

# Anais



## VII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Anais da VII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**

*Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue  
Regina Caetano Quisen  
Ronaldo Ribeiro de Moraes  
Cheila de Lima Boijink  
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental  
Manaus, AM  
2010*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Ocidental**

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara  
Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus - AM  
Fone: (92) 3303-7800  
Fax: (92) 3303-7820  
www.cpa.embrapa.br

**Comitê Local de Publicações**

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*  
Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*  
Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza*  
*José Ricardo Pupo Gonçalves*  
*Lucinda Carneiro Garcia*  
*Luis Antonio Kioshi Inoue*  
*Maria Augusta Abtibol Brito*  
*Maria Perpétua Beleza Pereira*  
*Paulo César Teixeira*  
*Raimundo Nonato Vieira da Cunha*  
*Ricardo Lopes*  
*Ronaldo Ribeiro de Moraes*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

1ª gravação em CD-ROM (2010): 200

**Todos os direitos reservados.**

**A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Amazônia Ocidental.**

---

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (7. : 2010 :  
Manaus).  
Anais... / editores Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue, Regina Caetano Quisen,  
Ronaldo Ribeiro de Moraes e Cheila de Lima Boijink. – Manaus: Embrapa Amazônia  
Occidental, 2010.  
1 CD-ROM; 4<sup>ks</sup> pol.

ISBN 978-85-89111-11-9

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Inoue, Luis Antonio Kioshi Aoki. II. Quisen,  
Regina Caetano. III. Moraes, Ronaldo Ribeiro de. IV. Boijink, Cheila de Lima. V. Título.

CDD 501

# **Estabelecimento In Vitro e Calogênese de Espécies Perenes Tropicais de Interesse Econômico**

Marcelle Larissa Correa  
Regina Caetano Quisen

## **Introdução**

Os programas de melhoramento genético de espécies amazônicas de interesse econômico estão voltados para obtenção de clones que apresentem características desejáveis de produção e tolerância a doenças, por meio de cruzamentos controlados, e também para obter clones com porte reduzido; testar as diferentes condições ecológicas; avaliar e selecionar novos materiais; reunir, preservar e caracterizar o germoplasma disponível; e observar, adaptar e testar novas metodologias de estudo. Entretanto, a avaliação da variabilidade intraespecífica e seleção preliminar de genótipos superiores requerem a implantação de rede de experimentos de competição de clones em diferentes regiões de interesse.

Neste sentido é que a biotecnologia apresenta uma série de novos procedimentos desenvolvidos que podem ser implementados em programas de melhoramento genético, tais como a propagação in vitro, que poderá acelerar a produção de mudas em larga escala dos clones selecionados. Entretanto, a cultura de tecidos vegetais de algumas espécies é bastante difícil, devido ao caráter recalcitrante nessas condições, isto é, espécies consideradas de desenvolvimento e multiplicação mais complexo e lento. Nesse caso, o entendimento do processo morfogênico dessas espécies ainda é limitado, principalmente no que diz respeito à compreensão dos estímulos e condições necessárias para a indução e o controle desse processo.

O termo cultura de tecido vegetal refere-se à técnica de cultivo in vitro de todas as partes da planta (célula isolada, tecidos e órgãos) sob condições assépticas (PASQUAL, 1998) que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal in vitro (TORRES et al., 2000).

Os explantes, antes de serem inoculados em um meio de cultura, precisam ser desinfestados. Essa desinfestação é um processo de esterilização da superfície do explante visando eliminar os microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras.

Após assepsia, os explantes podem ser regenerados por organogênese ou embriogênese somática. Organogênese é uma via de desenvolvimento na qual órgãos vegetais (brotos, raízes) ou ambos são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células. A organogênese pode ser direta ou indireta. Na direta, também chamada de adventícia, o órgão vegetal é induzido e desenvolve-se diretamente de um explante. Na indireta, há uma fase inicial de proliferação e crescimento de calo seguido por indução de brotos ou raízes e desenvolvimento desses tecidos (MANTELL et al., 1994). Calo é um grupo ou massa de células com crescimento desordenado que pode apresentar certo grau de diferenciação.

A embriogênese somática é uma via de desenvolvimento na qual a formação de embriões é induzida de células somáticas. Como a organogênese, a embriogênese somática pode ocorrer diretamente de um explante sem o aparecimento de calos. Entretanto, a via embriogênica indireta, na qual embriões somáticos são induzidos e desenvolvidos de proliferações de calos, é a mais comum. Em todas as situações, certo período de tempo é necessário para desdiferenciar e obter competência para a via embriogênica, iniciada de uma cultura celular (MANTELL et al., 1994).

A aplicação dessas técnicas na propagação de espécies lenhosas indica a possibilidade de obtenção, em curto espaço de tempo, de grandes quanti-

dades de novas plantas a partir de um único explante em subcultivos periódicos. No entanto, apesar dos avanços verificados para muitas culturas, ainda é limitada a compreensão dos estímulos e condições necessárias para indução e controle desse processo para muitas espécies tropicais de interesse econômico (DAMIÃO FILHO, 1995).

Assim, visando colaborar com conhecimentos para a cultura de tecidos de espécies lenhosas, este trabalho teve como objetivo introduzir explantes in vitro e induzir a formação de calos embriogênicos em tecidos de espécies perenes tropicais.

## Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no Km 29 da Rodovia AM-010, Manaus, Amazonas. Foram utilizados tecidos (explantes) retirados de mudas estabelecidas em casa de vegetação das seguintes espécies: pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa*), cumaru (*Dipterix alata*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*).

A Tabela 1 descreve os detalhes de cada ensaio para introdução e calogênese.

Conforme especificado em cada ensaio, após assepsia, os explantes foram inoculados em meio de cultura com pH ajustado para 5,8 e mantidos por 20-30 dias em ambiente escuro com temperatura de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e avaliados quanto à oxidação e ocorrência de contaminação. No experimento de calogênese foi avaliada a ocorrência de calos formados por explante.

**Tabela 1.** Ensaio de desinfestação de explantes de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) e cumaru (*Amburana cearensis*). Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2010.

Nº	Espécie	Explante	Assepsia	Meio	Delimitamento
1	Pau-rosa	Segmento foliar	A1 – álcool 70% / 1 min + hipoclorito 50% / 15 min (assepsia padrão) A2 – PPM 5% / 3h + padrão	T1 – Explantes A1 em meio MS/2 + sacarose 3% + ágar 0,6% T2 – Explantes A1 em meio MS/2 + sacarose 3% + ágar 0,6% + PPM® 1% T3 – Explantes A2 em Meio MS/2 + sacarose 3% + ágar 0,6% + PPM® 1%	Inteiramente casualizado com 5 placas por tratamento (4 explantes/placa)
2	Pau-rosa (t1) Cumaru (t2) Preciosa (t3) Castanha (t4)	Segmento foliar	assepsia padrão	Meio MS/2 + PVP 0,2% + sacarose 3% + ágar 0,6% + PPM® 1%	Inteiramente casualizado com 10 placas por tratamento (6 explante/placa)
3	Castanha	Segmento foliar	A1 – HgCl2 0,5% / 1 min + lavagem + assepsia padrão A2 – fungicida Cercobin® / 20 min + assepsia padrão	Meio MS/2 + carvão 0,2% + sacarose 3% + ágar 0,6%	Inteiramente casualizado com 10 tubos por tratamento (1 explante/tubo)
4	Castanha	Segmento nodal	HgCl2 0,5% / 1min + lavagem + assepsia padrão	M1 - Meio MS/2 + carvão 0,2% + sacarose 3% + ágar 0,6% M2 - Meio MS/2 + carvão 0,2% + sacarose 3% + ágar 0,6% + PPM® 0,5%	Inteiramente casualizado com 10 tubos por tratamento (1 explante/tubo)
5	Castanha	Segmento foliar	HgCl2 0,5% / 1min + lavagem + assepsia padrão	Fase 1 - Meio MS/2 + carvão 0,2% + sacarose 3% + ágar 0,6% + PPM® 0,5% Fase 2 – Indução calogênese - Meio MS/2 + carvão 0,2% + sacarose 3% + ágar 0,7% + PPM® 0,2% com: T1 – 0,5 mg L-1 de 2,4-D + 2 mg L-1 de BAP T2 – 1,0 mg L-1 de 2,4-D + 2 mg L-1 de BAP T3 – 0,5 mg L-1 de ANA + 2 mg L-1 de BAP T4 – 1,0 mg L-1 de ANA + 2 mg L-1 de BAP	Inteiramente casualizado com 10 tubos por tratamento (1 explante/tubo)
6	Pau-rosa	Segmento foliar	A1 - pré-assepsia: Cercobin® 0,2% + Agrimicina® 0,4%/16 horas assepsia: padrão A2 – pré-assepsia: PPM® 3% assepsia: padrão	A1 - Meio MS/2 + carvão 0,2% + polimixina 25 mg L-1 + PPM® 1% + sacarose 3% + ágar 0,6% A2 - Meio MS/2 + carvão 0,2% + Agrimicina® 100 mg L-1 + Cercobin® 100 mg L-1 + sacarose 3% + ágar 0,6%	Inteiramente casualizado com 50 tubos por tratamento (1 explante/tubo)

No caso da indução à calogênese em tecido de cupuaçuzeiro, foram utilizados calos pré-existentes provenientes de tecido nucelar e botões florais de plantas selecionadas que foram subcultivadas para novos meios de cultura com diferentes reguladores de crescimento. A primeira subcultura foi realizada para meio DKW (DRIVER e KUNIYUKI, 1984) suplementado com 0,4% de glicose, 500 mg L<sup>-1</sup> de glutamina, 200 mg L<sup>-1</sup> de caseína e 0,6% ágar. Os tratamentos diferenciaram-se pela adição dos reguladores de crescimento AIA (1,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>), e AIA (1,0 mg L<sup>-1</sup>) + KIN (0,25 mg L<sup>-1</sup>). Os calos permaneceram em ambiente escuro em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2 °C e foram avaliados após 30 dias de cultivo e transferidos para os mesmos meios.

A terceira subcultura foi realizada para meio DKW suplementado 0,4% de glicose, 500 mg L<sup>-1</sup> de glutamina, 200 mg L<sup>-1</sup> de caseína, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA, 0,25 mg L<sup>-1</sup> de KIN e 0,6% ágar. Esses calos permaneceram em ambiente escuro em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2 °C e foram avaliados após 30 dias de cultivo.

## Resultados e Discussão

Os resultados apresentados no Ensaio 1 (Tabela 2) demonstraram a toxicidade dos biocidas nas concentrações utilizadas, tanto na assepsia como componente do meio de cultura, que resultaram na perda por oxidação e necrose de 100% dos explantes de pau-rosa nos tratamentos 2 e 3. No tratamento 1, essa perda foi de 40%, enquanto que a contaminação por microrganismos foi de 60%. Essa reação oxidativa ocorreu em toda a extensão do tecido nos tratamentos 2 e 3, enquanto que, no tratamento 1, a reação foi observada nas bordas dos explantes, mantendo a coloração esverdeada no centro dos segmentos foliares. No tratamento 3, a oxidação foi mais intensa, com exudação de compostos fenólicos para o meio de cultura, em 80% dos explantes, inviabilizando a utilização desses tecidos. Dessa maneira, pode-se concluir que a associação do biocida na assepsia e no meio de cultura possa ter sido tóxico ao tecido vegetal. Nesse caso, recomendam-se novos testes com concentrações menores dos biocidas, associados ou não, para a desinfestação de explantes dessa espécie.

**Tabela 2.** Eficiência da assepsia na desinfestação de explantes foliares de pau-rosa. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2010.

Tratamento	% de contaminação	% de oxidação
1	60	40
2	0	100
3	0	100

No ensaio 2 (Tabela 3), a perda de explantes por oxidação variou entre as espécies avaliadas, o que foi observado desde a oxidação nas bordas dos segmentos foliares até a perda do explante pela oxidação completa da área

dos segmentos. A toxicidade foi maior para a castanha-do-brasil, que teve 90% dos explantes completamente oxidados. Para preciosa e cumaru, oxidação foi menor, afetando mais as bordas dos explantes. Quanto à contaminação, observou-se que

os tratamentos apresentaram baixa eficiência para o pau-rosa, cumaru e preciosa. Para a castanha-do-brasil, a perda foi de 10% somente. A diferença observada nesse caso pode estar associada à contaminação endógena dos tecidos, assim como à facilidade de limpeza da superfície do explante, que pode, pela presença de cerosidades ou pelos, influenciar a eficiência da desinfestação. Neste sentido, para

ambos os ensaios, verificou-se a sensibilidade desses tecidos ao produto PPM<sup>®</sup>. Compton e Koch (2001) corroboram com esses resultados ao afirmarem que as cotilédones de petúnia são mais sensíveis do que as de melão, em uma mesma concentração do biocida PPM<sup>®</sup>, e que, dessa maneira, é necessário analisar uma série de concentrações quando usá-lo pela primeira vez em uma planta.

**Tabela 3.** Eficiência da assepsia na desinfestação de explantes de espécies florestais tropicais. Embrapa Amazônia Ocidental, 2010. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2010.

Espécie	% de contaminação	% de oxidação
Pau-rosa	70,0	30,0
Cumaru	90,0	10,0
Preciosa	60,0	40,0
Castanha-do-brasil	10,0	90,0

No Ensaio 3, os tratamentos apresentaram resultados bem distintos, conforme apresentados na Tabela 4. O tratamento de imersão em solução com cloreto de mercúrio a 0,5%, durante 1 minuto, seguido de assepsia padrão, foi satisfatório para a desinfestação de segmentos foliares de castanha-do-brasil, tendo em vista que esse tratamento proporcionou 10% de sobrevivência, superior ao tratamento com fungicida. Apesar de a perda de explantes no tratamento 1 ter sido bastante elevada (40%), o ajuste desse meio de cultura visando ao controle do processo oxidativo deve ser priorizado

nos próximos ensaios, com ajustes de tempo de exposição e concentrações ou adição de outros agentes antioxidantes. O cloreto de mercúrio, apesar de mais eficiente que o fungicida, é um produto tóxico e deve ser utilizado com muita cautela (GEORGE, 1993). Esse produto vem sendo utilizado, com sucesso, para muitas espécies lenhosas que apresentaram sérios problemas de contaminação por microrganismos, como já relatado por Chalupa (1990), Purohit et al. (1994) e Patnaik e Debata (1996). Neste sentido, vale ressaltar que o controle de descarte de resíduos e rejeitos deve ser cuidadoso, seguindo as normas de boas práticas laboratoriais.

**Tabela 4.** Eficiência da assepsia na desinfestação de segmentos foliares de castanha-do-brasil. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2010.

Tratamento	% de contaminação	% de oxidação
1	10	40
2	60	60



A adição de PPM® a 0,5% no meio de cultura no Ensaio 4 foi eficiente na limpeza de explantes foliares de castanha-do-brasil, com 90% de explantes limpos, não possibilitando maior contaminação durante os dias de cultivo. Ao contrário, o tratamento controle (sem PPM®) favoreceu a contaminação de 60% dos segmentos inoculados. A oxidação dos explantes foi parcial, não afetando a região da gema na axila do segmento. Apesar de serem explantes diferentes, considerando que 90% dos segmentos foliares de castanha-do-brasil oxidaram em meio de cultura contendo 1% de PPM® (Ensaio 2), a redução dessa concentração para 0,5% não acarretou perdas e foi eficiente no controle de microrganismos.

Os resultados do Ensaio 5 (Tabela 5) para limpeza e indução de calogênese em segmentos foliares de castanha-do-brasil foram observados ao final de 50 dias de cultura. A melhoria do processo

de limpeza dos segmentos, apesar de resultar em média 22,5% de contaminação, foi considerável no controle de oxidação, que ficou restrita às bordas dos tecidos. Quanto a indução à calogênese, observou-se baixa sensibilidade do tecido foliar aos tratamentos aplicados, sendo observada a formação de calo somente no meio de cultura suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Serra et al. (2000), por sua vez, obtiveram calos induzidos com base em explantes foliares de castanha-do-brasil inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, com padrão de crescimento sigmoidal, com tendência de ganho de matéria fresca em função do aumento do tempo de cultivo. De forma distinta, no presente ensaio, o 2,4-D não favoreceu a calogênese, da mesma forma que o tratamento com maior concentração do ANA. Neste caso, recomenda-se nova experimentação, considerando diferentes combinações/concentrações entre auxinas e citocininas.

**Tabela 5.** Desinfestação e calogênese de segmentos foliares de castanha-do-brasil. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2010.

Tratamento	% de contaminação	% de oxidação
1 - 0,5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2 mg L <sup>-1</sup> de BAP	20	0
2 - 1,0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2 mg L <sup>-1</sup> de BAP	30	0
3 - 0,5 mg L <sup>-1</sup> de ANA + 2 mg L <sup>-1</sup> de BAP	10	10
4 - 1,0 mg L <sup>-1</sup> de ANA + 2 mg L <sup>-1</sup> de BAP	50	0

No Ensaio 6, avaliou-se a influência do uso de antibióticos, fungicidas e biocidas na desinfestação de explantes foliares de pau-rosa. A perda por contaminação de explantes por microrganismos foi de 80% e 30% nos tratamentos 1 e 2, respectivamente. Esses resultados indicam, portanto, a redução acentuada da contaminação in

vitro com a associação de fungicidas, antibióticos e do biocida PPM® na assepsia e no meio de cultura. A utilização do cloreto de mercúrio e do PPM® (tratamento 2) foi pouco eficiente na limpeza de explantes de pau-rosa. Assim, o tratamento 1 pode ser considerado como boa opção na fase de introdução de explantes dessa cultura in vitro.

O processo de calogênese do cupuaçu não foi melhorado com os meios utilizados, sem a formação de estruturas embriogênicas.

## Agradecimentos

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa.

À Embrapa Amazônia Ocidental, pelo apoio financeiro, infraestrutura e oportunidade desta aprendizagem.

## Referências

- CHALUPA, V. European hardwoods. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 224-246.
- COMPTON, M.E., Koch, J.M. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.** v.37, p:259-261, 2001.
- DAMIÃO-FILHO, C. F. Cultura de tecidos de plantas: micropropagação. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 25 p.
- DRIVER, J.A., KUNIYUKI, A.H. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. **HortScience**, v.19, p. 507-509, 1984.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Inglaterra: Exegetics Limited, 1993. v. 1 574 p.
- MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios e biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 344.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PASCAL, M. Meios de cultura. Lavras, UFLA/FAEPE, 1998. 127 p.
- PATNAIK, J., DEBATA, B. K. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. through axillary bud culture. **Plant Cell Report**, v. 15, p.427-430, 1996.
- PUROHIT, S. D., DAVE, A. Micropropagation of *Sterculia urens* Roxb.- an endangered tree species. **Plant Cell Report**, v. 15, p. 704-706, 1996.
- SERRA, A.G.P., PAIVA, R., PAIVA, P.D. de O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciênc. Agrotec.**, v.24, n.4, p.833-840, 2000.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. 509 p.