

Micropropagação de Paricá

(*Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke)

Fotos e Ilustrações cedidas pelos autores

Indução de brotações a partir de segmentos nodais

Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro
Eng. Florestal/Mestranda/FCAP
cordeiro@canal13.com.br

Osmar Alves Lameira
Eng. Agro. Doutor/Pesquisador
Embrapa Amazônia Oriental
osmar@cpatu.embrapa.br

Evaristo Francisco de Moura Terezo
Eng. Florestal, consultor
terezot@terra.com.br

Paulo Luís Contente de Barros
Eng. Florestal Prof. Dr. FCAP
char@amazon.com.br

Selma Toyoko Obashi
Eng. Florestal, Doutoranda/FCAP
obasbt@terra.com.br

INTRODUÇÃO

As espécies arbóreas de interesse econômico constituem um dos grupos mais sujeitos à depredação devido ao seu extrativismo desordenado. Portanto, o estudo propagativo por sementes ou por métodos assexuados é extremamente importante no resgate e conservação da variabilidade genética destas espécies. Neste sentido, investigações a respeito de espécies florestais, de rápido crescimento, têm avançado constantemente, sobretudo no que se refere à multiplicação rápida de uma

determinada cultivar e a uniformização de atributos tecnológicos da madeira. Desse modo, a utilização da cultura de tecidos apresenta-se como uma importante ferramenta quando se pretende multiplicar vegetal promissor, assim como diminui a pressão e o predatismo sobre as florestas.

Nos últimos anos, a técnica de cultura de tecidos vegetais *in vitro* tem sido aplicada para propagar e multiplicar plantas lenhosas (Sommer e Wetstein, 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) em capturar os componentes genéticos aditivos e não aditivos (Assis, 1996) ao ser colocado em condições físicas e químicas artificiais (Serra, 1999) induzindo o vegetal a promover seu melhor desenvolvimento e crescimento.

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. 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

Preparo e assepsia das sementes

- Imersão em água/ 24h;
- Desponte;
- Lavagem com água corrente;
- Imersão em álcool 70%/1min;
- Imersão em NaOCl 3%/10min;
- Lavagem em água esterilizada (3x).

Plântulas *in vitro* (Segmentos nodais)

- Excisão dos explantes;
- Inoculação em meio de cultura MS modificado, suplementado com BAP e KIN;
- PH 5,8.

Brotações

- Condições de cultivo:
- Temperatura 25°C +;
- Fotoperíodo 16h de luz;
- Irradiância de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Figura 1 – Fluxograma da metodologia adotada para indução de brotações de paricá

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*) 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. Árvore de grande porte chegando a alcançar até 30 m de altura. Sua madeira é branca, mole e leve, sendo utilizada na fabricação de forros, palitos de fósforos, papel, compensados, pasta de celulose, laminados de alta qualidade (Melo *et al*, 1983). 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)

No contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de reguladores de crescimento na indução de brotações de *Schizolobium amazonicum* a partir de segmentos nodais de plântulas assépticas germinadas *in vitro*, com a finalidade de micropropagar a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

1-LOCAL DE CONDUÇÃO DO ESTUDO

As atividades foram realizadas no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-Pará, conforme mostrado na figura 1. Foram utilizados explantes de plântulas assépticas cultivadas *in vitro*. As sementes de paricá utilizadas foram doadas pela empresa Tramontina Belém S.A.

2-SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA E ASSEPSIA DAS SEMENTES



Figura 2 -Aspecto da plântula de paricá após 7 dias de inoculação. Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002

Com base nos resultados de experimentos anteriores, para superação de dormência e favorecimento do rápido metabolismo de germinação, as sementes de paricá foram imersas em água por um período de 24 horas e em seguida foi realizado o desponete, ou seja, as sementes sofreram um pequeno corte na região lateral do tegumento.

No processo de assepsia, as sementes foram lavadas em água corrente por quinze minutos e imersas em álcool a 70% por um minuto e depois em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por dez minutos, sendo cinco minutos de agitação. Em seguida, lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Posteriormente, acondicionadas sobre um papel toalha, em placas de Petri, previamente esterelizada. O processo de desinfestação das sementes foi realizado em ambiente asséptico.

3- FONTE DE EXPLANTE

Para germinação das sementes, utilizou-se meio de cultura composto de 0,1% de polyvinylpyrrolidone (PVP) e 0,6% agar, na ausência de sais e regulador de crescimento, determinado como eficiente em experimen-

tos anteriores de germinação. O meio de cultura foi ajustado a um pH de 5,8 utilizando-se NaOH (hidróxido de sódio) e/ou HCl (ácido clorídrico) em solução 0,5 N. O meio de cultura foi distribuído na quantidade de 40 ml por frasco. A autoclavagem foi realizada a 121°C durante 15 minutos.

Posteriormente, as sementes foram inoculadas uma em cada frasco e levadas para sala de incubação, sob condições de cultivo de 16 horas de luz com uma irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por um período de quinze dias. Após a germinação e desenvolvimento, as plântulas obtidas serviram como fonte de explantes primário, sendo os segmentos nodais utilizados como propágulos vegetativos para experimentos de micropropagação (Figura 2).

4- MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE PARICÁ

O meio de cultura básico utilizado neste experimento foi composto pelo meio MS (Murashige e Skoog, 1962) modificado acrescido com 0,1% de ácido ascórbico, 3g/L de sacarose e 0,6% de Agar. O meio de iniciação foi suplementado com três concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e duas concentrações de KIN (Cinetina). As seguintes concentrações foram testadas: BAP (4,43; 8,87 e 13,31 μM) e KIN (9,29 e 11,61 μM).

O pH dos meios foi ajustado para 5,8 utilizando-se NaOH e/ou HCl em solução 1N. Em seguida foram distribuídos 10 ml de meio de cultura em tubos de ensaio de 20 x 150 mm. Posteriormente, os tubos foram tampados com papel alumínio e lacrados com filme plástico do tipo pvc. Em seguida foi realizada esterelização em autoclave a pressão de 1,2 atm e temperatura de 121°C, por 15 minutos.

Para o controle da oxidação, e calogênese a concentração de nitrato de amônio (NH_4NO_3) do meio básico foi reduzida à metade, indicada como melhor concentração em experimento anterior. Para equacionar o proble-

ma da oxidação além do procedimento citado, cada um dos segmentos nodais foi imerso em solução contendo ácido ascórbico a 0,1% por 5 minutos, antes da inoculação.

Em câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool a 70%, os segmentos nodais (explantes) com aproximadamente 0,5 a 1,0 cm de comprimento foram inoculados em posição horizontal, sendo um em cada tubo de ensaio. Após a inoculação, os tubos foram tampados e lacrados conforme descrito anteriormente. Conforme estabelecido em experimentos anteriores, o cultivo foi mantido na ausência de luz nos sete primeiros dias e posteriormente nas mesmas condições de cultivo utilizado para germinação das sementes.

As brotações obtidas foram individualizadas e colocadas para multiplicação no melhor tratamento observado. Posteriormente subcultivadas em meio MS com as concentrações de sais reduzidas a metade, sem regulador de crescimento, nas mesmas condições do experimento citado anteriormente.

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 3 g de sacarose e 6 mg/L de AIB (ácido indolbutírico).

5- CONDIÇÃO DO CRESCIMENTO E PARÂMETROS AVALIADOS

Após o sétimo dia, as culturas foram

TABELA 1-Média do número e comprimento de brotos em função das concentrações dos reguladores de crescimento BAP e KIN

Meios de Cultura	MÉDIAS	
	Número dos Brotos.	Comprimento dos Brotos (cm)
MS + 4,43 µMol BAP	1,77 b	0,86 a
MS + 8,87 µMol BAP	1,87 b	0,71 b
MS + 13,31 µMol BAP	2,14 a	0,53 c
MS + 9,29 µMol KIN	1,2 c	0,72 b
MS + 11,61 µMol KIN	1,8 b	0,42 c

Medidas seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste SNK ao nível de 0,05 de probabilidade

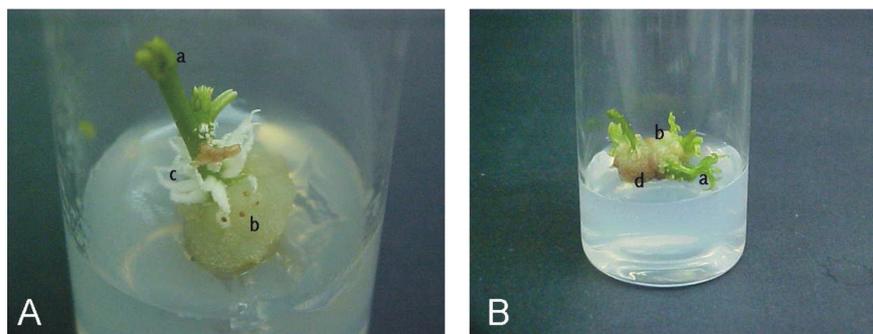


Figura 3 - **A** – Aspecto de formação de: brotação (**a**); calos (**b**) e lenticelas (**c**). **B** – Detalhe de: brotações (**a**); formação de calos (**b**) início de oxidação (**d**). Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. 2002

levadas para sala de crescimento sob condições de cultivo por 16 horas diárias de luz a 25 + 1°C de temperatura, e irradiância de 25µmol.m⁻².s⁻¹.

A avaliação foi realizada ao final de vinte dias de cultivo, com a observação do número e comprimento de brotos, presença de calos e oxidação por explante. As variáveis número de brotações, foram transformadas pela $\sqrt{0,5+x}$ e a variável de resposta comprimento, não sofreu transformação. Estas duas variáveis foram analisadas através da análise de variância comparando as médias pelo teste SNK. Para a presença de calos e oxidação, foi realizada avaliação visual, que consistiu em observar a ocorrência de calos e frequência de oxidação, não sendo realizado análise estatística para essas duas variáveis.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições

sendo cada unidade experimental constituída de cinco tubos de ensaio com um explante por tubo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- COMPORTAMENTO INICIAL DOS EXPLANTES

A análise de variância feita para as variáveis, número médio e comprimento de brotações mostrou interação significativa ao nível de 5% de probabilidade, entre as citocininas e concentrações dos mesmos. O efeito benéfico das citocininas na multiplicação de brotações relaciona-se com a influência desses reguladores de crescimento na divisão celular e na liberação das gemas axiliares, emitidas pela dominância apical.

Os tratamentos que resultaram em maior número médio de brotações foram aqueles suplementados com 13,31 µmol de BAP e 11, 61 µmol de KIN no meio de cultura, com médias de 2,14 e 1,18 brotos por explante, respectivamente. As baixas taxas de multiplicação obtidas no presente trabalho provavelmente estejam relacionadas com a característica da própria planta.

Resultados similares foram encontrados por Andrade *et al*(2000) na propagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*Fr. All) que conseguiram apenas um broto por explante. Estes resultados coincidem também com os registrados por Pasquel e Barros (1992) em segmento

caulinar de barbatimão (*Strynodendron adstringens* (Mart.); Arello e Pinto (1993) com o pau santo (*Kielmeyera coriacea*, Martius).

Os resultados mostraram uma tendência no aumento do número de brotos (1,77 a 2,14 com BAP; 1,12 a 1,18 com KIN) produzidos por explante quando se elevam as dosagens dos reguladores de crescimento, insinuando que provavelmente maiores concentrações poderiam apresentar maiores taxas de brotações. De acordo com Pierik (1990), altas concentrações de citocininas (1 a 10 mg.L⁻¹) no meio de cultura podem induzir a formação de brotos adventícios, porém normalmente o enraizamento tende a ser inibido.

Para o comprimento, houve resposta inversa tanto para o BAP quanto para a KIN, ou seja, a medida que aumentava-se as concentrações dos reguladores de crescimento menor era o comprimento. Esta tendência de diminuição do comprimento da brotação pode estar diretamente ligada às altas concentrações dos reguladores de crescimento, visto que as citocininas estimulam a divisão celular induzindo a multiplicação de brotos, entretanto inibem o crescimento dos mesmos. George (1993); Garttapaçlia e Machado (1998) relatam que a partir de uma determinada concentração ocorre um efeito inibidor, que se caracteriza pela falta de alongamento das culturas, engrossamento excessivo dos caules e vitrificação generalizada das culturas. A Tabela 1, sumariza os resultados das médias obtidas para o número e comprimento de brotos por tratamento.

Com a redução na concentração do nitrato de amônio para metade; imersão dos explantes em solução antioxidante antes da inoculação; e incubação inicial no escuro houve diminuição na percentagem de oxidação nos explantes, todavia não foi possível evitá-la totalmente. Esta constatação comprova que mesmo com a utilização de pré-tratamentos e mo-

dificação no meio MS, o paricá libera substâncias oxidantes. De acordo com Andrade *et al* (2000), 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 da absorção dos metabólitos, o que, em muitos casos, pode dificultar o processo de propagação *in vitro*.

No caso da calogênese tem sido reportado que a incubação inicial da cultura no escuro diminui a oxidação nos explantes mas propicia a formação de calos. A presença de calos friáveis se fez sentir com menor frequência, entretanto, à medida que se aumentou a concentração dos reguladores maior a incidência destes. Segundo Garttapaçlia e Macha-

explantes apresentavam brotações. Durante o período de três semanas foram observados presença de calos friáveis, de lenticelas e o início de oxidação nos explantes (Figura 3A e 3B), sendo necessário fazer limpeza do material vegetal e posterior transferência dos brotos para novo meio de cultura.

Deve-se ressaltar que os reguladores de crescimento são capazes de produzir respostas de grande magnitude, regulando e determinando respostas bioquímicas, fisiológicas ou morfogênicas dos tecidos, o que geralmente varia de acordo com a espécie, de modo que, as condições de cultivo, concentrações e tipo de reguladores de crescimento devem ser ajustados para cada espécie e até mesmo para cada cultivar (Zimmerman, 1981).

2- SUBCULTIVOS DE BROTAÇÕES

As brotações foram individualizadas e inoculadas no melhor tratamento obtido no experimento citado anteriormente (MS modificado +13,31 μmol de BAP). Este tratamento aliado aos procedimentos para redução de oxidação e calos passou ser utilizado para o estabelecimento *in vitro* do material a partir de segmentos nodais de paricá. Outra constatação na multiplicação foi que o número médio de brotos obtidos nos subcultivos, se apresentou semelhante ao do cultivo inicial, ou seja, 2,14 brotos por explante.

A transferência dos brotos para o meio MS, com a metade das concentrações de sais e na ausência de regulador de crescimento, induziu um maior crescimento dos mesmos, possibilitando a manutenção da cultura. Este processo demonstra que a presença de citocinina em subcultivos deve ser evitada, pois o regulador em excesso acaba por inibir o alongamento dos brotos.

Com quarenta e cinco dias de cultivo as brotações apresentavam-se bem formadas com tamanho vari-



Figura 4 - Desenvolvimento de brotação de paricá *in vitro* cultivada em ½ MS com 13,31 μmol de BAP

do (1990) é comum a formação de calos, na base dos explantes, quando são cultivados em altas doses de reguladores de crescimento, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Assim, a formação de calos no paricá deve-se, provavelmente, ao desbalanceamento nos níveis de fitohormônios contidos nos explantes.

O aparecimento das brotações ocorreu após seis dias do início do cultivo. Com vinte dias, 86% dos

ando de 2 a 3 cm de comprimento, entretanto com a presença de oxidação na base do explante. Com esta performance, as brotações foram transferidas para o meio de enraizamento (Figura 4).

Aos sessenta dias de cultivo, após a transferência das brotações para o meio de cultura suplementado com auxina, foi observado o surgimento de primórdios de raízes adventícias na parte basilar dos brotos, todavia 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 ou retardamento na indução de raízes. Segundo Normanly (1997) espécies lenhosas podem apresentar alta atividade de enzimas que inativam a auxina por degradação oxidativa ou por conjugação, afetando sobremaneira no processo de rizogênese.

CONCLUSÕES

- O regulador de crescimento BAP é mais eficiente na concentração 13,31 µmol proporcionando maior número de brotos *in vitro* de paricá;
- A Cinetina é menos eficiente na proliferação de brotações de paricá;
- O comprimento das brotações diminui com o aumento das concentrações de BAP e Cinetina e
- Houve redução substancial de oxidação e de calos na presença do meio MS ($\frac{1}{2}\text{NH}_4\text{NO}_3$)

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à empresa Tramontina Belém S.A. pelo apoio financeiro para execução deste trabalho e pela bolsa de mestrado concedida a Iraceuma M. C. Coimbra Cordeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. W. de., LUZ, J.M. Q., LACERDA, A. S., MELO, P. R. A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuwa* 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* L. 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.

GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. Somerset: Exetetics, 1993. Cap.2. p.37-66.

GOMES, A.L., **Propagação Clonal: Princípios e Particularidades**. Vila Real, Universidade de Trás-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: ABC-TP/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/CBAP, p. 183-260. 1998.

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.

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)

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.

PASQUAL, M. e BARROS, I de. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Struphnodendron 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.

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*.

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).

ZIMERMANN, R. H. Micropropagation of fruit plants. **Acta Horticulturae**. V. 120, p. 217-222, 1981.

