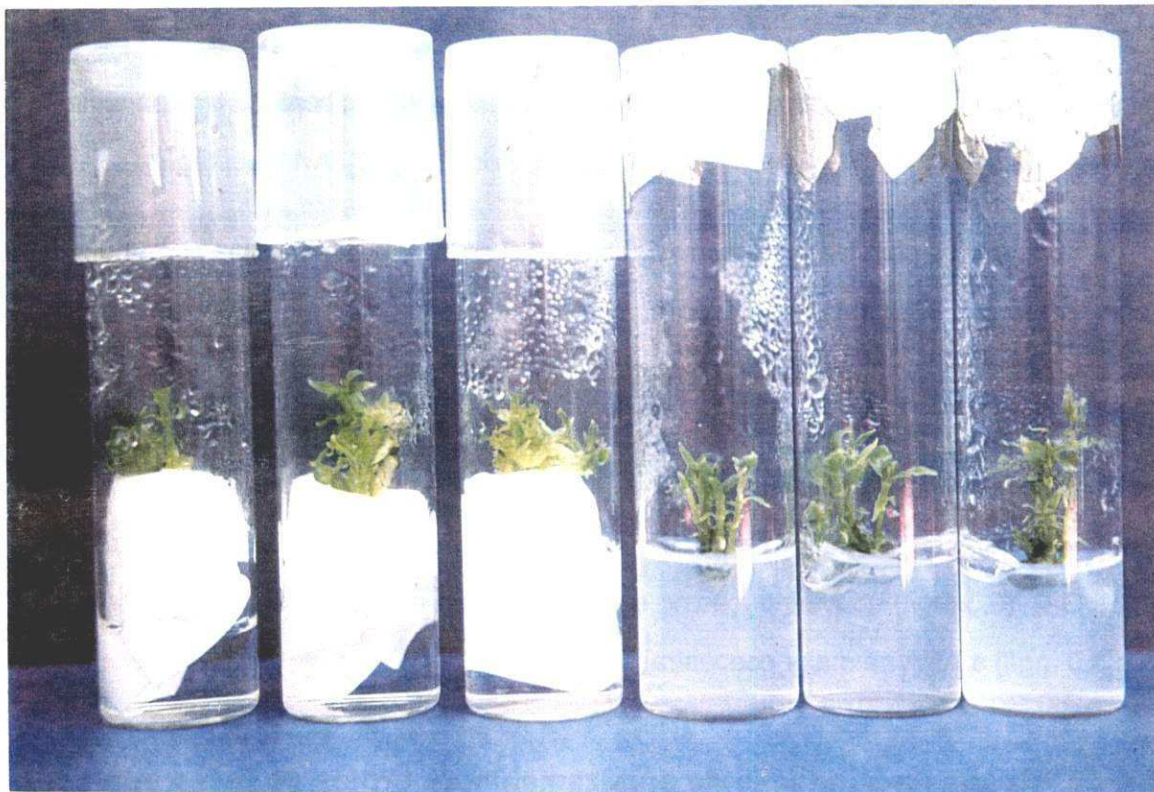


FIG. 78 - Indução de brotações a partir de segmentos nodais e internodais de ipeca.

Para alongamento, brotações com tamanho inferior a 1,0cm, foram transferidas para meio B5 semi-sólido, suplementado com ácido giberélico (GA_3 ; 0,0; 0,3; 0,5 e 1,0 mg/l). A Tabela 51 mostra as respostas obtidas, após 36 dias de cultivo, quanto ao incremento de crescimento médio dos brotos, utilizando-se 40 brotos por tratamento.

TABELA 51 - Crescimento de broto de ipeca em meio B5 suplementado com diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3), após 36 dias de cultivo.

GA_3 (mg/l)	Crescimento médio (mm)
0,0	17,04
0,3	20,66
0,5	22,66
1,0	26,95

Para essa etapa, à medida em que se aumentou a concentração de GA₃ (0,0 a 1,0 mg/l), maior foi o incremento de crescimento, mostrando que o ácido giberélico tem papel importante no alongamento de brotos.

Os brotos com tamanho entre 1,0 cm e 2,0 cm foram transferidos para meio B5 semi-sólido, carvão ativado 0,1%, suplementado com ácido giberélico (0,3 mg/l) combinado com ácido naftalenoacético (ANA 0,1, 1,0 e 5,0 mg/l) ou ácido indolilbutírico (AIB 0,1, 1,0 e 5,0 mg/l) ou sem auxina. Neste caso, como mostra a Tabela 52, após 35 dias de cultivo, há tendência da combinação GA₃ e ANA ser mais eficiente para enraizamento, porém com menor número de raízes por plântula, enquanto que na combinação AIB e GA₃ observou-se maior número de raízes por broto. Utilizando-se somente GA₃ (0,3 mg/l) houve indução de raízes, mas com número inferior às concentrações de AIB (0,1 a 5,0 mg/l) e ANA na maior concentração (5,0 mg/l).

TABELA 52 - Resposta à indução de enraizamento de brotos de ipeca submetidos a meio B5 suplementado com ácido giberélico (GA₃ 0,3 mg/l) combinado a diferentes concentrações de ANA ou AIB após 35 dias de cultivo.

Meio de cultura ¹	Nº de broto enraizado	Nº de broto não-enraizado	Nº médio de raiz/broto
Testemunha ²	9/19	10/19	5,33
AIB 0,1	8/20	12/20	7,20
AIB 1,0	5/19	14/19	7,00
AIB 5,0	8/19	11/19	7,75
ANA 0,1	13/20	7/20	4,20
ANA 1,0	9/19	10/19	5,25
ANA 5,0	5/20	15/20	7,00

¹ Meio básico de B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com GA₃ e ANA ou AIB a 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/l.

² Meio de cultura sem regulador de crescimento.

Por outro lado, quando os brotos apresentavam tamanho superior a 2,0 cm foram transferidos para o meio com metade da concentração de sais de MS (MS/2) suplementado com AIB (0,1; 1,0 ou 5,0 mg/l) ou ANA (0,1; 1,0 ou 5,0 mg/l). As respostas após 38 dias de cultivo estão demonstradas na Tabela 53.

TABELA 53 - Resposta de brotos de ipeca em meio com metade dos sais de MS (MS/2), suplementado com AIB ou ANA, após 38 dias de cultivo.

Tratamento ¹ (MS/2)	Nº de brotos	Nº de plântulas bem enraizadas	Nº de plântulas pouco enraizadas	Brotos sem raiz	Eficiência enraizamento (%)
Testemunha ²	15	4	4	7	53,33
ANA _{0,1}	17	5	2	10	41,18
ANA _{1,0}	15	6	1	10	46,67
ANA _{5,0}	22	5	2	15	31,82
AIB _{0,1}	22	2	5	15	31,82
AIB _{1,0}	16	10	0	6	62,50
AIB _{5,0}	21	10	5	6	71,43

¹ Meio de cultura com metade dos sais básico de MS suplementado com ANA ou AIB a 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/l.

² Meio de cultura sem regulador de crescimento.

Conforme os dados da Tabela 53, em todos os tratamentos foi possível obter enraizamento (Fig. 79), entretanto, foi conseguida maior eficiência de enraizamento em meio suplementado com AIB (1,0 e 5,0 mg/l).

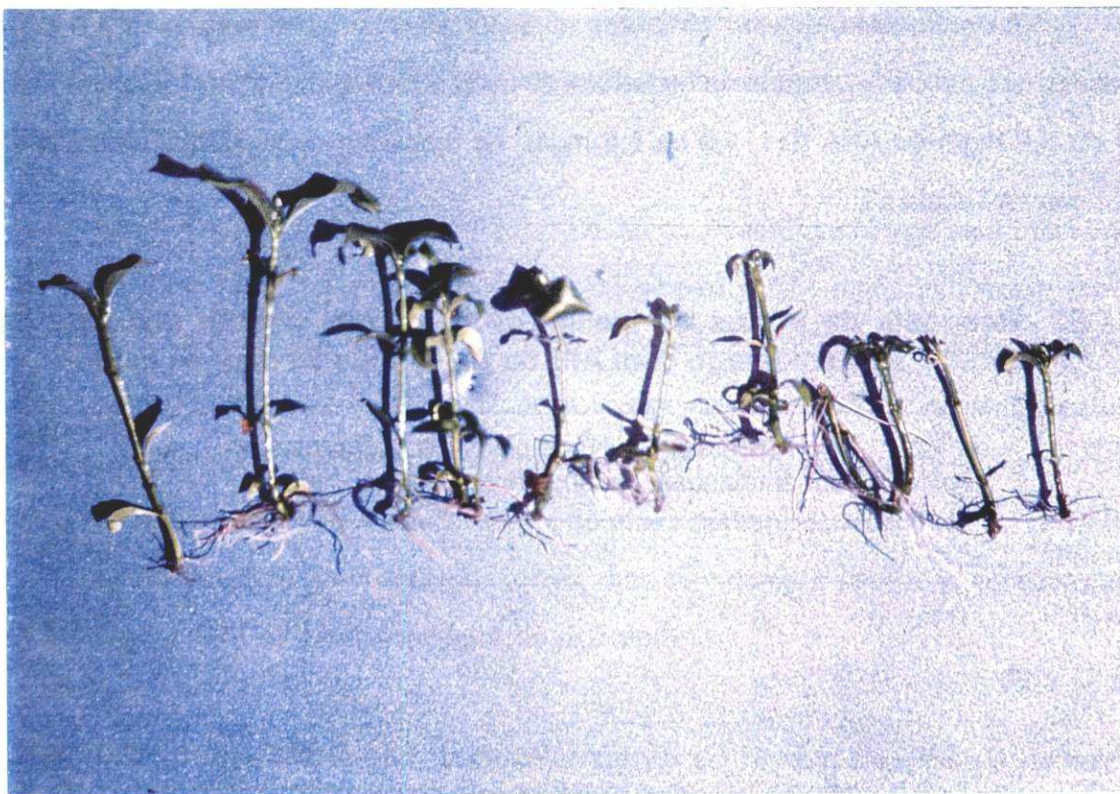


FIG. 79 - Enraizamento de brotos de ipeca.

Para aclimação das plântulas obtidas, inicialmente foram lavadas em água corrente e transplantadas para copos de plástico (capacidade 300 ml) com substrato formado por terra preta, serragem e esterco de curral na proporção de 1:2:1. As condições de aclimação foram de alta umidade, em germinador totalmente fechado com plástico, durante uma semana (Fig. 80). Após esse período foram transferidas para sacos de plástico de polietileno, com o mesmo substrato, nos quais permaneceram até o crescimento e formação de mudas. As mudas de ipeca foram transferidas para o campo e estão desenvolvendo-se normalmente (Fig. 81).



FIG. 80 - Aclimação de plântulas de ipeca provenientes de micropropagação.



FIG. 81 - Plantas de ipeca em campo, provenientes de micropropagação.

- Pimenteira-do-reino

Dentre as espécies cultivadas na região amazônica, a pimenteira-do-reino ocupa lugar de destaque, com uma área de cultivo acima de 20 mil hectares e cerca de 25 mil toneladas por ano. Entretanto, desde meados da década de 60, esta cultura vem sofrendo sérios prejuízos devido à ocorrência da doença fusariose, que constitui-se num dos fatores limitantes ao cultivo, assim como os elevados custos com manutenção.

O melhoramento convencional não tem alcançado êxito, haja vista a falta de genótipos resistentes e/ou tolerantes a essa enfermidade, assim como pela dificuldade de introdução de novos germoplasmas do centro de diversidade. Apesar da espécie *Piper colubrinum* L. apresentar resistência à fusariose, a obtenção de híbridos por métodos convencionais, entre essas duas espécies, é muito difícil.

As técnicas de cultura de tecidos apresentam-se como uma alternativa promissora na solução desses problemas, seja através da conservação e intercâmbio de germoplasma *in vitro*, na indução de variabilidade genética, micropropagação clonal de genótipos superiores, seleção de genótipos resistentes e/ou tolerantes a fatores bióticos e abióticos, introdução de genes de interesse agrônômico em plantas, obtenção de híbridos somáticos, dentre outras. O objetivo dos estudos com essa espécie foi desenvolver sistemas de regeneração de plantas *in vitro* visando auxiliar os programas de melhoramento genético.

Para viabilizar o início do processo, considerando as sérias dificuldades em conseguir material asséptico de plantas crescidas diretamente no campo, foram coletadas sementes de plantas do Banco de Germoplasma do CPATU, Belém,PA, em seguida lavadas em água corrente, despulpadas e submetidas a tratamento de assepsia. Inicialmente, sob câmara de fluxo laminar asséptica, foram imersas em álcool a 70% por 2 minutos e transferidas para solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 15 minutos e lavadas, posteriormente, com água destilada autoclavada por cinco vezes e, por fim, inoculadas em meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962), 3% sacarose, 0,7% ágar e pH 5,8. As sementes foram cultivadas sob condições de temperatura de 25°C $\pm$ 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro. As sementes germinaram e desenvolveram plântulas (Fig. 82) após 30 dias de cultura.



FIG. 82 - Obtenção de plântulas de pimenta-do-reino a partir de sementes cultivadas *in vitro*.

- Propagação a partir do ápice caulinar

Os ápices caulinares provenientes de plântulas *in vitro* quando cultivados em meio MS, suplementado com 6-benzilaminopurina (BAP 2,0mg/l), em condições de temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro e intensidade luminosa de 3.000 lux, induziram de três a cinco brotos por explantes a partir de 30 dias de cultivo (Fig. 83). As brotações foram alongadas, em mesmo meio básico, mas suplementados com ácido gibenélico (GA_3 0,3mg/l) com cerca de 25 a 40 dias, e ao serem transferidas para o mesmo meio, mas com ácido naftalenoacético (ANA 0,5mg/l), enraizaram (Fig. 84). As plântulas aclimatadas em câmara úmida, em substrato de solo e matéria orgânica, cresceram, formaram mudas e foram plantadas em campo de cultivo.

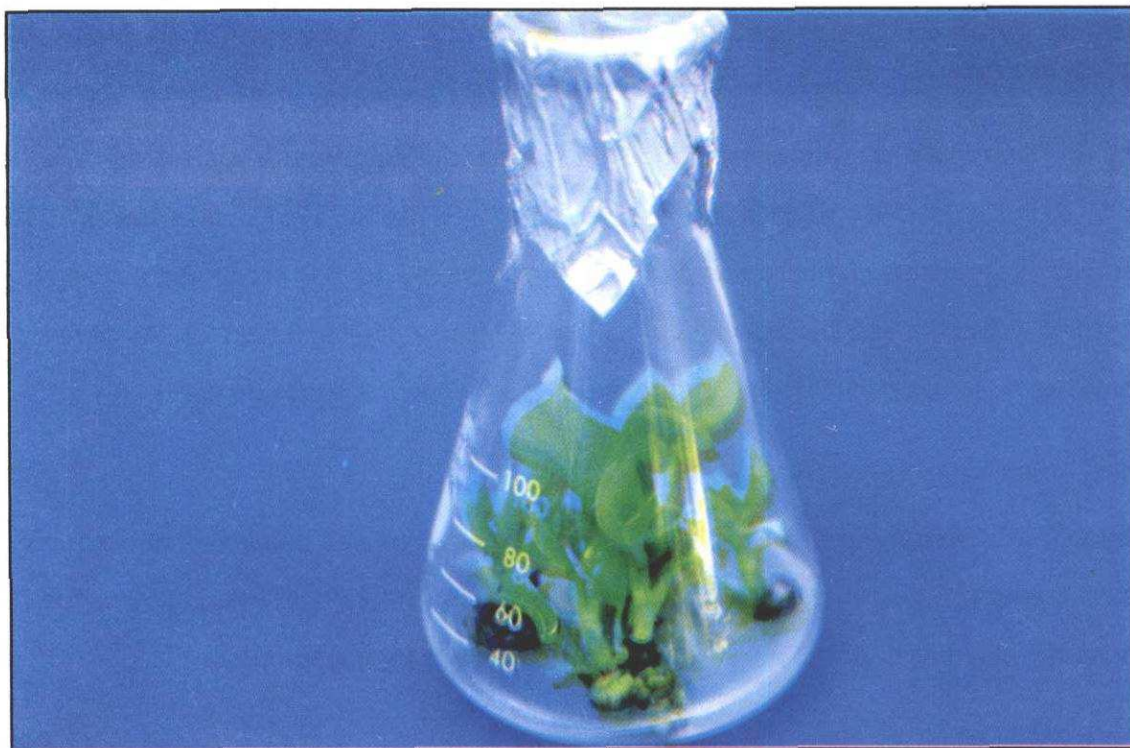


FIG. 83 - Indução de brotações de pimenta-do-reino a partir de ápices caulinares.



FIG. 84 - Enraizamento de brotos de pimenta-do-reino.

- Indução de calos e regeneração de plântulas a partir de segmentos de hipocótilo de plântulas *in vitro*

Os explantes (segmentos de folha e hipocótilo) foram inoculados em tubos de ensaio (100mm X 25mm) com meio semi-sólido MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarose 3%, pH 5,8, suplementados com várias combinações de concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg.l⁻¹) e 6-benzilaminopurina (BAP 0,0; 0,2; 0,4 e 0,6mg.l⁻¹). As condições de cultivo foram de ausência de luz e temperatura de 25°C ± 2°C para indução de calos.

Os calos obtidos foram transferidos para meio MS suplementado com ácido 3-indolilacético (AIA 0,5mg/l) mais BAP (1,5 ou 2,5mg/l) e cultivados sob condições de fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro. Após os calos diferenciarem parte aérea foram transferidos para o mesmo meio, mas suplementado com 0,5mg/l ANA para formação de plântulas.

A indução de calos, a partir de segmentos de folhas apresentou alta taxa de oxidação e baixa formação de calos, porém segmentos de hipocótilo foram mais responsivos aos tratamentos submetidos, pois mesmo havendo oxidação, ocorreu formação de calos em todos os meios (Fig. 85). Ademais, o melhor resultado de formação de calos foi obtido em meio de cultura com 1mg/l 2,4-D e 0,2mg/l BAP. A diferenciação de calos em parte aérea (Fig. 86) foi favorecida quando estes foram cultivados em meio, com maior concentração de BAP (2,5mg/l) e AIA (0,5mg/l), com indícios de que a citocinina tem um papel importante no processo de diferenciação de calos. Uma vez diferenciada a parte aérea a partir de calos, a obtenção de plântulas completa ocorreu quando estas foram transferidas para o meio com auxina (ANA 0,5mg/l), onde formaram raízes (Fig. 87). As plântulas serão aclimatadas em câmara úmida, em substrato com terra preta e serragem, e, posteriormente, transplantadas para sacos de plástico para crescimento e formação de mudas sob casa-de-vegetação.

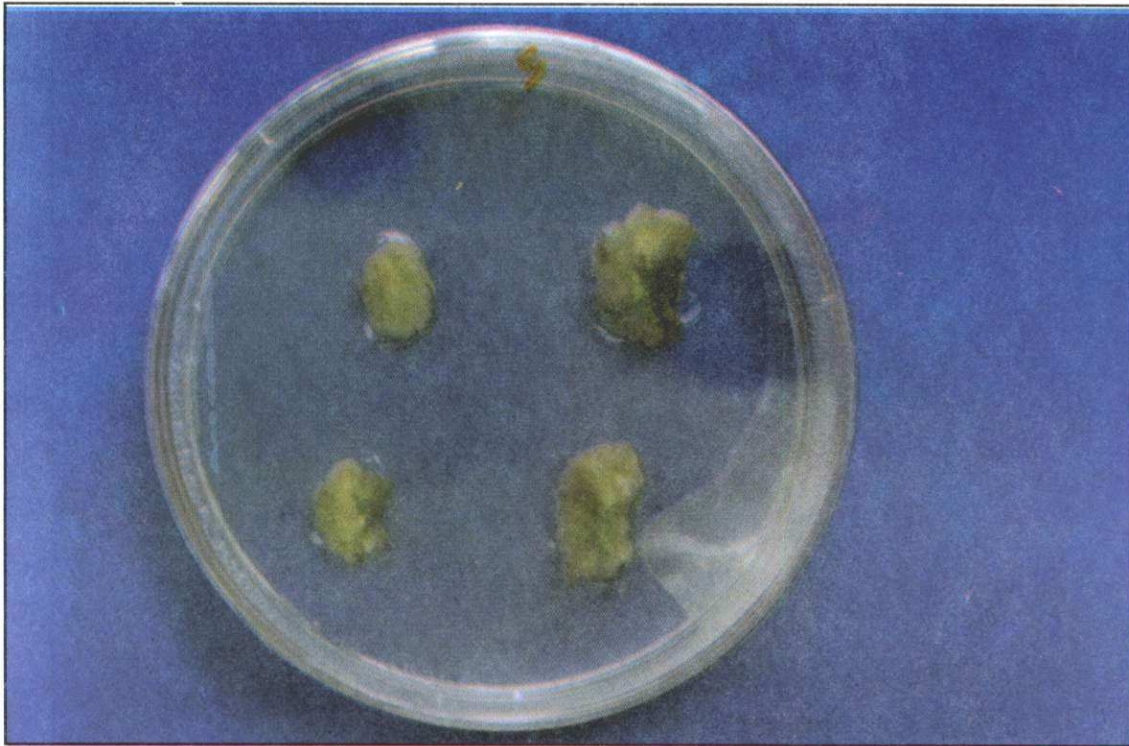


FIG. 85 - Indução de calos de pimenta-do-reino a partir de segmentos de hipocótilo.

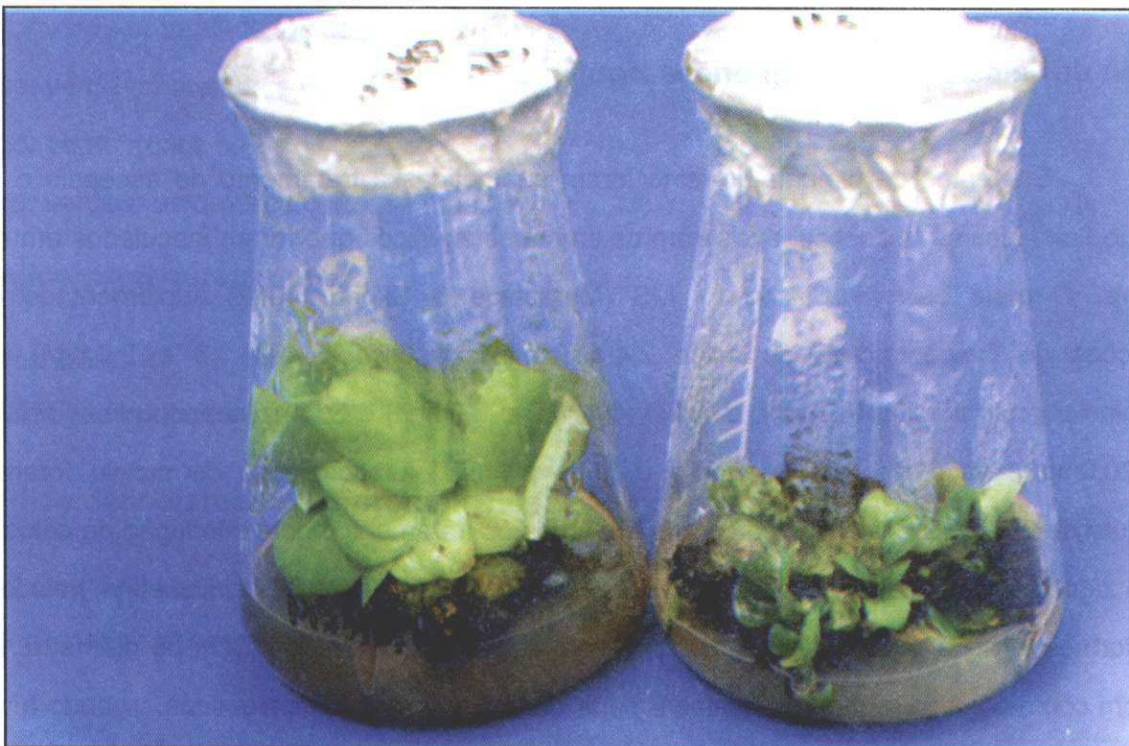


FIG. 86 - Diferenciação da parte aérea a partir de calos de segmentos de hipocótilo de pimenta-do-reino.



FIG. 87 - Formação de raízes em brotos diferenciados de calos de segmentos de hipocótilo de pimenta-do-reino.

- Indução de calos a partir de embriões zigóticos

Sementes de pimenta-do-reino foram submetidas a tratamento de assepsia e, sob câmara de fluxo laminar asséptica, excisaram os embriões zigóticos que foram inoculados em meio de cultura. O meio básico utilizado foi MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com combinações de concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D 1,0 e 2,0mg/l) e 6-furfurilamino-purina (cinetina 0,1mg/l), e 2,4-D (0,1; 1,0 e 5,0mg/l) e 6-benzilaminopurina (BAP 1,0; 10,0 e 20,0mg/l), sacarose a 3%, ágar a 0,7% e pH 5,8. As condições de cultivo foram de temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz. Em todos os tratamentos houve indução de calos nos embriões zigóticos, com melhores respostas em meio com 1mg/l 2,4-D e 0,1mg/l cinetina, pois foram mais uniformes e, após 45 dias de cultura, formaram calos com cerca de 1,5cm de diâmetro. Este estudo tem como objetivo regenerar plantas a partir de calos de embriões zigóticos, visando futuros trabalhos para a obtenção de mutantes a partir de sementes irradiadas, com raios gama ^{60}Co .

- Isolamento de protoplastos a partir de folhas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) -

Esta ação de pesquisa tem como objetivo regenerar plantas a partir de protoplastos visando produzir híbridos somáticos pela fusão de protoplastos que serão tolerantes a doenças de fungos ou bactérias.

- Abreviaturas:

2ME - 2-mercaptoetanol; CR10 - celulase "Onozuka" R-10 (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japão); CRS - Celulase "Onozuka" RS (como R-10); DTT - (+)-Dithiothreitol; MR-10 - Macerozyme R-10 (como CR-10); MS - Meio de Murashige e Skoog (1962); PVP - Polyvinylpyrrolidone (K=40); Y-23 - Pectoliase Y-23 (Seishin Co., Tokyo, Japão).

- Estádios de desenvolvimento das folhas:

A: cor verde clara, muito delgada e muito tenra;

B: cor verde-amarelada, delgada e muito tenra;

C: cor verde-amarelada a verde, delgada e tenra;

D: cor verde, tenra;

E: cor verde a verde escuro, quase madura.

- Índice de escurecimento:

5+ (controle), 4+, 3+, 2+, +, - (não escurecimento)

Determinado por observação.

- Índice de isolamento de protoplastos:

7+ (bem), 6+, 5+, 3+, 2+, +, - (não)

Determinado por observação em microscópio

- Procedimento para isolamento de protoplasto de pimenta-do-reino:

- . Coleta de folhas (estádio de desenvolvimento de acordo com o experimento);
- . Limpeza das folhas levemente com etanol 70%;
- . Corte das folhas com uma lâmina em pequenos pedaços ($1-4 \text{ mm}^2$) em 10 ml de solução contendo 0,6 M manitol e 5 mM MES (pH 5,7) com 2ME ou DTT numa placa de petri ($150 \times 20 \text{ mm}^2$). As concentrações de 2ME e DTT são especificadas em cada experimento;
- . Incubação dos pedaços de folhas na mesma solução por 2 horas;
- . Transferência dos pedaços de folhas para papel filtro para drenar o excesso de solução;
- . Incubação dos pedaços de folhas (1 g/placa) em placas de petri ($60 \times 15 \text{ mm}^2$) com 10 ml de solução de enzima a 21°C por 17 horas em agitação a 40-50 rpm. A formulação das soluções foi especificada em cada experimento.
- . Após suave agitação das placas de petri para suspensão dos protoplastos, filtrar a solução para becher de 50ml, utilizando Calbiochem, CA., USA;
- . Transferência, para tubos de centrifuga cônico de 15 ml;
- . Centrifugação a 400-500 rpm (80-100 Xg) por 10 minutos;
- . Remoção do sobrenadante com pipetas de 2 ml;
- . Ressuspensão dos protoplastos em 1 ml de solução de lavagem (mesma solução usada quando de cortes) em tubos de centrifuga cônico de 15 ml;
- . Se requerido, deve ser centrifugado em 5 ml de solução de sacarose 1,5 M contendo 5 mM MES (pH 5,7) e 5 mM DTT.

A primeira etapa deste estudo foi determinar qual a substância que evitaria o escurecimento das folhas. Foram usadas folhas no estágio C, solução de corte 0,6M manitol, 5mM MES (pH 5,7) e 2ME ou DTT. Foi usado 100 ml de solução para cada 10-13 g de materiais de folha (5-7 folhas). A solução de enzima continha 1/2 MS; 0,35M manitol; 0,35M sorbitol; 5mM MES (pH 5,7); 0,1 % Y-23; 1,0 % CR-10, e 2ME (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 $\mu\text{l}/10 \text{ ml}$), ácido cítrico (0, 5, 10, 20 e 50 mM), DTT (0, 5, 10, 20 e 50 mM) ou PVP (0, 1, 2 e 3 %). 2ME foi muito efetivo contra escurecimento porém, este pareceu ser tóxico para as células, pois muitas romperam-se em solução com 2ME (a partir de 5mM). Então, DTT (a partir de 5 mM) foi preferível como um produto químico contra o escurecimento a ser usado em isolamento de protoplastos de pimenta-do-reino (Tabela 54).

TABELA 54 - Resposta de tecido foliar ao escurecimento submetido a diferentes anti-oxidantes em solução para isolamento de protoplastos de pimenta-do-reino.

Tratamento	Concentração	Índice de escurecimento
PVP (%)	0	5 +
	1	5 +
	2	4 +
	3	3 +
Ácido cítrico	0	5 +
	5	5 +
	10	4 +
	20	3 +
	50	2 +
DTT (mM) ¹	0	5 +
	1	3 +
	2	+
	3	-
	.	.
	.	.
	50	-
2 ME (mM) ²	0	5 +
	1	4 +
	2	4 +
	3	3 +
	4	+
	5	-
	.	.
	.	.
	.	.
	9	-

¹ Na concentração acima de 3mM até 50mM DTT os resultados foram semelhantes.

² Na concentração acima de 5mM até 9mM 2ME os resultados foram semelhantes.

Na segunda etapa avaliaram-se os efeitos de solução de enzimas em folhas no estágio C, cortadas em 100ml de solução 0,6M manitol, 5mM MES (pH 5,7), para cada 10-13 g de materiais de folha (5-7 folhas) com 50 µl 2ME. A solução de enzimas continha 1/2 MS; 0,35M manitol; 0,35M sorbitol; 5mM MES (pH 5,7) em combinações de CR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %) e MR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %); CR-10 (1,0; 2,0 e 3,0 %) e MR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %); e CR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %) e Y-23 (0,03; 0,05 ou 0,1 %). Neste caso, Y-23 foi mais efetiva que MR-10 quando combinada com CR-10, mas Y-23, em alguns casos, apresentou efeitos tóxicos aos protoplastos. Entretanto, quando comparou-se os efeitos de Y-23 (0,03; 0,05 ou 0,1 %) combinado com CR-10 (0,3; 0,5 ou 1,0 %) ou CRS (0,3; 0,5 ou 1,0 %), CR-10 foi mais efetiva que a CRS (Tabela 55).

TABELA 55 - Índice de isolamento de protoplastos de mesofilo foliar em solução de enzimas com pectoliase Y-23, combinada com Celulase R-10 ou Celulase RS, após 17 h de incubação.

Solução (%)	(%)	Y-23 (%)		
		0,03	0,05	0,1
CR-10	0,3	+	+	2+
	0,5	3+	3+	4+
	1,0	3+	3+	3+
CRS	0,3	+	+	+
	0,5	+	+	2+
	1,0	2+	2+	2+

Na terceira etapa avaliaram-se os efeitos do estágio de desenvolvimento de folha sobre o isolamento de protoplastos e escurecimento do material. Os estádios de folhas foram A, B, C, D e E, cortadas em 100ml de solução com 1/2MS; 0,6M manitol; 5mM MES (pH 5,7), para cada 2-5g de material de folha (2-4 folhas) com 5mM DTT. Em outro experimento foi adicionado DTT a várias concentrações (15mM para folhas no estágio A, 10mM para folhas no B, e 5mM para folhas nos estádios C e D). Para o isolamento de protoplastos, as soluções de enzimas testadas foram 1/2MS; 0,35M manitol; 0,35M sorbitol; 5mM MES (pH 5,7); 0,1% Y-23; 1,0% CR-10 e 3mM DTT; e

1/2MS; 0,35M manitol; 0,35M sorbitol; 5mM MES (pH 5,7); 0,1% Y-23; 1,0% CR-10 com DTT adicionado a várias concentrações (15mM para folhas no estágio A, 10mM para folhas no estágio B, e 5mM para folhas nos estádios C e D). Quando foram usadas folhas no estágio A, as células foram facilmente rompidas e o material para isolamento de protoplastos não foi bom. Os protoplastos foram isolados a partir do estágio B e as células, após tratamento com solução enzimática, apresentaram elevada viscosidade e difícil ressuspensão. As folhas no estágio C foram boas para isolar protoplastos, entretanto também apresentaram muita viscosidade e de difícil ressuspensão após o tratamento. O número de protoplastos isolados de folhas no estágio D foi menor do que aqueles dos estádios B e C. Contudo, não apresentaram tanta viscosidade e os protoplastos foram fáceis de ressuspensão em solução (Tabela 56).

TABELA 56 - Respostas de tecido foliar de diferentes estádios de desenvolvimento, ao escurecimento e ao isolamento de protoplastos, sob ação de solução enzimática com diferentes concentrações de DTT.

Estádio de desenvolvimento de folhas	A	B	C	D	E
Índice de escurecimento ¹	3+	1+	-	-	-
Índice de isol. de protoplastos	-	-	3+	3+	+
Índice de escurecimento ²	-	-	-	-	-
Índice de isol. de protoplastos	+	3+	2+	2+	-

¹Solução de corte com 5mM DTT e solução de enzimas com 3mM DTT para todos os estádios de desenvolvimento da folha.

²Solução de corte e solução de enzimas com DTT a 15, 10 e 5mM, para folhas nos estádios A, B, C e D, respectivamente.

O potencial osmótico de solução de enzimas testada (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0M) mostrou que a solução com 0,7M é preferível para o isolamento de protoplastos de folhas de pimenta-do-reino (Tabela 57), sendo a combinação das enzimas Y-23 (0,05%) e CR-10 (0,05%) a mais efetiva (Tabela 58).

TABELA 57 - Efeito de osmose no isolamento de protoplastos.

Osmose (M)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
IIP ¹	-	-	-	-	+	3+	4+	4+	4+	4+	4+

¹ Índice de isolamento de protoplastos

TABELA 58 - Índice de isolamento de protoplastos de mesófilo foliar de pimenta-do-reino sob a ação de enzimas Pectoliase Y-23 e Celulase R-10, após 17 h de incubação.

Solução	(%)	Y-23 (%)		
		0,03	0,05	0,1
(%)				
CR-10 (%)	0,3	+	+	2+
	0,5	3+	4+	3+
	1,0	3+	3+	3+

- Castanheira-do-brasil

A castanheira-do-brasil é uma espécie com problemas de germinação por apresentar sementes recalcitrantes, sendo difícil a produção de mudas. Os estudos com micropropagação desenvolveram-se através de testes de assepsia onde foram usados segmentos nodais e internodais de caule e segmentos de folha, como explantes. Estes foram lavados em água corrente com detergente, imersos em etanol a 70%, por 15 segundos, e logo após lavados com água destilada e transferidos para solução de hipoclorito de sódio (NACIO) a 3%, por 15 minutos e, por fim, lavagem em água destilada autoclavada, por três vezes, sob câmara de fluxo laminar.

Os calos de coloração esverdeada iniciaram a indução, após treze dias, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 0,5mg/l AIA, 1,5mg/l BAP e 2% PVP (ácido 3-indolilacético, 6-benzilaminopurina e polivinil-pirrolidona, respectivamente), enquanto os calos de

coloração branca foram obtidos a partir de treze dias de cultura em meio MS, suplementado com 1,0mg/l 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e 0,5mg/l netina, 6-furfurilamino-purina, (Fig. 88). Após 45 dias de cultura, os calos foram transferidos para meio MS, suplementado com combinações de concentrações de AIA (0,5 e 1,0mg/l) e BAP (1,0 e 3,0mg/l) ou 2,4-D (2,0mg/l) e cinetina (0,5mg/l), com maior crescimento dos calos em meio suplementado com AIA e BAP, porém sem regeneração de plantas.

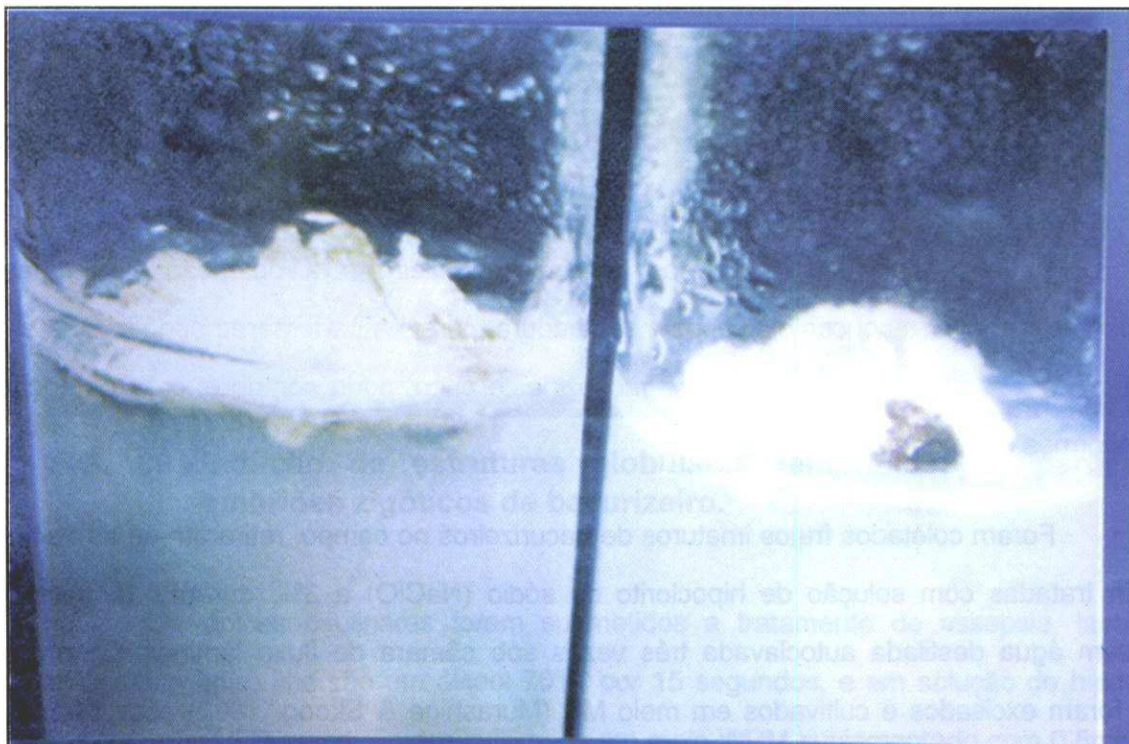


FIG. 88 - Indução de calos a partir de segmentos de caule de castanha-do-brasil.

Os calos de coloração clara a esverdeada, também foram obtidos, apresentando aspecto "friáveis", quando os explantes foram cultivados em meio WPM (Wood Plant Medium) suplementado com 0,5mg/l AIA + 3,0mg/l BAP ou 3,0mg/l BAP. O teste de cultivo de ápices caulinares, em meio WPM, com 2% PVP, indicaram boas respostas. Meristemas contendo dois folíolos foram cultivados em três meios (1/2 MS, MS e WPM), suplementados com 1mg/l BAP + 2% PVP e pH 5,8. Durante duas semanas foram cultivados no escuro e em seguida na presença de luz. Após 20 dias foram avaliados quanto ao crescimento dos folíolos, conforme dados mostrados na Tabela 59.

TABELA 59 - Respostas de ápices caulinares de castanha-do-brasil, em três meios de cultura, após 20 dias de cultivo.

Meio de cultura**1	Número de explante	Explante crescido	Explante oxidado	Contaminação (%)
1/2 MS*	11	5	6	0
MS	10	8	2	0
WPM	10	9	1	0

* Meio de cultura contendo metade da concentração de sais básico de MS (1/2 MS); sais básico completo de MS (MS); e sais básico de Wood Plant Medium (WPM).

- Bacurizeiro

Um dos principais problemas com o bacurizeiro é a obtenção de mudas. O lançamento de raiz ocorre poucos dias após a semeadura, porém a parte aérea pode levar até mais de 500 dias para ser lançada. A micropropagação, neste caso, pode contribuir para obtenção de mudas uniformes em menor tempo.

Foram coletados frutos imaturos de bacurizeiros no campo, retiraram-se as sementes que foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 3%, durante 15 minutos, e lavadas com água destilada autoclavada três vezes sob câmara de fluxo laminar. Os embriões zigóticos foram excisados e cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com 1,0mg/l AIA (ácido 3-indolilacético) e 1,0mg/l cinetina (6-furfurilamino-purina). Após 45 dias houve intumescimento de alguns embriões e mudanças de cor, de amarelo para verde e avermelhado. Então, foram transferidos para o mesmo meio, mas suplementado com 2,0mg/l 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou 1,0mg/l BAP (6-benzilaminopurina). Os embriões em meio com BAP apresentaram várias pontuações verdes semelhantes a embrióides, conforme mostra a Fig. 89.



FIG. 89 - Indução de estruturas globulares (embrióides) a partir de embriões zigóticos de bacurizeiro.

Os ápices caulinares foram submetidos a tratamento de assepsia, lavagem em água destilada e detergente, imersão em álcool 70%, por 15 segundos, e em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, por 15 minutos. Foram cultivados em meio WPM suplementado com 0,5mg/l BAP, no qual alguns explantes cresceram e emitiram brotações, como mostra a Fig. 90.

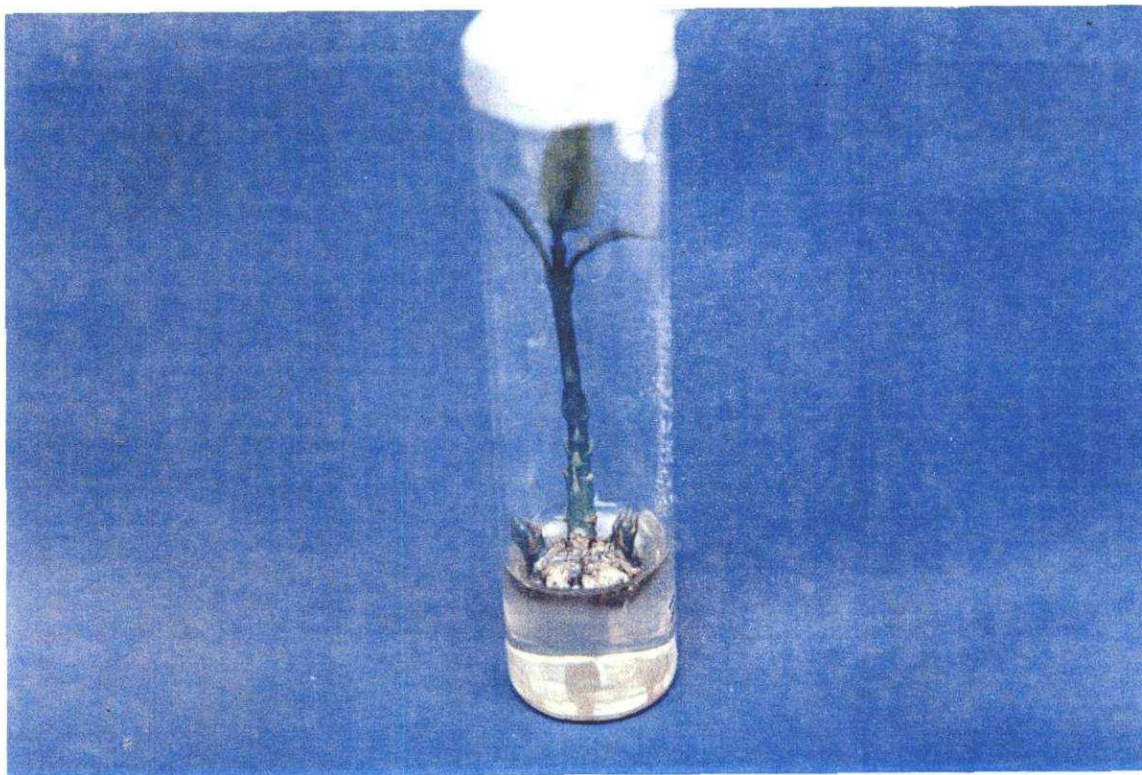


FIG. 90 - Indução de brotações a partir de ápices caulinares de bacurizeiro.

- Urucuzeiro

O urucuzeiro é uma planta arbustiva, cujas sementes produzem corantes, bixina e norbixina, de grande utilização na produção de cosméticos, conservação de alimentos, etc. Apresenta grande variabilidade genética, cor e formato do fruto, produção, teor de corante, porte da planta, constituindo-se, a maioria dos plantios com grande desuniformidade, principalmente devido a propagação ser basicamente através de sementes.

Estudos visando a micropropagação de plantas foram realizados tomando como explantes embriões zigóticos provenientes de sementes maduras de plantas no campo. As sementes foram lavadas e desinfestadas com álcool a 70%, por 5 minutos, e hipoclorito de sódio (NaClO) a 1%, por 15 minutos. O meio de cultura usado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,25; 0,50 e 1,0mg/l); cinetina (0,50mg/l); AIA (0,25 e 0,50mg/l); BAP (1,0; 2,0 e 4,0mg/l); AIB (1,0; 2,0 e 4,0mg/l), (ácido 2,4-diclorofenoxiacético;

6-furfurilamino-purina; ácido 3-indolilacético; 6-benzilaminopurina; ácido indolilbutírico, respectivamente) pH 5,8, e condições de cultivo sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz por oito horas de escuro, intensidade de iluminação de 3.000 lux e umidade relativa do ar de aproximadamente 70%.

A indução de calos ocorreu em meio com 2,4-D (0,5mg/l) e cinetina (0,5mg/l) ou 2,4-D (1,0mg/l) e cinetina (0,5mg/l) os quais originaram embriões sob a mesma condição de cultivo, quando transferidos para meio sem regulador de crescimento ou suplementado com 0,25mg/l AIA. Os embriões, uma vez transferidos para o meio com AIB a 1,0 e 4,0mg/l, atingiram o estágio de plântulas. Ressalta-se que embriões somáticos foram induzidos, diretamente de embriões zigóticos, sem passar pela fase de calos, em meio MS, sem regulador de crescimento, ou quando suplementado com 0,25mg/l 2,4-D.

Os melhores resultados para indução de calos foram observados quando embriões zigóticos foram cultivados em meio MS suplementado com 1,0mg/l 2,4-D e 0,5mg/l cinetina; maior quantidade de formação de embriões somáticos quando em meio com 0,25mg/l AIA, e conversão de embriões somáticos em plântulas em meio com 1,0mg/l AIB. Ademais, a adição de 0,25mg/l 2,4-D, em meio MS, apresentou-se como eficiente na indução de embriogênese somática direta. A Fig. 91 mostra a regeneração de plântulas de urucuzeiro, via embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos de sementes maduras.



FIG. 91 - Regeneração de plantas de urucuzeiro, via embriogênese somática, a partir de embriões zigóticos de sementes maduras.

- Guaranazeiro

O guaranazeiro, espécie nativa da Amazônia, é uma planta arbustiva, produtora de sementes rica em cafeína, que é amplamente empregada na indústria de refrigerantes. Apresenta ampla variabilidade genética e é propagada principalmente através de sementes. Para os estudos de micropropagação, através de técnicas de cultura de tecidos, foram realizados testes de assepsia usando-se como explantes ápices caulinares de lançamentos novos, a partir de plantas do BAG da EMBRAPA-CPATU. Os explantes foram lavados em água corrente e submetidos a choque térmico, mergulhando-os alternadamente em água esterilizada a 5 °C e 50 °C. Em câmara de fluxo laminar asséptica foram tratados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO), a várias concentrações (2,0; 3,0; 3,5 e 4,0%), durante 15 minutos e, posteriormente, lavados em água autoclavada por 3-5 vezes.

Os resultados não foram satisfatórios pois não se conseguiu explantes assépticos. O desenvolvimento do trabalho foi prejudicado, tornando evidente a necessidade das matrizes serem cultivadas sob casa-de-vegetação, para, a partir dessas plantas, serem obtidos explantes.

- Açaizeiro

O açaizeiro é uma das palmeiras mais típicas do Pará. Sua maior ocorrência é no estuário do rio Amazonas, em terrenos de várzea, de igapó e na terra firme. Tem grande importância alimentar e econômica para a região (alimento e indústria de palmito), especialmente entre as classes média e baixa, tendo ocorrência por toda a região, desde o Maranhão às Guianas e Venezuela. Entretanto, devido à exploração indiscriminada para palmito, está sendo ameaçado de perda de grande parte da variabilidade genética.

A propagação clonal, para esta espécie, se constituiem um entrave para a multiplicação de genótipos superiores, pois ocorre basicamente através de sementes. Para micropropagação clonal, pontas de raízes novas (explantes) foram submetidas a testes de assepsia, lavando-os em água corrente e com detergente, seguida de termoterapia, colocando o material em estufa a 40°C, durante cinco minutos, ou a choque térmico, imersão em água a 5°C e a 50°C, alternadamente. Em câmara de fluxo laminar asséptica foram tratados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5; 2,0 e 3,0%, durante dez a quinze minutos, e, posteriormente, lavados com água destilada autoclavada antes de serem inoculados em meio de cultura com metade dos sais básico de MS (MS/2). As Tabelas 60 e 61 mostram a eficiência de tratamento de assepsia usando termoterapia e choque térmico, antes da imersão em solução de hipoclorito de sódio.

TABELA 60 - Assepsia de explantes de açaizeiro, previamente submetidos à termoterapia, a tratamentos com hipoclorito de sódio e a diferentes tempos de exposição após 15 dias de cultura.

NaClO (%)	Tempo (min.)	Explante com contaminação	Explante sem contaminação	Eficiência (%)
0,5	10	10	0	0
0,5	15	8	2	20
2,0	10	5	5	50
2,0	15	8	2	20
3,0	10	8	2	20
3,0	15	8	2	20

TABELA 61 - Assepsia de explantes de açaizeiro, previamente submetidos a choque térmico, a tratamentos com hipoclorito de sódio e a diferentes tempos de exposição, após 15 dias de cultura.

NaClO (%)	Tempo (min.)	Explantes com contaminação	Explantes sem contaminação	Eficiência (%)
2,0	10	10	0	0
2,0	15	10	0	0
3,0	10	5	5	50
3,0	15	9	1	10
4,0	10	5	5	50
4,0	15	7	3	30

Os dados sugerem para tratamento de assepsia de explantes (ponta de raízes novas) com termoterapia, solução de hipoclorito de sódio a 2,0%, por dez minutos, enquanto com choque térmico, solução de hipoclorito de sódio a 3,0 e 4,0% durante dez minutos. Entretanto, os dados não foram confirmados devido, principalmente, à natureza dos explantes, pois dificilmente se consegue

explantes nas mesmas condições de plantas no campo. Portanto, para controle e obtenção de explantes mais praticável para assepsia, é necessário o desenvolvimento de plantas em casa-de-vegetação.

Os explantes livres de contaminação foram transferidos para meio básico B5 (Gamborg et al., 1968), suplementado com 1,5mg/l BAP (6-benzilaminopurina), no qual intumesceram mas não diferenciaram-se.

Outro estudo desenvolvido com esta espécie foi a regeneração de plantas, a partir de embriões zigóticos, cujo objetivo maior, devido à recalcitrância das sementes, foi obter plântulas via embrião zigótico de sementes submetidas à secagem rápida (flash-dry), seguido de armazenamento em câmara fria.

As sementes foram despulpadas e lavadas em água, sob câmara de fluxo laminar asséptica e imersas em álcool a 70%, por cinco minutos, seguidas de imersão em hipoclorito de sódio a 2%, por quinze minutos, e lavagem em água destilada autoclavada por várias vezes. Os embriões foram excisados e colocados durante alguns minutos em solução de polivinilpirrolidona (PVP 0,5 e 2,0%), ácido ascórbico (0,15 e 0,3%) e ácido cítrico (150 a 250mg/l) para evitar oxidação. Posteriormente, foram inoculados em meio básico para embrião (ME) contendo macro e micronutrientes, vitaminas, caseína hidrolisada, ágar 1% e pH 5,8. Após quatorze dias houve lançamento da parte aérea e das raízes, sendo então transferidos para o mesmo meio, suplementado com ácido 3-indolilacético (AIA 2,5mg/l) para desenvolvimento.

Por outro lado, os embriões foram cultivados em meio MS (Morashige & Skoog, 1962) semi-sólido, modificados com 0,17g/l NaH_2PO_4 , carvão ativado 0,2%, pH 5,8 suplementado com várias combinações de ANA e BAP (0,1; 0,5 e 1,0mg/l). A Tabela 62 mostra os resultados obtidos após 30 dias de cultivo, sob condições de fotoperíodo 16 horas de luz por oito horas de escuro, intensidade de iluminação de 3.000 lux e temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

TABELA 62 - Respostas de embriões zigóticos de açaizeiro em meio MS modificado, com diferentes combinações de ANA e BAP, após 30 dias de cultivo.

Tratamento (Meio MS ¹)	Classificação das respostas			
	Desenvolvimento de plântula	Desenvolvimento atrofiado	Sem resposta	Contaminação (%)
B _{1,0} N _{1,0}	05	00	04	00
B _{0,5} N _{1,0}	4	3	2	1
B _{0,1} N _{1,0}	6	2	1	1
B _{1,0} N _{0,5}	5	4	1	0
B _{0,5} N _{0,5}	7	3	0	0
B _{0,1} N _{0,5}	1	4	5	0
B _{1,0} N _{0,1}	2	5	1	1
B _{0,5} N _{0,1}	4	1	4	0
B _{0,1} N _{0,1}	3	1	5	1
Testemunha ²	1	6	1	2

¹ Sais básico e vitaminas de MS, 0,17 g/l NaH₂PO₄, carvão ativado 0,2%, pH 5,8, suplementado com BAP (B 0,1; 0,5 e 1,0mg/l) e ANA (N 0,1; 0,5 e 1,0mg/l).

² Meio de cultura sem regulador de crescimento.

Os dados obtidos demonstraram que um balanço hormonal, com maior concentração de auxina (1,0mg/l ANA), em relação à citocinina (0,1mg/l BAP), favoreceu o desenvolvimento do embrião a converter-se em plântulas (Fig. 92). Por outro lado, concentrações semelhantes de auxina (0,5 ou 1,0mg/l ANA) e citocinina (0,5 ou 1,0mg/l BAP) favoreceram mais a conversão de embriões zigóticos em plântulas, enquanto meio sem reguladores de crescimento não permitiram boa formação de plântulas e os embriões tenderam a atrofiarem-se.

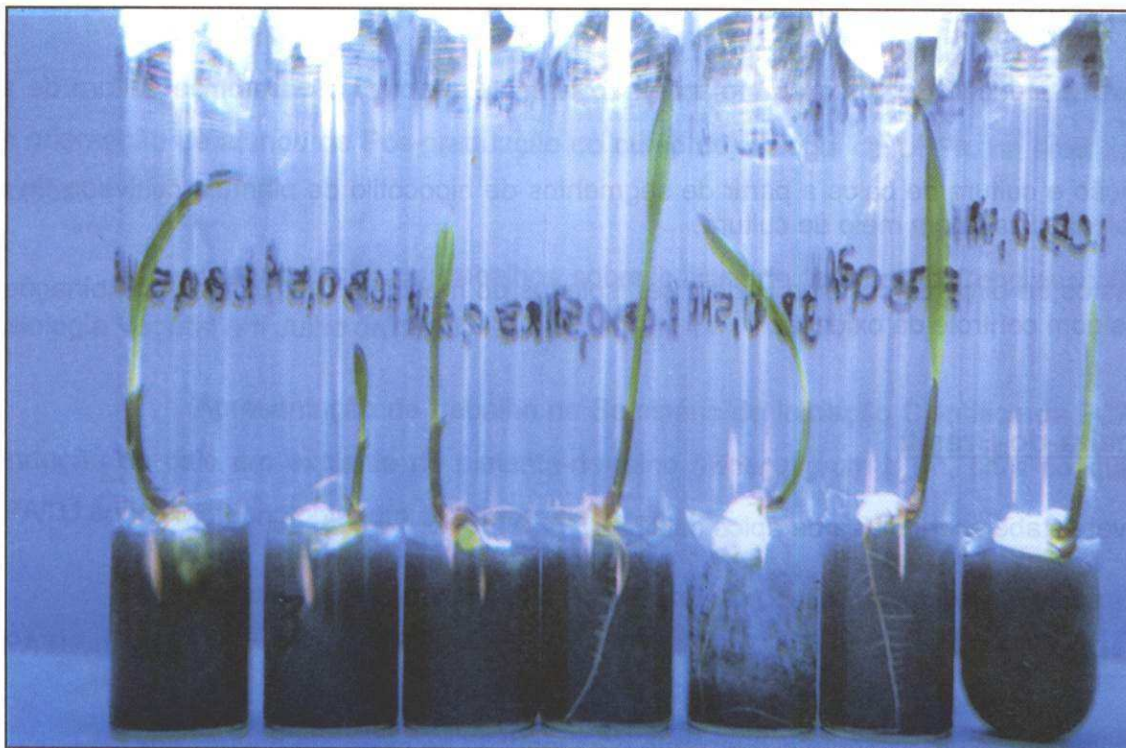


FIG. 92 - Obtenção de plantas de açazeiro a partir de embriões zigóticos de sementes maduras.

Conclusões preliminares

Os resultados obtidos neste projeto permitem o estabelecimento das seguintes conclusões:

Quina:

- É possível estabelecer as técnicas de obtenção de calo de explante de campo.

Ipeca:

- Múltiplas brotações e regeneração de plântulas a partir de segmentos nodais são obtidas em cultura "in vitro".

Pimenteira-do-reino:

- É possível a indução de múltiplas brotações de pimenteira-do-reino a partir de cultura de ápice caulinar;
- A obtenção e cultura de calos a partir de segmentos de hipocótilo de plântula cultivada "in vitro" pode ser viabilizada em meio de cultura;
- Protoplastos de pimenta-do-reino podem ser isolados do mesófilo foliar usando combinações de enzimas com controle da oxidação.

Castanheira-do-Brasil:

- É possível estabelecer cultura de ápice caulinar.

Bacurizeiro:

- Embrião imaturo, é um explante conveniente para indução de calos em bacurizeiro;
- Ápices caulinares de bacurizeiro podem ser estabelecidos em culturas.

Urucuzeiro:

- Regeneração de plântulas via embriogênese somática a partir de embriões zigóticos é obtida em cultura "in vitro".

Açaizeiro:

- Embriões zigóticos podem produzir calos "in vitro";
- Plântulas a partir de embriões zigóticos podem ser obtidas em meio de cultivo com combinações de reguladores.

Difusão de tecnologia

- Informação dos resultados alcançados a bolsistas da FCAP e da UFPa, e quando da orientação de alunos de Pós-graduação do curso de Biologia da UFPa, na área de cultura de tecidos.
- Apresentação de trabalhos sobre cultura de tecidos no Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal em Julho de 1993.
- Apresentação de trabalho no Seminário de Iniciação Científica da FCAP/UFPa — "Indução de calo em explante de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e, para pesquisadores do CPATU sobre Biotecnologia, em dezembro de 1992.
- Apresentação do seminário sobre "Resultados de pesquisa em cultura de tecidos. CPATU, 1991".
- Divulgação dos resultados através da imprensa em forma de entrevistas para a TVS e TV Cultura sobre cultivo de plantas medicinais "in vitro" e propagação de ipeca.
- Apresentação de trabalhos no XLIV Congresso Brasileiro de Botânica. 1993:
 - . Embriogênese somática em Urucu.
 - . Propagação de plantas medicinais através de técnicas "in vitro".
 - . Propagação clonal de *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard através de cultura de tecidos.
- Apresentação de trabalho no "V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal" Minas Gerais, 1995.
- Curso prático em cultura de tecidos de plantas, ministrado para professores e pesquisadores da UFPa, FCAP, UFMA, UFCE, UFPI, CEPLAC e CPATU em novembro de 1992 e novembro de 1993.
- Workshop EMBRAPA-CPATU/JICA, do Projeto "Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido". Título do trabalho: "Regeneração a partir de calo em pimenta-do-reino" em março de 1994.
- Curso de cultura de tecido de planta ministrado na I Semana de Pós-graduação da FCAP em abril de 1995.