



UFAM

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC

Doutorado em Biotecnologia

**Propagação *in vitro* de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), breu branco (*Protium spruceanum* Benth.), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).**

**Hélio Leonardo Moura Brandão**

**Manaus – AM**

**Abril/2011**



UFAM

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC

Doutorado em Biotecnologia

**Propagação *in vitro* de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), breu branco (*Protium spruceanum* Benth.), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).**

**Hélio Leonardo Moura Brandão**

**Orientador: Paulo de Tarso Barbosa Sampaio**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte das atividades obrigatórias à obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

Manaus – AM

Abril/2011

A defesa ocorreu no dia 2º de abril de 2011 e o trabalho foi aprovado. A banca foi composta pelos seguintes membros:

**BANCA**

---

Paulo de Tarso Barbosa Sampaio – INPA

---

Danilo Fernandes da Silva Pinto – INPA

---

Luiz Augusto Gomes de Souza – INPA

---

Eva Maria Alves Cavalcanti Atroch

---

Kaoru Yuyama – INPA

Brandão, Hélio Leonardo Moura; Sampaio, Paulo de Tarso Barbosa, Jardim, Lyana Silva.

Propagação *in vitro* de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), breu branco (*Protium spruceanum* Benth.), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).

Manaus: UFAM, 2011.

59p.

Tese de Doutorado

**Sinopse:**

Este trabalho aborda a propagação assexuada de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), breu branco (*Protium spruceanum* Benth.), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) por meio da Cultura de Tecidos Vegetais.

Palavras-chave: biotecnologia, cultura de tecidos, reguladores de crescimento.

A todos que me  
apoiaram e torceram por  
minhas conquistas.  
**DEDICO.**

**"Uma mente que se abre a uma nova idéia jamais retorna ao seu tamanho original."**

Albert Einstein

## Agradecimentos

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de realizar o doutorado;

Ao programa de pós-graduação PPGBIOTEC e todos os profissionais engajados na sua existência;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico – CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio pela orientação, paciência, confiança, inspiração e amizade;

Aos todos meus professores pela inspiração, dedicação, amizade e paciência;

À Prof. Dra. Marlene Freitas da Silva pelo apoio e amizade (*in memoriam*);

À MSc. Lyana Silva Jardim pela colaboração, ensinamentos, paciência e amizade.

À Engenheira Florestal Lucyanna Moura Coelho pela colaboração;

À minha família em especial a minha mãe e minha avó materna;

Aos meus amigos e meu amor, por me propiciarem momentos felizes.

**Propagação *in vitro* de andiroba (*Carapa guianensis* Aublet), breu branco (*Protium spruceanum* Benth.), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) e pau rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).**

Brandão, H.L.M.<sup>1</sup>; Sampaio, P.T.B.<sup>2</sup>.

1 Doutorando Universidade Federal do Amazonas - UFAM; 2 Pesquisador/Dr. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi elaborar protocolos de propagação *in vitro* para pau rosa, andiroba, copaíba e breu branco por meio de ápices caulinares, folhas e pecíolos obtidos de mudas. As sementes foram tratadas por imersão por 24h em derosal (5ml.L<sup>-1</sup>), e imersas por 30 min em hipoclorito de sódio (0,85%), depois germinaram em bandejas contendo areia lavada coberta por vermiculita. No estabelecimento *in vitro* dos explantes foram testados 4 protocolos de assepsia compostos por derosal (5ml.L<sup>-1</sup>), NaOCl (0,85%), ampicilina (500mg.L<sup>-1</sup>), clorafenicol (500mg.L<sup>-1</sup>) e tween 20 (1ml.L<sup>-1</sup>), com 50 repetições por tratamento. Na indução da organogênese *in vitro* foi utilizado meio MS suplementado com ANA, AIA, BAP e TDZ, totalizando 24 tratamentos mais o testemunha com 10 repetições por tratamento. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, os explantes foram mantidos no escuro em B.O.D. com temperatura de 30°C por três dias, e então levados para sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo e radiação de 25μ moles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, com temperatura de 30°C. Nos testes de climatização foram testados seis substratos compostos por combinações de areia argila e matéria orgânica, com 10 repetições. Todos os explantes foram estabelecidos em taxas superiores a 81% com a aplicação de um protocolo composto por ampicilina (500mg.L<sup>-1</sup>) e derosal (5ml.L<sup>-1</sup>), mais NaOCl (0,85%) e tween 20 (1ml.L<sup>-1</sup>). Houve regeneração de ápices de andiroba, breu branco e pau rosa com aplicação de ANA e BAP. Folhas e pecíolos de andiroba, breu branco e pau rosa enraizaram com a suplementação com ANA, mas não houve formação de brotos. Não foi possível estabelecer *in vitro* explantes de copaíba.

**Palavras-chave:** biotecnologia, cultura de tecidos, reguladores de crescimento.

***In vitro propagation of andiroba (Carapa guianensis Aublet), breu branco (Protium spruceanum Benth.), copaiba (Copaifera multijuga Hayne) and rosewood (Aniba rosaeodora Ducke).***

Brandão, H.L.M<sup>1</sup>.; Sampaio, P.T.B<sup>2</sup>.

1 Doutorando Universidade Federal do Amazonas - UFAM; 2 Dr. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

**Abstract**

*The goal of this study was develop a protocol of in vitro propagation of andiroba, copaiba, breu branco and rosewood, trough apical, leaves and petiole obtained from seedling. The seeds were treated by immersion for 24 hours in derosal (5ml.L<sup>-1</sup>), 30 minutes in sodium hypochlorite (0.85%), and then germinated in trays filled with washed sand and vermiculite. To explants in vitro establishment were tested 4 asepsis protocols composed of derosal (5ml.L<sup>-1</sup>), NaOCl (0.85%), ampicilin (500mg.L<sup>-1</sup>), cloraphenicol (500mg.L<sup>-1</sup>) and tween 20 (1ml.L<sup>-1</sup>), with 50 repetitions per treatment. To induce in vitro organogenesis was used MS medium supplemented with NAA, IAA, BAP and TDZ totalizing 24 treatments and 1 witness, with 10 repetitions each, the Tukey test was applied in 5% of significance. After the inoculation in flood hood chamber the explants were kept in B.O.D. with temperature of 30°C for three days, then taken to growth room with 16 hours of photoperiod, 25µ moles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> radiation and 30°C temperature. To acclimatizing were tested 6 substrates (treatments) composed of combinations of washed sand, organic compound and clay with 10 repetitions. All the explants of andiroba, breu branco and rosewood were established in rates bigger than 81% with application of a protocol composed of ampicilin (500mg.L<sup>-1</sup>) and derosal (5ml.L<sup>-1</sup>), plus NaOCl (0,85%) and tween 20 (1ml.L<sup>-1</sup>). There was regeneration of apical source of andiroba, breu branco and rosewood trough application of NAA and BAP. Leaves and petiole of andiroba, breu branco and rosewood rooted with NAA supplementation, but there weren't shooting formation. Wasn't possible establish explants of copaiba.*

**Key-words:** *biotechnology, tissue culture, growth regulators.*

## ÍNDICE

<b>1. Introdução/Justificativa</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	4
2.1 Geral:.....	4
2.2 Específicos: .....	4
<b>3. Revisão bibliográfica</b> .....	5
3.1 Propagação vegetativa.....	5
3.2 Cultura de Tecidos Vegetais.....	6
3.3 Reguladores de crescimento.....	7
3.4 Organogênese <i>in vitro</i> .....	10
3.5 Fatores que afetam a cultura de tecidos vegetais.....	11
3.6 Fases da cultura de tecidos vegetais.....	16
3.7 Espécies estudadas.....	18
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	24
4.1 Tratamento das sementes e plântulas.....	24
4.2 Explantes.....	25
4.3 Meio de cultura e reguladores de crescimento.....	26
4.4 Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	27
4.5 Regeneração <i>in vitro</i> .....	28
4.6 Aclimatização.....	29
4.7 Análise estatística dos dados.....	30
<b>5. Resultados</b> .....	31
5.1 Andiroba.....	31
5.2 Breu branco.....	37
5.3 Pau rosa.....	42
5.4 Copaíba.....	47
<b>6. Discussão</b> .....	49
6.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	49
6.2 Regeneração <i>in vitro</i> .....	52
<b>7. Recomendações</b> .....	57

<b>8. Conclusões</b> .....	58
<b>5. Agradecimentos</b> .....	59
<b>10. Referências bibliográficas</b> .....	60
<b>Capítulo 1. Germinação <i>in vitro</i> de sementes e embriões de Copaíba (<i>Copaifera multijuga</i>)</b> .....	70
<b>1. Introdução/Justificativa</b> .....	71
<b>2. Objetivos</b> .....	73
<b>2.1 Geral</b> .....	73
<b>2.2 Específicos</b> .....	73
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	74
<b>3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes</b> .....	74
<b>3.2 Germinação <i>in vitro</i> de embriões</b> .....	75
<b>4. Resultados e discussão</b> .....	77
<b>4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i></b> .....	77
<b>4.1 Germinação <i>in vitro</i></b> .....	80
<b>5. Conclusões</b> .....	82
<b>6. Agradecimentos</b> .....	83
<b>7. Referências bibliográficas</b> .....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Ilustração dos frutos e sementes de: a – pau rosa (*Aniba rosaeodora*); b - andiroba (*Carapa guianensis*); c – copaíba (*Copaifera multijuga*); d – breu branco (*Protium spruceanum*).....25
- Figura 2:** representação do modelo de corte realizado para a confecção de explantes no estabelecimento *in vitro* de andiroba (*Carapa guianensis*) breu branco (*Protium spruceanum*) copaíba (*Copaifera multijuga*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) sendo: a - ápice caulinar; b - folíolo seccionado transversalmente; c – raque com 1cm da base de dois folíolulos.....26
- Figura 3:** folhas de andiroba (*Carapa guianensis*) representando os diferentes graus de maturidade sendo 1: folha madura, 2: folha jovem; 3: folha nova.....26
- Figura 4:** Índices percentuais de contaminação por fungos, bactérias, descontaminação e sobrevivência de ápices, folhas e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*) tratadas com 4 diferentes protocolos de assepsia, avaliadas aos 15 dias.....32
- Figura 5:** Explantes de andiroba (*Carapa guianensis*) estabelecidos *in vitro* em meio MS e tratados com ANA e BAP sendo: a – segmentos de folha enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ); b - pecíolos de andiroba enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ); c - épices caulinares de mudas regenerados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ) e BAP ( $10\text{mg.L}^{-1}$ ).....34
- Figura 6:** Índices percentuais de contaminação por fungos, bactérias, descontaminação e sobrevivência de ápices, folhas e pecíolos de breu branco (*Protium spruceanum*) tratadas com 4 diferentes protocolos de assepsia, avaliadas aos 15 dias.....38
- Figura 7:** Explantes de breu branco (*Protium spruceanum*) estabelecidos *in vitro* em meio MS e tratados com auxinas e citocininas sendo: a – segmentos de folha enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ); b - ápices regenerados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ) e BAP ( $10\text{mg.L}^{-1}$ ); c - pecíolos enraizados *in vitro* com ANA ( $6,0\text{mg.L}^{-1}$ ).....40
- Figura 8:** Índices percentuais de contaminação por fungos, bactérias, descontaminação e sobrevivência de ápices, folhas e pecíolos de pau rosa (*Aniba rosaeodora*) tratadas com 4

diferentes protocolos de assepsia, avaliadas aos 15 dias.....43

**Figura 9:** Explantes de pau rosa (*Aniba rosaeodora*) estabelecidos *in vitro* em meio MS e tratados com auxinas e citocininas sendo: a – ápices regenerados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ) e BAP ( $10\text{mg.L}^{-1}$ ); b - segmentos de folha enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ); c - pecíolos enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ).....45

**Capítulo 1.** Germinação *in vitro* de sementes e embriões de copaíba (*Copaifera multijuga*).....70

**Figura 1.** Sementes, frutos e plântulas de copaíba (*Copaifera multijuga*) sendo: a – frutos e sementes; b -sementes em processo de assepsia.....74

**Figura 2.** Sementes de copaíba (*Copaifera multijuga*) estabelecidas *in vitro* por meio da utilização de ampicilina ( $500\text{mg.l}^{-1}$ ), clorafenicol ( $500\text{mg.l}^{-1}$ ) e derosal ( $5\text{ml.l}^{-1}$ ) em solução aquosa após 24h (a) e 7 dias (b e c).....79

**Figura 3.** Evolução da germinação *in vitro* de um embrião de copaíba (*Copaifera multijuga*) tratado com  $10\text{mg.L}^{-1}$  de ANA após 42 dias.....81

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> composição dos protocolos de assepsia testados no estabelecimento <i>in vitro</i> de ápices, folhas e pecíolos de andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> ) breu branco ( <i>Protium spruceanum</i> ) copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ) e pau-rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> ).....	27
<b>Quadro 2:</b> Tratamentos compostos de doses de auxinas e citocininas testadas na regeneração <i>in vitro</i> de ápices caulinares, folhas e pecíolos de andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> ) breu branco ( <i>Protium spruceanum</i> ) copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ) e pau rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> ).....	29
<b>Quadro 3:</b> substratos testados na climatização de plântulas de andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> ) breu branco ( <i>Protium spruceanum</i> ) copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ) e pau rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> ) produzidas via cultivo <i>in vitro</i> .....	30
<b>Quadro 4:</b> Tratamentos testados no estabelecimento <i>in vitro</i> de ápices, folhas, pecíolos, embriões e sementes de copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ).....	47
<b>Capítulo 1.</b> Germinação <i>in vitro</i> de sementes e embriões de copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ).....	70
<b>Quadro 1.</b> Tratamentos de assepsia aplicados em sementes de copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ).....	75
<b>Quadro 2.</b> Tratamentos testados na germinação <i>in vitro</i> de embriões de copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ).....	76

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Resumo da análise de variância para as médias do número de raízes e brotos em ápices caulinares, folhas e pecíolos de andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> ) cultivados <i>in vitro</i> , em função do efeito diferentes concentrações de ANA, AIA, BAP e TDZ após 30 dias.....	33
<b>Tabela 2:</b> Porcentagem de regeneração <i>in vitro</i> de ápices caulinares e número de raízes por explante em folhas e pecíolos de Andiroba ( <i>Carapa guianensis</i> ) cultivados <i>in vitro</i> , tratados com AIA, ANA, BAP e TDZ, após 30 dias.....	36
<b>Tabela 3:</b> Resumo da análise de variância para as médias do número de raízes e brotos em ápices caulinares, folhas e pecíolos de breu branco ( <i>Protium spruceanum</i> ) cultivados <i>in vitro</i> , em função do efeito diferentes concentrações de ANA, AIA, BAP e TDZ após 30 dias.....	39
<b>Tabela 4:</b> Porcentagem de regeneração <i>in vitro</i> de ápices caulinares e número de raízes por explante em ápices folhas e pecíolos de breu branco ( <i>Protium spruceanum</i> ) cultivados <i>in vitro</i> , tratados AIA, ANA, BAP e TDZ, após 30 dias.....	41
<b>Tabela 5:</b> Resumo da análise de variância para as médias do número de raízes e brotos em ápices caulinares, folhas e pecíolos de pau rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> ) cultivados <i>in vitro</i> , em função do efeito diferentes concentrações de ANA, AIA, BAP e TDZ após 30 dias.....	44
<b>Tabela 6:</b> Porcentagem de regeneração <i>in vitro</i> de ápices caulinares e número de raízes por explante em folhas e pecíolos de pau rosa ( <i>Aniba rosaeodora</i> ) cultivados <i>in vitro</i> , tratados com doses simples e combinadas dos reguladores de crescimento: AIA, ANA, BAP e TDZ após 30 dias.....	46
<b>Capítulo 1.</b> Germinação <i>in vitro</i> de sementes e embriões de copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ).....	70
<b>Tabela 1.</b> Porcentagens de: contaminação por fungos e bactérias, sementes sadias (aos 15 dias) e germinação de sementes de copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ) tratadas com antibióticos e fungicidas após 30 dias.....	77
<b>Tabela 2.</b> Percentagem de enraizamento e brotação de embriões de copaíba ( <i>Copaifera multijuga</i> ), tratadas com AIA, ANA e AIB após 42 dias.....	80

## 1. Introdução/Justificativa

A propagação de espécies vegetais amazônicas ainda é realizada de forma rústica sem qualquer sistematização. Mesmo com a crescente procura e valorização de matérias primas da região para as indústrias de medicamentos, cosméticos e madeira, sua obtenção ainda ocorre de forma predatória, causando grande prejuízo ao patrimônio genético por meio da intensa exploração das espécies mais valorizadas economicamente. Um exemplo claro é a exploração de óleo de pau rosa que colocou esta espécie na lista de espécies de planta ameaçadas de extinção (Clay *et al.*, 2000; Clement e Higuchi, 2006).

Neste cenário o estabelecimento de um protocolo de propagação *in vitro* pode ser uma alternativa viável para a obtenção em larga escala de mudas das espécies florestais de grande porte que possuem maior valor econômico. Assim viabilizando seu cultivo para diversas finalidades, possibilitando o estabelecimento de plantios que forneçam matérias primas como madeira, óleos e resinas sem exercer pressão sobre as populações nativas, que são a mais importante fonte de material genético (Clement, 1999; Paiva e Gomes, 1993). Contudo são escassos os estudos que visam propagar espécies da região Amazônica.

A propagação *in vitro* de espécies lenhosas de grande porte é mais complexa, devido a fatores como: crescimento lento, maior incidência de agentes contaminantes, difícil obtenção de material propagativo, isolamento geográfico, instabilidade genética nas condições *in vitro* e outros (Assis e Teixeira, 1998; Guerra e Pompelli, 1999). Estes fatores colocaram as espécies florestais no final da lista de espécies mais estudadas na cultura de tecidos, atrás das plantas ornamentais, medicinais e frutíferas.

No cultivo *in vitro* qualquer parte da planta pode ser utilizada como propágulo. (Hartman *et al.*, 1990). Explantes oriundos de regiões meristemáticas são as fontes mais promissoras porque apresentam alta taxa de crescimento, e diferenciação dos tecidos indefinida, o que facilita sua resposta morfogenética (Hartman *et al.*, 1990). Outras partes da planta podem ser utilizadas para se iniciar um processo de propagação *in vitro* como: segmentos de folha, segmentos nodais, pecíolos, anteras, ovários e até mesmo ápices radiculares. No entanto, a presença de agentes

contaminantes varia de tecido para tecido quando se utiliza como fonte de material mudas produzidas em casa de vegetação (Santos, 2003; Caldas *et al.*, 1998).

O processo de propagação *in vitro* se inicia desde a coleta, armazenamento, e assepsia das sementes. Estes são fatores limitantes para a obtenção de material viável para o início do cultivo *in vitro*. A retirada do mesocarpo deve ser executada o mais rápido possível, pois é potencial fonte de contaminação. O condicionamento das sementes em recipientes arejados é importante, pois o abafamento contribui para criar condições favoráveis ao crescimento de microorganismos. A rápida aplicação de tratamentos de desinfestação superficial das sementes aumenta bastante a chance de se obter explantes livres de contaminação (George, 1996).

A propagação de plantas *in vitro* é complexa devido ao grande número de fatores que influenciam simultaneamente esta técnica (Kerbaui, 1997; Assis e Teixeira, 1998; Tapransert e Reed, 1998; Torres e Caldas, 1999). Efeitos como a oxidação e contaminação devem ser cuidadosamente observados ao se definir as técnicas de estabelecimento *in vitro*, pois são considerados os mais problemáticos nos protocolos de propagação (George, 1996). Deve se atentar também que fatores ambientais como temperatura e umidade (Hartmann *et al.*, 1990). A aplicação exógena de reguladores de crescimento é um fator de importância, pois se atribui a estas moléculas as respostas morfogênicas obtidas *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1998; Barrueto, 2001; Echeverrigaray, 2001).

Para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas se torne viável comercialmente é necessário reduzir os custos de produção. Os altos custos se devem à perdas causadas pela contaminação na fase de estabelecimento *in vitro*, por desordens fisiológicas e morfológicas que ocorrem nas plantas em função da utilização de reguladores de crescimento e outras substâncias, às baixas percentagens de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização, a contratação de mão-de-obra especializada, e, sobretudo, no elevado custo de funcionamento e manutenção dos equipamentos dos laboratórios (Pierik, 1990).

Neste contexto, o presente estudo objetivou desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* para ápices caulinares, folhas e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*), breu branco (*Protium spruceanum*), copaíba (*Copaifera multijuga*) e pau-

rosa (*Aniba rosaeodora*), obtidos de mudas, por meio da aplicação exógena de reguladores de crescimento.

## 2. Objetivos

### 2.1 Geral:

Elaborar um protocolo de propagação *in vitro* para ápices caulinares, segmentos de folha e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*), breu branco (*Protium spruceanum*), copaíba (*Copaífera multijuga*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*).

### 2.2 Específicos:

Elaborar um protocolo de desinfestação superficial que possibilite o estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares, segmentos de folha e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*), breu branco (*Protium spruceanum*), copaíba (*Copaífera multijuga*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*).

Desenvolver um protocolo para a regeneração *in vitro* de ápices, segmentos de folha e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*), breu branco (*Protium spruceanum*), copaíba (*Copaífera multijuga*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) por meio da aplicação de reguladores de crescimento.

Determinar um protocolo que viabilize a aclimatização para plântulas de andiroba (*Carapa guianensis*), breu branco (*Protium spruceanum*), copaíba (*Copaífera multijuga*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) obtidas via cultivo *in vitro*.

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1 Propagação Vegetativa

A propagação vegetativa constitui uma importante ferramenta na propagação de plantas lenhosas (Assis & Teixeira, 1998). Quando se compara a propagação vegetativa assexuada com o método sexuado é possível observar uma série de vantagens, que vão desde a prospecção de espécies melhoradas geneticamente ao aumento na produção de metabólitos secundários de alto valor comercial (Clay *et al.*, 2000).

Na propagação assexuada todo o componente genético é obtido, o que resulta em maiores ganhos dentro de uma mesma geração. Mas na reprodução sexuada, em virtude de segregação gênica, somente o componente genético aditivo referente à característica superior do genótipo selecionado é obtido (Kerbaudy, 1997; Assis e Teixeira, 1998; Torres *et al.*, 1999).

Verifica-se, também, na propagação sexuada de espécies alógamas, que a segregação e a recombinação gênica resultam em um alto grau de variabilidade, o que é desfavorável quando se tenta homogeneizar a produção em plantios comerciais. Já a reprodução assexuada favorece a uniformidade do desenvolvimento, do crescimento e conseqüentemente da produção (Hartman & Kester, 1983; Assis e Teixeira, 1998). Mas o estreitamento da variabilidade genética para esta técnica também aumenta a susceptibilidade ao ataque de doenças.

Dentre os métodos de propagação assexuada, os mais utilizados são a estaquia, a enxertia e a cultura de tecidos. Sendo a cultura de tecidos o método mais eficiente na clonagem em larga escala de plantas com genótipo superior, para a formação de pomares clonais e produção comercial de mudas, devido à total sanidade obtida, e ao crescimento mais rápido das plântas (Hartman & Kester, 1983; Kerbaudy, 1997; Assis e Teixeira, 1998).

### 3.2 Cultura de Tecidos Vegetais

A propagação vegetativa por vias alternativas sempre foi utilizada pelo homem no cultivo de espécies de interesse. No entanto, são escassas as pesquisas que visam desenvolver protocolos de propagação alternativa para espécies importantes da região Amazônica, mesmo com todas as dificuldades enfrentadas pela propagação por sementes como: difícil e onerosa obtenção, intensa predação, difícil armazenamento e perda da viabilidade (Ammirato, 1990).

A cultura de tecidos vegetais é bastante utilizada para a propagação de espécies ornamentais, medicinais e frutíferas. E apresenta bons resultados com protocolos de propagação já estabelecidos para muitas dessas espécies. A adaptação dessas tecnologias para outras espécies representa um grande campo de pesquisa na propagação vegetativa *in vitro* de espécies Amazônicas (Barrueto, 2001).

Sabe-se que espécies de grande porte são bem menos propagadas por vias alternativas. Isto se deve a uma série de dificuldades que são enfrentadas na propagação como: altas taxas de contaminação, lento crescimento, difícil obtenção de material propagativo, baixos investimento em pesquisas e desconhecimento de sua auto ecologia. Isso, aliado à intensa busca de matérias primas de origem amazônica, como: óleos, resinas e madeira, que podem levar ao esgotamento de recursos de grande importância econômica e ecológica (Clay *et al.*, 2000; Clement e Higuchi, 2006).

A cultura de tecidos vegetais é uma importante técnica de propagação assexuada que é utilizada largamente na multiplicação de várias espécies. Mas ainda é pouco utilizada na propagação de espécies florestais da região Amazônica, mesmo com a imensa biodiversidade na região. Pouco investimento é aplicado na multiplicação de espécies florestais, apesar de algumas espécies bastante pesquisadas como o Pau-rosa, já estarem em risco de extinção sem um protocolo de propagação alternativo em execução (Assis e Teixeira, 1998; Clay *et al.*, 2000).

É importante que as tecnologias de propagação vegetativa sejam testadas em espécies Amazônicas. Mas existem limitações e fatores problemáticos como o isolamento geográfico da região, estes fatores limitam as pesquisas, e deixam sem perspectiva de solução o problema do desaparecimento de populações nativas das

espécies mais exploradas como a copaíba e o pau rosa, que apresentam grande dificuldade de obtenção de sementes e possuem crescimento lento (George, 1996).

O desenvolvimento de um protocolo de propagação *in vitro* para as espécies mais exploradas pode amenizar a pressão que estas vêm sofrendo, e possibilitar o estabelecimento de plantios para fins econômicos e ecológicos. E dessa forma disponibilizar importantes matérias-primas como madeira e óleos essenciais, e também fornecer mudas para a reposição das populações naturais perdidas das espécies em risco de extinção.

### 3.3 Reguladores de Crescimento

Já é bastante difundida a importância dos reguladores de crescimento no processo de multiplicação *in vitro*, e sua importância em todas as fases de crescimento e desenvolvimento das plantas (Hartman e Kester, 1983; Benjamins e Scheres, 2008; Sakakibara, 2006). Auxinas e citocininas são as classes mais estudadas, pois atuam em diversos processos como dominância apical e atraso na senescência (Benjamins e Scheres, 2008; Sakakibara, 2006). Os protocolos de propagação *in vitro* existentes utilizam, por meio da aplicação exógena, auxinas e citocininas como agentes responsáveis pelas respostas positivas obtidas nos ensaios de organogênese induzidas *in vitro* (Torres *et al.*, 1999).

Hormônios vegetais são substâncias orgânicas que desempenham uma importante função na regulação do crescimento. Alguns hormônios são produzidos em um tecido e transportados para outro, onde eles produzem respostas fisiológicas específicas, outros atuam dentro do mesmo tecido onde são produzidos (Pasqual 1985). Os primeiros sítios propostos como locais de biossíntese dessas substâncias foram as folhas jovens, sementes, gemas e tecidos meristemáticos (Raghavan e Torrey, 1976).

A palavra hormônio tem origem no termo grego *horman* que significa "excitar" (Hartman e Kester, 1983). Entretanto, as pesquisas científicas demonstraram que alguns hormônios podem ter influência inibitória do crescimento vegetal, tanto induzido pela presença de microorganismos, quanto pela própria planta para regular seu

crescimento. Assim, antes de pensar nos hormônios como estimuladores, é mais correto atribuir a eles a função de reguladores químicos (Pasqual *et al.*, 1997). Seu transporte pode ocorrer por difusão, pelo xilema, ou ainda de célula a célula (Barrueto *et al.*, 2000; Firn, 1986).

O ácido 3-indol-acético, é a única auxina de ocorrência natural conhecida, e é sintetizado primariamente a partir do triptofano (Benjamins e Scheres, 2008). O AIA é transportado de célula a célula e o seu fluxo é unidirecional (polar). Seus efeitos são: dominância apical, respostas trópicas, diferenciação do tecido vascular, promoção da atividade cambial, indução de raízes adventícias; inibição da abscisão de folhas e frutos, estimulação da síntese do etileno, inibição ou promoção do florescimento e estimulação do desenvolvimento do fruto (Kerbaui, 1997; Barrueto *et al.*, 2000; Kohlenbach, 1976; Benjamins e Scheres, 2008).

Derivada da N<sup>6</sup>-adenina e da feniluréia, a zeatina é a citocinina mais comum nas plantas, sua biosíntese ocorre primariamente no ápice radicular (Sakakibara 2006). As citocininas são transportadas via xilema a partir das raízes para o sistema caulinar, seus efeitos são: divisão celular, promoção da formação de sistemas caulinares e atraso da senescência foliar. A aplicação de citocinina pode causar a inibição da dominância apical em gemas laterais (Gray, 2004; Sakakibara, 2006; Spatz e Gray, 2008).

Apesar do reconhecido papel no cultivo de várias espécies, ainda é recente a busca pelo entendimento completo dos processos de biosíntese dos hormônios vegetais. Mais comumente se observa a realização de estudos que avaliam o efeito da aplicação exógena de reguladores de crescimento sintéticos em diferentes fontes de explante, sem avaliar bioquimicamente suas concentrações, apenas avaliando as respostas morfogenéticas obtidas por doses que variam entre 0,1mg.L<sup>-1</sup> e 10mg.l<sup>-1</sup>.

Atualmente busca-se desvendar as rotas metabólicas que são desenvolvidas pelas plantas para a obtenção de moléculas ativas de hormônios vegetais. Mas os modelos que estão sendo estudados se aplicam somente a algumas espécies, mesmo sendo consenso que as rotas metabólicas variam entre as espécies (Benjamins e Scheres, 2008; Sakakibara, 2006). A divulgação destes modelos é importante para

auxiliar no entendimento dos processos regulatórios promovidos pelos hormônios vegetais.

Outro ponto observado nos estudos é o mecanismo de sinalização que alguns genes promovem. Essa sinalização se dá por meio do envolvimento da molécula de hormônio em uma estrutura formada por proteínas, que isolam a molécula para o transporte até as regiões onde o hormônio irá cumprir seu papel (Vanneste e Friml, 2009). Mas, sabe-se, que uma grande eficiência no mecanismo de sinalização e transporte, está diretamente ligada a uma maior desativação por meio de quebra das moléculas de hormônios (Benjamins e Scheres, 2008; Zhao, 2010). Novamente se chegou ao ponto de se analisar os hormônios vegetais do ponto de vista regulatório.

Tem se estudado também o mecanismo de transporte transmembrana das moléculas de hormônios, sabe-se que grande parte do transporte é realizada por uma família de proteínas conhecidas como PIN, que possui oito membros que atuam no efluxo de auxinas (Zhao, 2010). O mecanismo é similar ao das bactérias, com até 10 domínios transmembrana. Já se sabe que existem duas vias de biossíntese de auxinas e também já se conhecem alguns genes envolvidos no processo, uma dessas vias é dependente do precursor triptofano e a outra é independente do triptofano (Benjamins e Scheres, 2008; Vanneste e Friml, 2009).

Já se confirmou em modelos experimentais que os genes envolvidos na biossíntese dos hormônios vegetais são mais expressos em regiões mais jovens como folhas novas, flores e em regiões meristemáticas. Estes são os lugares sugeridos como os sítios de biossíntese dos hormônios vegetais. Mas tem se descoberto que alguns genes antes relacionados diretamente com a biossíntese de auxinas agem indiretamente controlando os níveis endógenos de auxinas por meio da modificação de rotas metabólicas (Benjamins e Scheres, 2008).

Em virtude da grande complexidade e altos custos, a realização de pesquisas que visam estudar as estratégias de biossíntese de reguladores de crescimento ainda são restritas a grandes centros de pesquisa, que dispõem de altos investimentos e pessoal treinado para desenvolver estes estudos que são realizadas em poucas espécies. Mas isso não impede que os resultados obtidos em estudos que se utilizam

da aplicação exógena de reguladores de crescimento em protocolos de propagação *in vitro* apresentem importantes avanços. O entendimento da biossíntese em modelos experimentais pode agregar conhecimento no entendimento na organogênese induzida em outras espécies.

### 3.4 Organogênese *in vitro*

Por meio da aplicação exógena de hormônios vegetais é possível induzir um processo conhecido como organogênese ou regeneração *in vitro*. A organogênese é vista como a simples formação de órgãos nos explantes, mas a regeneração só ocorre quando o explante consegue emitir brotações e enraizar, formando dessa forma uma planta completa (Peres, 2002). A organogênese pode ocorrer de forma direta, quando raízes ou brotos emergem diretamente dos tecidos dos explantes, ou de forma indireta quando primeiro ocorre à formação de tecidos indiferenciados conhecidos como calos (Kerbaudy, 1997).

A fase de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes inferiores do explante provenientes da multiplicação celular promovida pela ação dos hormônios vegetais, a emissão de brotos, da mesma forma, é caracterizada pelo surgimento dos primeiros ramos na parte superior do explante (Grattaplagia e Machado, 1998). O enraizamento ocorre de uma a três semanas e segundo Hartmann *et al.*, (1990), divide-se em iniciação e alongamento das raízes.

O processo de enraizamento é complexo e inclui fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos que interagem com os fatores ambientais. Além disso, a complexidade é aumentada pela multiplicidade de espécies e cultivares e pela variabilidade genética (Debergh, 1991).

O principal fator para o insucesso do processo de organogênese *in vitro* é a não aquisição de competência pelas células do explante (Peres, 2002). Esse processo ocorre quando as células não possuem os receptores para a classe hormonal testada ou mesmo a falha destes receptores (Woodward e Bartel, 2005; Peres, 2002).

Outro fator associado à falta de competência organogenética seria o próprio metabolismo hormonal do explante, pois é ele que determinará o balanço hormonal

endógeno para indução da organogênese (Peres e Kerbauy, 1999). Desse modo, explantes com alta atividade de citocinina oxidase (enzima que degrada citocininas), podem não chegar a um balanço auxina/citocinina endógeno indutor da formação de gemas, mesmo que sejam adicionadas elevadas concentrações de citocininas ao meio de cultura (Woodward e Bartel, 2005).

De modo semelhante, explantes com elevada atividade de degradação oxidativa ou, de inativação de auxina por conjugação com açúcares e aminoácidos, podem falhar na indução de raízes adventícias (Peres e Kerbauy, 1999). O efeito diferencial dos vários tipos de auxinas e citocininas quando aplicados ao meio de cultura pode ser também correlacionado com o fato de cada um deles interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno (Peres e Kerbauy, 1999; Peres, 2002).

Pode se associar também ao insucesso da organogênese o fato de que os tecidos dos explantes possam estar com elevada determinação para formar um órgão específico, e, dessa forma, comprometidos para responderem por vias alternativas de desenvolvimento, podendo falhar na alteração dessa via de formação para assumir outra (Torres *et al.*, 1999). Este processo é definido pela ação de genes específicos que podem ou não estar sendo expressos no tecido, o que acaba por ser outro fator determinante no complexo processo de organogênese *in vitro* (Peres, 2002).

### **3.5 Fatores que afetam a cultura de tecidos vegetais**

Além dos hormônios vegetais outros fatores afetam a propagação de plantas via cultura de tecidos (Torres *et al.*, 1999). Estes possuem uma particular variação, cada um dentro de suas próprias características, e que, quando combinados, determinam as condições as quais o trabalho será conduzido, e conseqüentemente o sucesso ou não da propagação *in vitro* (Ammirato, 1983). Os principais fatores são a fonte de tecido, reguladores de crescimento, meio de cultura, fatores abióticos, agentes contaminantes,

O tecido que servirá de fonte para a confecção dos explantes é um importante fator. As fontes de explantes mais comuns são os segmentos nodais do caule, os ápices caulinares e as folhas. Mas também são utilizados ápices radiculares, meristemas apicais, discos caulinares, segmentos radiculares, calos e ainda embriões (germinação *in vitro*).

Os explantes devem ser retirados de plantas em crescimento ativo, e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse como secas ou excessivas mudanças de temperatura, deficiência mineral e ataque de pragas ou doenças (Murashige, 1974; Hartmann e Kester, 1983; Kerbauy, 1997; Grattaplagia e Machado, 1998). Para se evitar o desperdício de recursos com plantas estressadas é recomendada a utilização de plantas produzidas em condições controladas.

Estudos demonstram que plantas obtidas por cultura de tecidos estão livres de microorganismos. A hipótese mais aceita para a ausência de contaminação nestes tecidos diz que a interrupção temporal da organização normal dos tecidos meristemáticos, ocasiona uma inibição da multiplicação dos microorganismos devido a não disponibilidade de enzimas chaves (Hartmann *et al.*, 1990).

Além disto, a ausência de tecido vascular na região do meristema apical, a presença de conexões plasmodesmáticas em dimensões diminutas nestas células e o ritmo ativo de divisões celulares nesta região, também são fatores que podem explicar a baixa concentração ou a ausência de microorganismos nestas células (Hartmann *et al.*, 1990). O processo ativo de divisão celular poderia utilizar a maior parte da energia para a formação de macromoléculas e componentes celulares estruturais, deixando os microorganismos em condições pouco competitivas para a própria multiplicação (Hartmann *et al.*, 1990).

Comprovou-se também que a concentração de microorganismos aumenta na região sub-apical dos meristemas de plantas tratadas com substâncias inibidoras de crescimento, as quais reduzem as taxas de divisão celular (Hartmann *et al.*, 1990). Em resumo, a inexistência de microorganismos nos meristemas apicais pode ser atribuída aos seguintes aspectos:

a) O ápice mantém certa distância das terminações vasculares e, nestas condições os microorganismos necessitariam passar de célula a célula até o domo apical;

b) Quando as células meristemáticas do apice estão em divisão ativa, o RNA, dos virus principalmente, não consegue introduzir-se no genoma destas células;

c) Células meristemáticas podem ter sistemas químicos de inativação, que podem ser potencializados em meristemas isolados;

d) Altas concentrações de auxinas presentes nos meristemas caulinares seriam responsáveis pela ausência de microorganismos.

Os ápices caulinares são muito utilizados para se iniciar o cultivo de espécies *in vitro*. Por serem sítios ativos de biossíntese de auxinas, em teoria, dispensariam a utilização de auxinas exógenas na fase inicial da cultura de tecidos, principalmente quando retirados de plantas em pleno crescimento ativo (Hu e Wang, 1984; Benjamins e Scheres, 2008).

Já explantes obtidos de gemas axilares podem propiciar a multiplicação direta (ausência de calo) de brotações que podem ser separadas em micro estacas para enraizamento *in vitro* (Torres *et al.*, 1999). Este procedimento pode originar respostas de propagação massal em progressão geométrica, e por ser um sistema direto, apresenta menores possibilidades de gerar variantes somaclonais (Hartmann *et al.*, 1990).

A contaminação dos explantes é um dos principais problemas do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo (Pierik, 1987). Quando os explantes contaminados são inoculados, ocorre uma rápida infestação do meio de cultura, e o explante tem que ser descartado (Reed e Tranprasert, 1995).

Em uma planta infectada, a concentração de microorganismos não é uniforme, é maior em tecidos maduros, e menor em tecidos meristemáticos (Quak 1988). No período de crescimento mais intenso, os meristemas alongam-se rapidamente e a concentração de microorganismos é menor (Hartmann *et al.*, 1990).

Já se sabe que plantas obtidas por cultura de tecidos estão livres de microorganismos (Quaq, 1988). A hipótese mais aceita para a ausência de contaminação nestes tecidos diz que a interrupção temporal da organização normal dos tecidos meristemáticos ocasiona uma inibição da multiplicação dos microorganismos, devido a não disponibilidade de enzimas chaves (Hartmann *et al.*, 1990).

Sendo assim, os protocolos de assepsia existem a fim de se obter explantes livres de microorganismos (Grattapaglia e Machado, 1998). Estes possuem uma

grande variação e são gradativamente adaptados para cada espécie estudada, são constituídos na maioria dos casos, de fungicidas e bactericidas

Os agentes descontaminantes mais recomendados são o etanol, do hipoclorito de sódio e do hipoclorito de cálcio (Grattapaglia e Machado, 1998; Pierik, 1990). Estes são aplicados tanto diretamente na planta ainda no substrato, quanto nos explantes já cortados, e também acrescidos no meio de cultura (Torres *et al.*, 1999).

No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação, são fontes potenciais de microorganismos, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (Medeiros, 1999).

A composição do meio de cultura aparece como um fator de grande relevância. Meios com alta concentração salina tais como o Mustashige e Skoog - MS (Murashige & Skoog, 1962), o Schenk e Hildebrandt - SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), e o Gambog e outros - B5 (Gamborg *et al.*, 1968) têm sido usados pelos efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos. Amirato & Steward (1971) mostraram que estruturas pré-embriônicas têm melhor desenvolvimento nestes meios quando comparados com o desenvolvimento em meio de baixa concentração salina, como o de White (1943).

A grande vantagem do meio MS é a presença do nitrogênio sob a forma de nitrato de amônio. A forma pela qual o nitrogênio é adicionado ao meio de cultura é determinante no sucesso da embriogênese somática (Ammirato, 1983).

A sobrevivência de explantes é bem maior quando cultivada, na primeira semana, em meio básico sem reguladores de crescimento (Giri *et al.*, 1993).

Outro ponto vital no processo de propagação *in vitro* é a aclimatização, neste estágio ocorre à transição da condição heterotrófica para autotrófica (Hartmann *et al.*, 1990). O principal objetivo neste estágio é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da nova planta (Grattapaglia e Machado, 1998). O emprego de estufas, túneis plásticos, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerado para cada situação, tendo em vista que as

plantas neste estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e suas folhas têm reduzida capacidade de formação cutículas cerosas protetoras (Guerra & Nodari, 2000).

De maneira geral este estágio inicia com a retirada das plântulas dos frascos e cuidadosa remoção por lavagem de resíduos de meio de cultura solidificado junto ao sistema radicular (Grattapaglia e Machado, 1998). Um segundo passo consiste em repicar estas plântulas para bandejas contendo o substrato autoclavado, cuja composição foi previamente determinada (Paiva e Gomes 1993).

Posteriormente transfere-se esta bandeja para uma estufa com sistema de nebulização intermitente por períodos médios de 15 a 30 dias, podendo-se após, repicar estas plântulas para sacos plásticos contendo uma mistura convencional não autoclavada de solo argiloso, arenoso e matéria orgânica e mantê-las em condição de ripado ou cobertura com sombrite que deixem passar em torno de 50% da luminosidade (Pasqual, 1985).

Por fim procede-se uma retirada gradual da cobertura para que as mudas sejam submetidas às condições normais que se verificam após o transplante para o local definitivo. É importante salientar que determinadas seqüências destas operações podem ser eliminadas em algumas espécies. Torna-se necessário, portanto, estabelecer procedimentos específicos para cada espécie a ser trabalhada em um laboratório de cultura de tecidos (Torres *et al.*, 1999).

### **3.6 Fases da cultura de tecidos vegetais**

A micropropagação de plantas através da cultura de tecidos pode ser operacionalizada em uma seqüência laboratorial de quatro fases, cada qual apresentando objetivos, pressuposições e necessidades específicas em termos de composição dos meios de cultura, tipo e balanço dos reguladores de crescimento e condições físicas como luz, temperatura e fotoperíodo.

Em condições laboratoriais cada fase deve ser identificada e as condições ótimas devem ser estabelecidas (Murashige, 1974). Debergh & Read (1991) propuseram a inclusão da fase 0 (zero) nesta seqüência de operações e, desta

maneira, a indução e a expressão de respostas organogénicas *in vitro* deve obedecer os passos listados a seguir:

**Fase 0:** Consiste em selecionar e cultivar a planta matriz doadora de explantes em condições adequadas e, eventualmente, controladas. Isto significa que pode ser necessário modificar as condições de fotoperíodo e temperatura, ou aplicar a essa planta fitorreguladores do grupo das giberelinas e auxinas, alterando com isto a sua condição fisiológica (Guerra & Nodari, 2000).

**Fase I:** Consiste no estabelecimento da cultura asséptica. O objetivo deste estágio é a definição do tipo de explantes a ser utilizado, o estabelecimento de culturas isentas de microorganismos contaminantes, a obtenção de altos índices de sobrevivência e de rápido crescimento dos explantes (Guerra & Nodari, 2000).

Nesta fase torna-se necessário monitorar e controlar as reações de oxidação que ocorrem: a) pela oxidação de compostos fenólicos presentes no explante, como resposta ao ferimento provocado pela excisão de um órgão ou tecido e; b) pela síntese de compostos mono e poliméricos por parte do explante. A incubação destas culturas na ausência da luz por alguns dias pode inibir os processos oxidativos.

**Fase II:** Multiplicação: esta fase é fundamentada na divisão e diferenciação celular, objetivando a obtenção de uma plântula, de acordo com as diferentes rotas morfogenéticas possíveis. De maneira geral procura-se promover a liberação de gemas axilares pré-formadas ou a indução de gemas adventícias (Guerra & Nodari, 2000).

Em muitos casos, estágios intermediários de calo estão envolvidos, contudo, quando o objetivo é a manutenção da conformidade clonal, a passagem por estágios de calo deve ser evitada, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de variações somaclonais. Nesta fase deve-se determinar o número e intervalo de sub-cultivos, bem como determinar e otimizar a taxa de multiplicação, ou seja, o número de gemas ou de eixos caulinares que podem ser obtidos a partir de cada inóculo nos sub-cultivos.

As condições ambientais neste estágio relacionam-se com a temperatura, cuja faixa ótima está entre 22 e 27°C para plantas de clima temperado e tropical, respectivamente. O período de luz deve permanecer em torno de 16 a 18 horas em intensidades luminosas médias de 5 W.m<sup>-2</sup>.

**Fase III:** Nesta fase busca-se o alongamento, a indução e iniciação radicular e a preparação para a aclimatização. O objetivo deste estágio é a preparação para a conversão das condições heterotróficas para autotróficas. As estratégias deste estágio incluem eventuais inclusões no meio de cultura de AIB por exemplo, para induzir a iniciação radicular e carvão ativado para favorecer a iniciação radicular (Guerra & Nodari, 2000). Reduções nas concentrações dos sais e das fontes de carboidratos do meio de cultura podem trazer benefícios à iniciação radicular, bem como facilitar o processo de aclimatização.

**Fase IV:** Climatização: Neste estágio ocorre a transição da condição heterotrófica para autotrófica. O principal objetivo neste estágio é diminuir ao máximo as perdas que ocorrem principalmente pela desidratação dos tecidos da microplanta. O emprêgo de estufas, túneis plásticos, sistemas de nebulização e de antitranspirantes deve ser considerado para cada situação, tendo em vista que as plantas neste estágio normalmente não apresentam estômatos funcionais e suas folhas têm reduzida capacidade de formação cutículas cerosas protetoras (Guerra & Nodari, 2000).

Composições adequadas de substratos também são importantes e na maior parte dos casos o emprêgo de areia, terra, vermiculita, casca de arroz carbonizada isoladamente ou em misturas proporcionais, resulta em elevados índices de sobrevivência.

De maneira geral este estágio inicia com a retirada das plântulas dos frascos e a cuidadosa remoção por lavagem de resíduos de meio de cultura solidificado junto ao sistema radicular. Um segundo passo consiste em repicar estas plântulas para bandejas de isopor contendo o substrato autoclavado, cuja composição foi previamente determinada.

O terceiro passo consiste em manter estas bandejas, por períodos de até 15 dias, em sala de cultura cuja temperatura e duração e intensidade luminosa possam

ser controladas. A manutenção de uma câmara úmida sobre as bandejas pode ser feita pela utilização de filmes plásticos em cobertura.

Posteriormente transfere-se esta bandeja para uma estufa com sistema de nebulização intermitente por períodos médios de 15 a 30 dias, podendo-se após, repicar estas plântulas para sacos plásticos contendo uma mistura convencional não autoclavada de solo argiloso, arenoso e matéria orgânica e mantê-las em condição de ripado ou cobertura com sombrite que deixem passar em tórno de 50% da luminosidade.

Por fim procede-se uma retirada gradual da cobertura para que as mudas sejam submetidas às condições normais que se verificam após o transplante para o local definitivo. É importante salientar que determinadas sequências destas operações podem ser eliminadas em algumas espécies. Torna-se necessário, portanto, estabelecer procedimentos específicos para cada espécie a ser trabalhada em um laboratório de micropropagação.

### 3.7 Espécies estudadas

**Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet):** A andiroba pertence à família meliaceae, é uma árvore de grande porte, chegando a atingir 30m de altura, com um fuste cilíndrico, reto e sapopemas em sua base. A casca é grossa e amarga e desprende-se facilmente em grandes placas. A copa possui um tamanho médio e é bastante ramosa. As folhas alternadas são compostas, longo-pecioladas, com 30-60cm de comprimento e 50cm de largura, os folíolos opostos (até 19 pares) apresentam um tom verde-escuro com forma oval-oblonga e extremidade apical curta, textura macia, superfície plana e margens completas (Clay *et al.*, 2000)

A inflorescência é uma panícula axilar, glabras, subglobosas de cor creme (Loureiro *et al.*, 1979; Rizinni e Mors, 1976). O fruto é uma capsula globosa a subglobosa, deiscente por quatro valvas que se separam quando caem no solo pelo impacto da queda e liberam suas sementes (Aublet, 1977; Loureiro *et al.*, 1979). As sementes possuem suas laterais anguladas devido a compressão mútua, variam em número por fruto, geralmente entre 4 a 16, e pesam em média 21g (Carruyo, 1972; McHargue e Hartshorn, 1983; Pinto, 1963).

A germinação é do tipo hipógea e criptocotiledonar (Fisch *et al.*, 1996). O florescimento ocorre na estação chuvosa, entre fevereiro e março, frutifica no período de março a maio. Na reserva florestal Adolpho Ducke, Manaus, floresce entre dezembro e março e frutifica entre março e abril (Alencar *et al.*, 1979).

A andiroba é uma espécie de uso múltiplo. A madeira e o óleo extraído das sementes são dois dos produtos mais importantes. Entre as espécies nativas da Amazônia, a madeira da andiroba é uma das mais estudadas, sendo considerada nobre e sucedânea do mogno (Ferraz *et al.*, 2002; Loureiro *et al.*, 1979).

O óleo é usado na preparação de sabão e de cosméticos. Recentemente, a Fundação Osvaldo Cruz lançou no mercado velas de andiroba que são indicadas para repelir mosquitos transmissores de doenças, como a dengue e a malária. Alguns grupos indígenas e populações tradicionais utilizam o óleo como repelente de insetos e no tratamento de artrite, distensões musculares e alterações dos tecidos cutâneos (Ferraz *et al.*, 2002; Loureiro *et al.*, 1979).

Popularmente, o chá da casca e das flores é usado como remédio para combater infecção bacteriana e o chá do cerne como fungicida (Ferraz *et al.*, 2002; Souza, 1997). Mas o óleo é o produto principal, atualmente vem sendo testado em ensaios *in vitro* no combate a vários tipos de câncer.

No que diz respeito à propagação, Pinto (2007) encontrou alta taxa de predação das sementes no campo, chegando a 61,9%, sendo as principais espécies de insetos responsáveis a *Hypsipyla grandella* e *Hypsipyla ferrealis*, o que inviabilizou a germinação das sementes atacadas.

**Pau rosa (*Aniba rosaedora* Ducke):** O pau rosa pertence à família lauraceae, é uma árvore que pode atingir 30m de altura por 2m de diâmetro, possui um tronco reto e cilíndrico, casca pardo-amarelada, que se desprende facilmente em grandes placas. Todas as partes desta árvore são aromáticas. A copa é geralmente de forma regular ocupando o dossel intermediário ou superior da floresta (Clay *et al.*, 2000).

As folhas são simples, distribuídas ao longo dos ramos menores e são coriáceas e lisas, geralmente medindo de 4 a 5cm de largura, com as margens planas ou levemente recurvadas e ápice bastante acuminados (Clay *et al.*, 2000). As nervuras

primárias divergem das nervuras secundárias em um ângulo de 45 a 60 graus. A inflorescência é uma panícula com múltiplas flores, as flores são pequenas, cor de ferrugem, com 1cm de comprimento e apresentam pedicelos pouco evidentes e filetes curtos (Clay *et al.*, 2000).

O fruto é uma drupa de forma cônica de cor esverdeada medindo entre 2 e 3cm de comprimento por 1,5cm de diâmetro (Ducke, 1938; Alencar e Fernandes, 1978; Loureiro *et al.*, 1979). Cada fruto contém uma única semente e cerca de 160 a 200 sementes pesam 1kg. Na reserva florestal Adolpho Ducke, Manaus, a floração ocorre entre outubro e fevereiro e a frutificação entre novembro e março (Magalhães e Alencar, 1978). É uma espécie perenifólia (Clay *et al.*, 2000).

O pau rosa destaca-se na produção de óleo essencial de aroma agradável, rico em linalol e muito utilizado na indústria de perfumaria como fixador. O óleo é obtido a partir da destilação de qualquer parte da planta, porém a madeira tem sido sua fonte principal. Diferenças no rendimento nas propriedades físico-químicas e no aroma foram encontradas em função da parte da planta utilizada e das variações intraespecíficas (Clay *et al.*, 2000).

O óleo das folhas possui aroma adocicado e o da madeira apresenta aroma semelhante à lavanda devido à maior concentração de linalol. Diferenças no aroma também são evidentes entre óleos oriundos de regiões distintas, como as verificadas entre o óleo brasileiro e o franco-guianense.

As últimas pesquisas indicam que a forma mais sustentável de obtenção do óleo de pau rosa é por meio da realização de podas nos galhos, o que permite a renovação da parte aérea da planta (Clay *et al.*, 2000; Sampaio *et al.*, 2007).

O pau rosa encontra-se em risco de extinção devido aos métodos primitivos de extração ainda empregados na obtenção do óleo, que utilizam toda a planta, inclusive das raízes. Outro problema é o ataque das plântulas em plantios e viveiros pelas larvas de *Heilipus ororatus* que após se alojarem no caule causam a morte das plântulas, e nas sementes inviabilizam a germinação (Vanin e Gaiger, 2005; Nunes *et al.*, 2009).

**Breu branco (*Protium spruceanum* Benth.):** Esta espécie pertence à família burseraceae, é uma árvore de médio porte que atinge de 8 a 14m de altura por 25 a

40cm de diâmetro, possui copa arredondada e densa com tronco reto e cilíndrico e casca rugosa e fina. As folhas são compostas, pinadas, alternas, com eixo comum (pecíolo+raque) de 10-20cm de comprimento. Folíolos subcoriáceos, em número de 3 a 5, levemente discolores, glabros na face superior e pubescentes sobre as nervuras na face inferior, de 5-10 cm de comprimento por 3-4cm de largura (Loureiro *et al.*, 1979).

Inflorescências em panículas ramosas axilares de 2-3cm de comprimento. Seus frutos são bagas subglobosas, deiscente, de superfície lisa e brilhante, de cor vinho contendo 1 a 2 sementes envolvidas por um arilo fino e adocicado (Loureiro *et al.*, 1979). Floresce durante os meses de setembro-novembro e os frutos amadurecem a partir de janeiro-fevereiro (Loureiro *et al.*, 1979).

O breu branco produz uma resina translúcida que endurece em contato com o ar. Esta resina é produzida principalmente como uma reação de defesa da planta ao ataque de um inseto, que deposita suas larvas sob a casca da árvore, ou quaisquer outras injúrias no caule da planta. A resina, exudada por um dano ao caule, possui aspecto mineral, odor marcante e bastante agradável, é coletada manualmente pelas populações locais por conta de suas diversas utilizações (Ferraz e Costa, 2004).

Na fitoterapia ela é utilizada para tratar doenças de várias origens, mas suas propriedades terapêuticas ainda carecem de comprovação científica, apesar da sua larga utilização na medicina tradicional como anti-inflamatório, no tratamento das dores reumáticas e musculares, das infecções das vias respiratórias e picadas de insetos (Ferraz e Costa, 2004).

A resina do breu branco é industrialmente utilizada para a fabricação de verniz, velas e repelentes de insetos. Seu óleo essencial é largamente empregado na indústria cosmética e de perfumes, na fabricação de sabonetes e aromatizadores de ambiente, seus produtos são comercializados em vários países (Ferraz e Costa, 2004).

**Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne):** É uma espécie pertencente à família leguminosa-caesalpinoideae, é uma árvore de grande porte podendo atingir 36m de altura com um diâmetro de 80cm ou mais. A casca é lisa, resistente e mede cerca de 1cm de espessura. As folhas compostas são alternadas e possuem dois folíolos

oblongos e lanceolados com suas extremidades afinadas e suas bases arredondadas com uma fina penugem na veia principal (Clay *et al.*, 2000).

As flores são brancas e fixadas em sua base, e suas pétalas medem 4 a 5mm de comprimento e apresentam um leve tom vermelho-ferrugem. Os frutos são uniloculares e medem cerca de 3cm de diâmetro e tornam-se vermelhos quando maduros. As sementes ovais ou esféricas e apresentam uma tonalidade amarela intensa (Alencar, 1981; Loureiro *et al.*, 1979; Clay *et al.*, 2000).

Destingue-se de outras espécies do gênero pela forma especial de seus folíolos, pelo agradável cheiro de sua madeira (um perfume forte e constante de cumarina) e por suas grandes flores. Por outro lado, essa árvore e sua madeira são similares à *C. reticulata*, porém a resina oleosa produzida é mais clara e mais líquida (Clay *et al.*, 2000).

Floresce entre janeiro e abril durante a estação chuvosa Amazônica, e frutifica entre março e agosto. É uma espécie que aparente estar sempre verde, porém, ocasionalmente, torna-se semidecídua no fim da frutificação (Alencar *et al.*, 1979). Vastano (1984) menciona que essa espécie é alógama. De polinização cruzada, como é de se esperar de uma árvore perene da Amazônia (Clay *et al.*, 2000).

No interior do tronco da árvore da copaíba é encontrado um óleo composto principalmente por ácido copálico, alfa-cariofileno, beta-cariofileno. Este óleo é obtido por meio de um furo feito no tronco (Vastano, 1984). É utilizado pelas populações tradicionais da região amazônica para fins medicinais como antibiótico antiinflamatório. (Dwyer, 1951; Ferreira e Braz, 1997). Existem diversas pesquisas em andamento que objetivam comprovar sua eficiência no tratamento de diversos tipos de câncer.

## **4. Materiais e métodos**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola Superior de Tecnologia – EST, da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Manaus – Amazonas, no período de março de 2008 a dezembro de 2010.

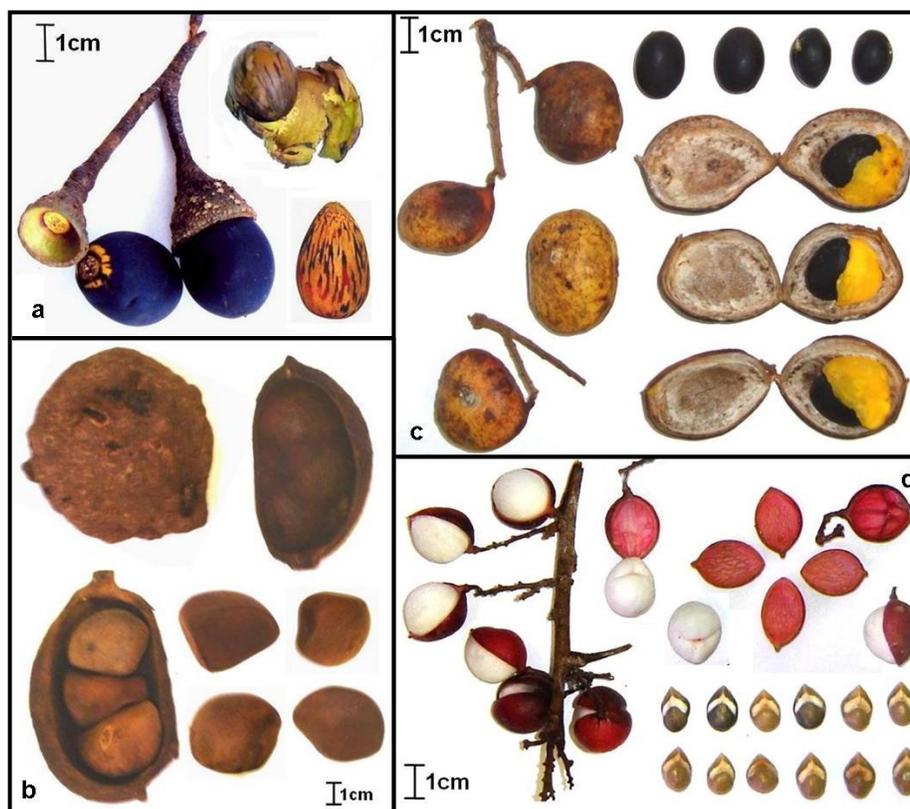
### **4.1 Tratamento das sementes e plântulas**

As sementes, mostradas na figura 1, foram coletadas em plantios na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no km 26 da rodovia AM-010, Manaus- Amazonas, e em populações naturais existentes na zona rural do município de Silves - AM.

Após a coleta, as sementes foram envolvidas em folhas de jornal e mantidas em sacos plásticos. Foram levadas ao laboratório e beneficiadas manualmente. Logo após serem beneficiadas, as sementes receberam uma lavagem em água corrente com sabão neutro por aproximadamente meia hora, e todos os resíduos do mesocarpo foram removidos.

O processo de desinfestação das sementes iniciou por imersão em solução de fungicida sistêmico derosal ( $5\text{ml.L}^{-1}$ ) por 24h e imersão por 30min em solução aquosa contendo 0,85% de hipoclorito de sódio.

Em seguida as sementes foram postas para germinar em bandejas plásticas contendo como substrato areia lavada coberta por aproximadamente 2 centímetros de vermiculita, mantidas em casa de vegetação coberta com sombrite 70% equipada com sistema de nebulização intermitente. Logo após o início da germinação as plântulas foram tratadas três vezes por semana por meio de borrifamento de derosal ( $5\text{ml.L}^{-1}$ ) em solução com água destilada.

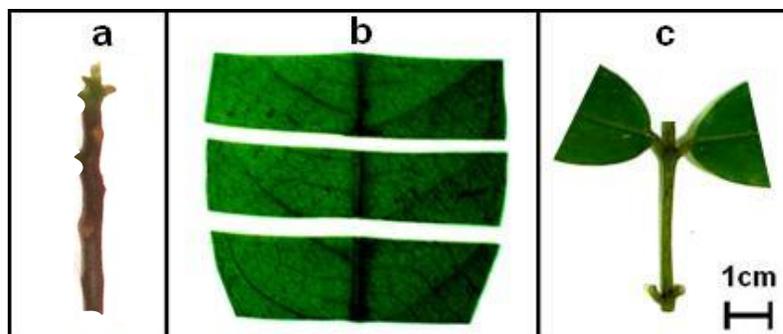


**Figura 1:** Ilustração dos frutos e sementes de: a – pau rosa (*Aniba rosaeodora*); b - andiroba (*Carapa guianensis*); c – copaíba (*Copaifera multijuga*); d – breu branco (*Protium spruceanum*).

## 4.2 Explantes

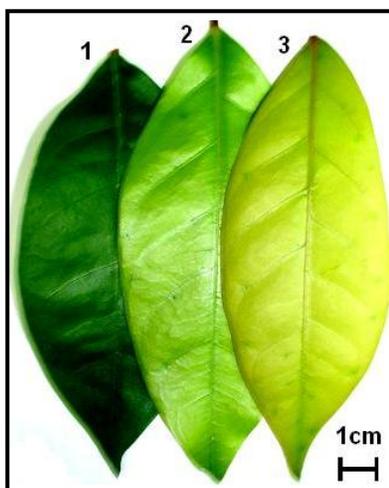
Os explantes foram excisados nas primeiras horas da manhã com, auxílio de tesoura autoclavada, mantidos em copos plásticos com água destilada durante todo processo de coleta para evitar o ressecamento. Os tipos de explantes testados foram:

1. Ápices caulinares: com aproximadamente 3cm de comprimento (Figura 2a) para todas as espécies.
2. Pecíolos: Microestacas feitas com pecíolos e raquis com aproximadamente 1cm dos folíolos (figura 2b). Exceto para o pau rosa, que possui folha simples, foram utilizados pecíolos com aproximadamente 1cm da base da folha;
3. Folhas: Folíolos cortados transversalmente (Figura 2c), exceto para o pau rosa, que foram utilizados cortes transversais do limbo foliar.



**Figura 2:** representação do modelo de corte realizado para a confecção de explantes no estabelecimento *in vitro* de andiroba (*Carapa guianensis*) breu branco (*Protium spruceanum*) copaíba (*Copaífera multijuga*) e pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) sendo: a - ápice caulinar; b - folíolo seccionado transversalmente; c – raque com 1cm da base de dois foliólulos.

Na tentativa de se padronizar o máximo possível à maturidade do material vegetal com que os explantes foram confeccionados foi adotado o grau de maturidade 1 como pode ser visto na figura 3, dessa forma os explantes foram conceccionados com porções das mudas que apresentavam coloração verde-escuro.



**Figura 3:** Folhas de andiroba (*Carapa guianensis*) representando os diferentes graus de maturidade sendo 1: folha madura, 2: folha jovem; 3: folha nova.

#### 4.3 Meio de cultura e reguladores de crescimento

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), com pH de 5,8 acrescido com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 7,6g.L<sup>-1</sup> de ágar. Os meios foram esterilizados por 15 min em autoclave com pressão ajustada em 1,5atm e temperatura de 121°C. Após a autoclavagem os frascos com o meio foram mantidos em sala com temperatura de

30°C, e fotoperiodismo artificial de 16h por dia. Os reguladores de crescimento utilizados foram auxinas: ácido-indol-acético (AIA) e ácido-naftaleno-acético (ANA); citocininas: tidiazuron (TDZ) e 6-benzil-aminopurina (BAP).

#### 4.4 Estabelecimento *in vitro*

Os explantes foram lavados em água corrente por vinte minutos e imersos em água autoclavada até o momento da aplicação das soluções de assepsia, que ocorreu em câmara de fluxo laminar. Em seguida os explantes foram imersos nas soluções contendo como agentes descontaminantes ampicilina, clorafenicol, derosal e foi utilizado o biosurfactante tween 20 (1ml.L<sup>-1</sup>) em todos os tratamentos, como descrito detalhadamente no Quadro 1.

O hipoclorito de sódio só foi utilizado na fase final da assepsia em solução aquosa, antes da inoculação dos explantes, dentro da câmara de fluxo laminar. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 50 repetições por tratamento.

**Quadro 1:** composição dos protocolos de assepsia testados no estabelecimento *in vitro* de ápices, folhas e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*) breu branco (*Protium spruceanum*) copaíba (*Copaifera multijuga*) e pau rosa (*Aniba rosaeodora*).

Tratamentos	Derosal 2ml. <sup>-1</sup> /24h	Derosal 5ml.l. <sup>-1</sup> /24h	Clorafenicol 500mg.L-1	Ampicilina 500mg.L-1
1	X			
2		X		
3		X	X	
4		X		X

Antes da inoculação foi realizada uma última modelagem dos explantes a fim de padronizar o máximo possível o tamanho e formato, e se retirar alguma extremidade oxidada pelo processo de desinfestação superficial.

Os explantes foliares foram inoculados com a face adaxial em contato com o meio de cultura (Cassana *et al*, 2007). Foram utilizados frascos de 250 ml

autoclavados, com aproximadamente 30ml de meio de cultura, em cada frasco foram inoculados três explantes.

Os ápices caulinares e pecíolos foram inoculados em tubos de ensaio, previamente esterilizados, de 200mm x 20mm, com aproximadamente 10ml de meio de cultura, em cada tubo foi inoculado um explante.

Os explantes, após a inoculação, foram mantidos no escuro em B.O.D. com temperatura de 30°C por três dias. Após esse período os explantes foram levados para sala de crescimento com 16h de fotoperíodo provido por lâmpadas brancas frias com radiação de  $25\mu\text{moles.m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  e temperatura de 30°C. Aos 15 dias foi avaliada a taxa de contaminação por fungos, taxa de contaminação por bactérias, taxa de contaminação total e taxa de sobrevivência.

#### **4.5 Regeneração *in vitro***

O protocolo de assepsia que apresentou melhores resultados no estabelecimento *in vitro* dos explantes foi repetido para obter material para a fase de organogênese. Nesta fase foi adotado delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento.

Foram aplicadas doses dos reguladores de crescimento em esquema fatorial 5x5 (5 doses de auxina e 5 doses de citocinina) totalizando 24 tratamentos em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), e um tratamento testemunha, como mostra o Quadro 2. Após o transplante para o meio com os reguladores de crescimento os explantes voltaram para a sala de crescimento. Aos 30 dias foi avaliada a emissão ou não de broto e/ou raiz, o número de raízes e/ou brotos por explante e taxa de regeneração *in vitro*.

**Quadro 2:** Tratamentos compostos de doses de auxinas e citocininas testadas na regeneração *in vitro* de ápices caulinares, folhas e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*) breu branco (*Protium spruceanum*) copaíba (*Copaifera multijuga*) e pau rosa (*Aniba rosaeodora*).

(mg.L <sup>-1</sup> )		AIA			ANA	
		0,0	3,0	6,0	3,0	6,0
BAP	0,0	T1*	T2	T3	T4	T5
	5,0	T6	T7	T8	T9	T10
	10,0	T11	T12	T13	T14	T15
TDZ	5,0	T16	T17	T18	T19	T20
	10,0	T21	T22	T23	T24	T25

\* - Tratamento testemunha

#### 4.6 Aclimatização

O tratamento que apresentou os melhores resultados na regeneração dos explantes foi repetido para obter material para a fase de aclimatização. Antes do transplante para o substrato final para aclimatização, os explantes foram transplantados para o mesmo meio MS, mas com a quantidade de sais e sacarose reduzida pela metade, os explantes ficaram neste meio por 20 dias na sala de crescimento.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento. Foram testados 6 tipos de substrato como mostra o Quadro 3. Os substratos foram autoclavados por 15 minutos em autoclave com pressão ajustada em 1,5atm e temperatura de 121°C e foram mantidos na sala de crescimento. O transplante se deu pela retirada das plântulas dos tubos e duas lavagens em água autoclavada para se retirar os resíduos de meio de cultura.

As plântulas transplantadas foram mantidas na sala de crescimento por 7 dias e receberam água diariamente. Após esse período foram levadas ao viveiro coberto com sombrite 70% e sistema de nebulização intermitente. 30 dias após o primeiro transplante foi avaliada a taxa de sobrevivência, altura, número de folhas e diâmetro da base de todas as plântulas.

**Quadro 3:** Substratos testados na aclimatização de plântulas de andiroba (*Carapa guianensis*) breu branco (*Protium spruceanum*) copaíba (*Copaifera multijuga*) e pau rosa (*Aniba rosaeodora*) produzidas via cultivo *in vitro*.

Substrato	Porções de areia	Porções de argila	Porções de MO*	Vermiculita 2 cm	Adubo foliar (10 ml.l <sup>-1</sup> )
1	2	1	1	Sim	Sim
2	1	2	1	Sim	Sim
3	1	1	2	Sim	Sim
4	2	1	1	Não	Não
5	1	2	1	Não	Não
6	1	1	2	Não	Não

\* Matéria orgânica: esterco de gado ou galinha.

\* Cobertura do recipiente do substrato com aproximadamente 2 cm de vermiculita.

\* Aplicação por meio de borrifamento de 10 ml.l<sup>-1</sup> de Ouro Verde.

#### 4.7 Análise estatística dos dados

As avaliações foram feitas por meio de contagem e tabulação das variáveis analisadas, os dados foram armazenados no Microsoft Excel<sup>®</sup>. Os valores de regeneração foram transformados para raiz quadrada de  $x+0,5$  e analisados em esquema fatorial 5x5, sendo os fatores auxinas e citocininas com cinco níveis cada. As médias foram comparadas pelo teste de TUKEY com 5% de significância. Foi utilizado o programa estatístico ESTAT<sup>®</sup> versão 2.0.

## 5. Resultados

### 5.1 Andiroba

#### Estabelecimento *in vitro*

A ocorrência de contaminação por bactérias se manteve acima de 68% nos tratamentos 1 e 2, que não continham agentes bactericidas como mostra a figura 4. O tratamento 3 apresentou uma taxa de contaminação por bactérias acima de 29% em todos os explantes, já o tratamento 4 obteve os melhores resultados reduzindo a zero a incidência de bactérias nas folhas com 12% e 16% nos ápices e pecíolos respectivamente.

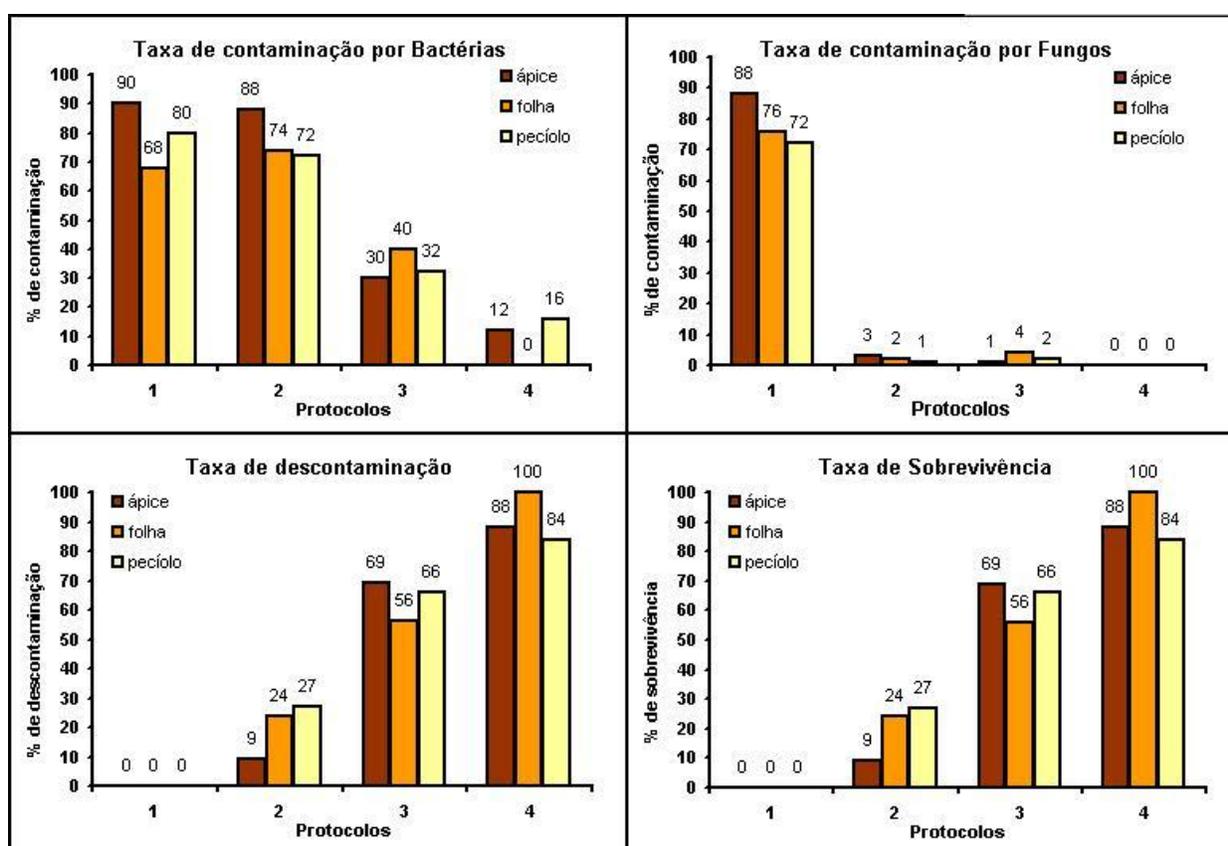
A taxa de contaminação fúngica foi alta no tratamento 1, se manteve acima de 72% (Fig. 4). Este resultado indica que a concentração de derosal na solução descontaminante possui relação direta com a diminuição da incidência de fungos nos explantes, fato comprovado pela redução promovida pela dose de  $5\text{ml.L}^{-1}$  nos tratamentos 2, 3 e 4 em relação a dose  $2\text{ml.L}^{-1}$  utilizada no tratamento 1. No tratamento 4 as taxas de contaminação por fungos foi reduzida e zero em todos os explantes.

A taxa de descontaminação mostrada na figura 4 subtrai os resultados gerais de contaminação por bactérias e fungos e mostra a porcentagem de explantes livres de contaminação. O tratamento 1 não promoveu a descontaminação superficial de nenhum explante, seguido do tratamento 2 que obteve 27% de descontaminação de pecíolos. O tratamento 3 obteve valores intermediários, entre 56% e 69% para folhas e ápices respectivamente, e o tratamento 4 possibilitou o estabelecimento satisfatório dos explantes de andiroba com valores de 84%, 88% e 100% para pecíolos, ápices e folhas respectivamente.

A taxa de sobrevivência apresentada na Figura 4 mostra a porcentagem de explantes que não foram severamente afetados pela intensidade dos protocolos de assepsia testados ao ponto de não sobreviverem. Não houve mortalidade dos explantes ocasionada pela oxidação em nenhum dos tratamentos, esse resultado observa-se pela comparação das taxas de descontaminação e sobrevivência, a

diferença entre esses valores indica que as soluções descontaminantes aplicadas se mostraram excessivamente agressiva ao tecido dos explantes, ou que foram utilizados tecidos muito jovens para a confecção dos explantes, e com pouca resistência após serem excisados da muda.

Os resultados mostram que os tratamentos utilizados apresentaram diferentes respostas na desinfestação superficial dos explantes (Figura 4). A utilização de ampicilina (500mg.L<sup>-1</sup>) e derosal (5ml.l<sup>-1</sup>) no tratamento 4, promovem resultados que propiciam o estabelecimento *in vitro* acima de 83% em todos os explantes testados.



**Figura 4:** Índices percentuais de contaminação por fungos, bactérias, descontaminação e sobrevivência de ápices, folhas e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*) tratadas com 4 diferentes protocolos de assepsia, avaliadas aos 15 dias.

## Regeneração *in vitro*

Pela observação da Tabela 1 pode se constatar que houve resposta semelhante nos ápices, folhas e pecíolos de andiroba para a aplicação isolada de auxina. Ambos apresentaram significância a um nível de 1% pelo teste de tukey para a emissão de raízes. A aplicação exógena de citocininas e a interação auxinas x citocininas não tiveram significância no enraizamento de nenhum explante. A aplicação exógena de citocininas apresentou significância a um nível de 1% pelo teste de tukey para a emissão de brotos nos ápices, o fator auxina e a interação auxinas x citocininas não apresentaram significância neste fator. Não foi observada resposta morfogênica nas folhas e nos pecíolos após 30 dias.

**Tabela 1:** Resumo da análise de variância para as médias do número de raízes e brotos em ápices caulinares, folhas e pecíolos de andiroba (*Carapa guianensis*) cultivados *in vitro*, em função do efeito diferentes concentrações de ANA, AIA, BAP e TDZ após 30 dias.

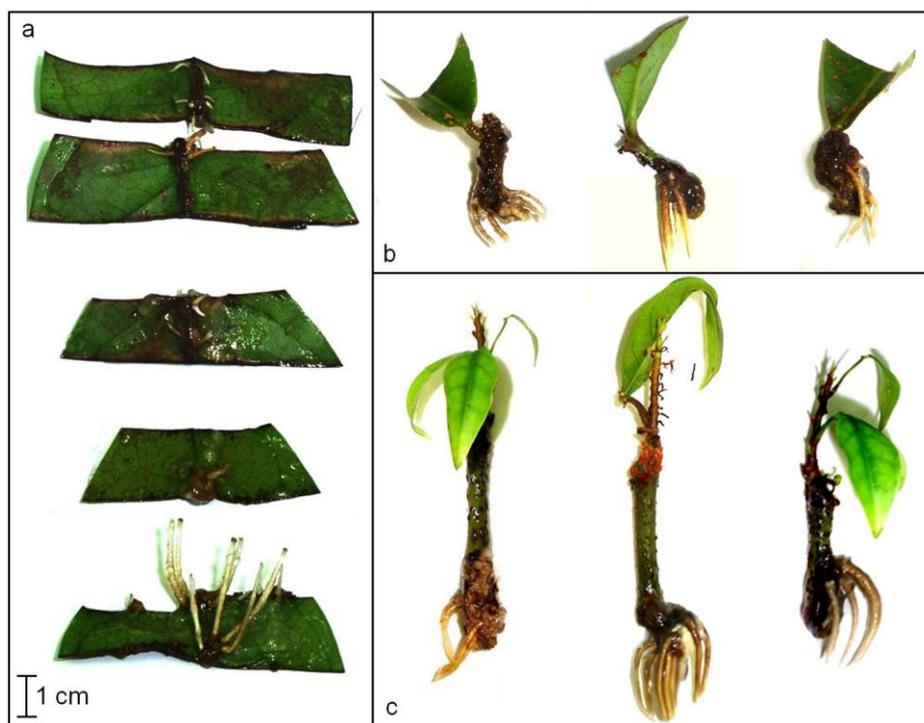
	ÁPICE			FOLHA			PECÍOLO		
	Fator	GL	Teste F	Fator	GL	Teste F	Fator	GL	Teste F
<b>Raiz</b>	Auxina	4	<b>42,35**</b>	Auxina	4	<b>27,47**</b>	Auxina	4	<b>33,55**</b>
	Citocinina	4	0,02NS	Citocinina	4	0,05NS	Citocinina	4	0,01NS
	Aux x Cit	16	0,01NS	Aux x Cit	16	0,06NS	Aux x Cit	16	0,02NS
<b>CV (%)</b>	21,37			36,11			34,44		
<b>D. Padrão</b>	0,18			0,25			0,27		
<b>Broto</b>	Auxina	4	0,03NS	Auxina	4	0	Auxina	4	0
	Citocinina	4	<b>7,42**</b>	Citocinina	4	0	Citocinina	4	0
	Aux x Cit	16	0,03NS	Aux x Cit	16	0	Aux x Cit	16	0
<b>CV (%)</b>	21,40			0			0		
<b>D. Padrão</b>	0,27			0			0		

GL - grau de liberdade; CV – Coeficiente de Variação; NS - Não significativo pelo teste de Tukey.

\*\* = 1% de significância pelo teste de Tukey.

Os tratamentos testados no enraizamento de ápices, folhas e pecíolos de andiroba apresentaram significância a um nível de 1% pelo teste de tukey em todos os explantes. Houve também significância na indução de brotos nos ápices, sendo este, o

único tipo de explante que regenerou como pode ser visto na figura 5c. As folhas e os pecíolos não regeneraram, emitiram apenas raízes como mostra a figura 5a e 5b respectivamente.



**Figura 5:** Explantes de andiroba (*Carapa guianensis*) estabelecidos *in vitro* em meio MS e tratados com ANA e BAP sendo: a – Segmentos de folha enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ); b - Pecíolos de andiroba enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ); c - ápices caulinares de mudas regenerados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ) e BAP ( $10\text{mg.L}^{-1}$ ).

Pela observação da Tabela 2 pode se constatar que as doses de  $6\text{mg.L}^{-1}$  de ANA nos tratamentos 5, 10, 15, 20 e 25 promoveram as maiores medias de número de raízes por explante com medias que variaram entre 4,8 e 5,2, seguidas pelos tratamentos 4, 9, 14, 19 e 24, que continham  $3\text{mg.L}^{-1}$  de ANA e apresentaram medias de raízes por explante entre 1,7 e 2,2.

As maiores medias de número de brotos por explante foram obtidas pela aplicação de  $5\text{mg.L}^{-1}$  e  $10\text{mg.L}^{-1}$  de BAP nos tratamentos 6, 7, 8, 9, 10, e 11, 12, 13, 14 e 15. As doses de BAP não diferiram significativamente entre si e apresentaram números médios de brotos por explante entre 2,2 e 2,8. De forma semelhante, as doses de  $5\text{mg.L}^{-1}$  e  $10\text{mg.L}^{-1}$  de TDZ nos tratamentos 16, 17, 18, 19, 20 e nos

tratamentos 20 21, 22, 23, 24, 25, não apresentaram diferença significativa entre si, e promoveram valores médios intermediários de números de broto por explante que variaram entre 1,2 e 1,5.

Nos tratamentos que continham somente auxinas (2, 3, 4 e 5) e no tratamento testemunha (1) houve formação de brotos, mas com as menores médias, entre 0,5 e 0,7 brotos por explante. Este resultado mostra que os ápices de andiroba possuem a capacidade de emitir brotações independentemente da aplicação exógena de reguladores de crescimento.

A taxa de regeneração foi 100% nos tratamentos 9, 10, 14, 15, 19, 20, 24, e 25 que continham ANA ( $3\text{mg.L}^{-1}$  e  $6\text{mg.L}^{-1}$ ) e citocininas. A dose ou o tipo de citocininas não diferiu na taxa de regeneração, apenas a presença ou não de citocininas apresentou diferença, como pode ser observado ao se comparar as menores taxas obtidas nos tratamentos 4 e 5 (50% e 70% respectivamente), que não continham citocininas, com as demais taxas, que apresentaram 100% de regeneração, mas as melhores médias foram obtidas com a aplicação de BAP ( $5\text{mg.L}^{-1}$  e  $10\text{mg.L}^{-1}$ ).

Nas folhas, o número de raízes por explante foi significativamente maior nos tratamentos com  $6\text{mg.L}^{-1}$  de ANA (5, 10, 15, 20 e 25) que obtiveram médias entre 3,4 e 4,1, seguidos pelos tratamentos com  $3\text{mg.L}^{-1}$  de ANA (4, 9, 14, 19 e 24) que obtiveram 1,1 e 1,8 raízes por explante. A resposta dos pecíolos foi semelhante a das folhas com as maiores médias entre 3,8 a 4,5 raízes por explante nos tratamentos com  $6\text{mg.L}^{-1}$  de ANA (5, 10, 15, 20 e 25) seguidas por médias que variaram entre 1,6 e 1,9 raízes por explante nos tratamentos com  $3\text{mg.L}^{-1}$  de ANA (4, 9, 14, 19 e 24). Nos tratamentos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 17,18, 21, 22 e 23, da mesma forma que nos ápices e pecíolos, não houve emissão de raízes.

### **Aclimatização**

Após sete dias todos os explantes de andiroba morreram por ressecamento.

**Tabela 2:** Porcentagem de regeneração *in vitro* de ápices caulinares e número de raízes por explante em folhas e pecíolos de Andiroba (*Carapa guianensis*) cultivados *in vitro*, tratados com AIA, ANA, BAP e TDZ, após 30 dias.

TRATAMENTOS	AUXINAS (mg.L <sup>-1</sup> )		CITOCININAS (mg.L <sup>-1</sup> )		ÁPICE			FOLHA	PECÍOLO
	AIA	ANA	BAP	TDZ	Nº médio de raízes por explante	Nº médio de brotos por explante	Regeneração (%)	Nº médio de raízes por explante	Nº médio de raízes por explante
1	0	0	0	0	0c	0,5c	0	0c	0c
2	3	0	0	0	0c	0,7c	0	0c	0c
3	6	0	0	0	0c	0,6c	0	0c	0c
4	0	3	0	0	1,9b	0,5c	50	1,4b	1,7b
5	0	6	0	0	5,3a	0,7c	70	3,4a	4,1a
6	0	0	5	0	0c	2,8a	0	0c	0c
7	3	0	5	0	0c	2,7a	0	0c	0c
8	6	0	5	0	0c	2,4a	0	0c	0c
9	0	3	5	0	1,7b	2,6a	100	1,0b	1,6b
10	0	6	5	0	4,8a	2,8a	100	3,9a	4,3a
11	0	0	10	0	0c	2,6a	0	0c	0c
12	3	0	10	0	0c	2,8a	0	0c	0c
13	6	0	10	0	0c	2,2a	0	0c	0c
14	0	3	10	0	2,2b	2,6a	100	1,1b	1,6b
15	0	6	10	0	5,2a	2,7a	100	4,1a	3,9a
16	0	0	0	5	0c	1,2b	0	0c	0c
17	3	0	0	5	0c	1,1b	0	0c	0c
18	6	0	0	5	0c	1,4b	0	0c	0c
19	0	3	0	5	1,7b	1,2b	100	1,3b	1,9b
20	0	6	0	5	5,0a	1,3b	100	4,0a	3,8a
21	0	0	0	10	0c	1,5b	0	0c	0c
22	3	0	0	10	0c	1,3b	0	0c	0c
23	6	0	0	10	0c	1,4b	0	0c	0c
24	0	3	0	10	1,8b	1,3b	100	1,8b	1,8b
25	0	6	0	10	5,1a	1,3b	100	3,5a	4,5a

**Obs:** Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

## 5.2 Breu branco

### Estabelecimento *in vitro*

Como mostra a figura 6, nos tratamentos 1 e 2, que não continham agentes bactericidas, a contaminação por bactérias se manteve acima de 82%. As taxas de contaminação por bactérias no tratamento 3 ficaram acima de 51% em todos os explantes, evidenciando a parcial ação do clorafenicol na descontaminação superficial dos explantes. O tratamento 4 obteve as menores taxas de contaminação por bactérias, reduzindo a zero sua incidência nas folhas, 6% e 8% nos ápices e pecíolos respectivamente, este resultado mostra que a utilização de ampicilina se mostrou eficiente na descontaminação dos explantes.

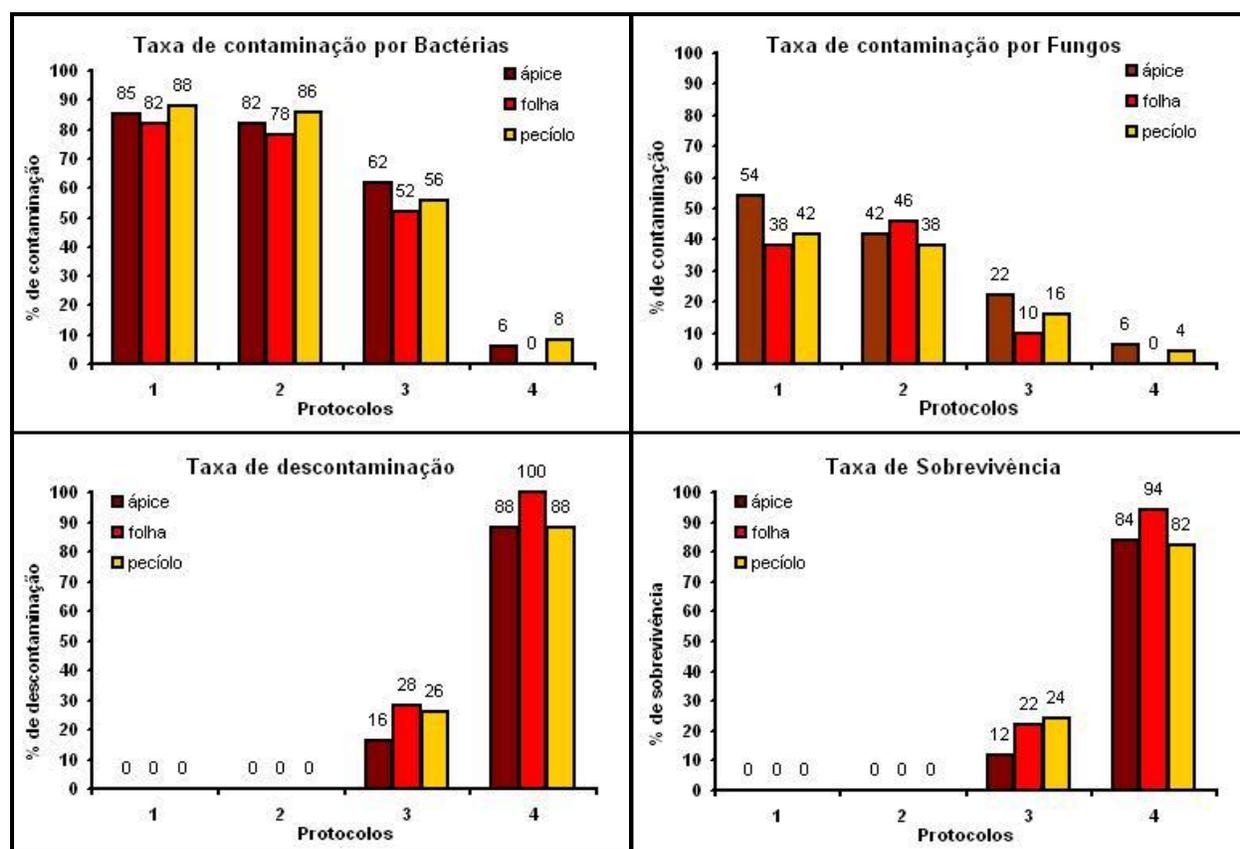
No tratamento 1 a taxa de contaminação por fungos se manteve acima de 37% (Fig. 6). A concentração de derosal na solução descontaminante mostrou relação direta com a diminuição da incidência de fungos nos explantes, fato comprovado pela redução na contaminação por fungos apresentada pelos tratamentos 2, 3 e 4, que continham  $5\text{ml.L}^{-1}$  de derosal em comparação com o tratamento 1 que continha  $2\text{ml.L}^{-1}$ . As menores taxas de contaminação foram obtidas pela aplicação do tratamento 4 onde a contaminação fúngica foi reduzida a zero.

A taxa de descontaminação mostrada na figura 6 mostra os resultados de contaminação por bactérias e fungos e mostra a porcentagem de explantes livres de contaminação. O tratamento 1 não promoveu a descontaminação superficial de nenhum explante, seguido do tratamento 2 que obteve 27% de descontaminação de pecíolos, o tratamento 3 obteve valores intermediários entre 56% e 69% para folhas e ápices respectivamente, e o tratamento 4 possibilitou o estabelecimento satisfatório dos explantes de breu branco, com valores de 84%, 88% e 100% para pecíolos, ápices e folhas respectivamente.

A resistência do tecido dos explantes aos protocolos de assepsia é indicada pela taxa de descontaminação mostrada na figura 6. Onde se observa que os tratamentos 1 e 2 não promoveram descontaminação de nenhum explante, observa-se também que

as taxas obtidas pelo tratamento 3 não ultrapassaram 28%. O tratamento 4 promoveu 100% de descontaminação nas folhas e 88% nos pecíolos e folhas.

A ocorrência de mortalidade dos explantes ocasionada pela oxidação pode ser vista ao se comparar a diferença entre os valores obtidos nas taxas de descontaminação e taxa de sobrevivência mostrada na figura 6. Observa-se que o tratamento 3 e 4 promoveram igualmente a morte de 4% dos ápices, 6% das folhas e 2% dos pecíolos.



**Figura 6:** Índices percentuais de contaminação por fungos, bactérias, descontaminação e sobrevivência de ápices, folhas e pecíolos de breu branco (*Protium spruceanum*) tratadas com 4 diferentes protocolos de assepsia, avaliadas aos 15 dias.

### Regeneração *in vitro*

Como mostra a Tabela 3, as respostas dos ápices, folhas e pecíolos de breu branco foram significantes para o fator auxina na emissão de raízes a um nível de 1%

pelo teste de tukey. Os fatores citocinina e a interação auxina x citocinina não obteve significância. Da mesma forma a utilização de citocininas. A aplicação exógena de citocininas não apresentou significância a um nível de 1% pelo teste de tukey para a emissão de brotos nos ápices, de forma semelhante o fator auxinas x citocininas não obtiveram significancia. Não foi observada a emissão de brotos nas folhas e nos pecíolos após 30 dias.

**Tabela 3:** Resumo da análise de variância para as médias do número de raízes e brotos em ápices caulinares, folhas e pecíolos de breu branco (*Protium spruceanum*) cultivados *in vitro*, em função do efeito diferentes concentrações de ANA, AIA, BAP e TDZ após 30 dias.

	ÁPICE			FOLHA			PECÍOLO		
	Fator	GL	Teste F	Fator	GL	Teste F	Fator	GL	Teste F
<b>Raiz</b>	Auxina	4	19,35**	Auxina	4	10,65**	Auxina	4	7,43**
	Citocinina	4	0,00NS	Citocinina	4	0,01NS	Citocinina	4	0,00NS
	Aux x Cit	16	0,00 NS	Aux x Cit	16	0,02NS	Aux x Cit	16	0,03NS
<b>CV (%)</b>	26,05			32,04			36,56		
<b>D. Padrão</b>	0,17			0,18			0,18		
<b>Broto</b>	Auxina	4	0,06NS	Auxina	4	0	Auxina	4	0
	Citocinina	4	0,04NS	Citocinina	4	0	Citocinina	4	0
	Aux x Cit	16	0,06NS	Aux x Cit	16	0	Aux x Cit	16	0
<b>CV (%)</b>	59,78			0			0		
<b>D. Padrão</b>	0,40			0			0		

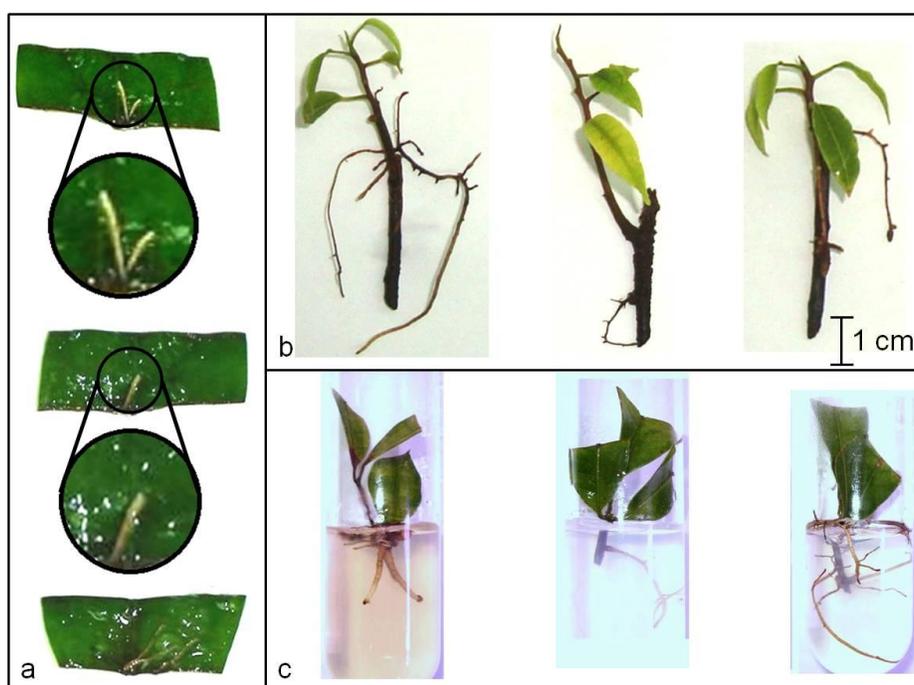
GL - grau de liberdade; CV – Coeficiente de Variação; NS - Não significativo

\*\* = 1% de significância pelo teste de Tukey.

As médias de número de raízes por explante apresentadas na tabela 4 mostram que as doses de ANA 6mg.L<sup>-1</sup> (tratamentos 5, 10, 15, 20, e 25) e 3mg.L<sup>-1</sup> (tratamentos 4, 9, 14, 19, e 24) foram as únicas que promoveram o enraizamento dos explantes como pode ser visto na figura 7b. Não houve diferença significativa entre as médias dessas doses, que obtiveram valores entre 1,7 e 2,0 raízes por explante. O número médio de brotos por explante variou entre 0,4 e 0,7 em todos os tratamentos, e não houve diferença significativa entre eles, este resultado indica que os ápices de breu branco possuem capacidade de emitir brotos, independentemente do uso de

reguladores de crescimento (Fig. 7b). Os reguladores de crescimento utilizados neste estudo não apresentaram efeito sobre a emissão de brotos nos ápices desta espécie. As taxas de regeneração ficaram limitadas aos tratamentos que enraizaram com ANA e variaram entre 50 e 70% sem diferença significativa entre si.

Nas folhas (Fig. 7a), o número médio de raízes por explante apresentou resposta semelhante a dos ápices, assim como os pecíolos (Fig. 7c), ambos enraizaram na presença de ANA independentemente das concentrações, com médias que variaram entre 1,3 e 15 para as folhas e 0,9 a 1,3 raízes por explante para os pecíolos, que, como foi citado anteriormente não regeneraram.



**Figura 7:** Explantes de breu branco (*Protium spruceanum*) estabelecidos *in vitro* em meio MS e tratados com auxinas e citocininas sendo: a – segmentos de folha enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ); b - ápices regenerados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ) e BAP ( $10\text{mg.L}^{-1}$ ); c - pecíolos enraizados *in vitro* com ANA ( $6,0\text{mg.L}^{-1}$ ).

### Aclimatização

Sob as condições testadas neste trabalho nenhum explante de breu branco sobreviveu após cinco dias devido ao ressecamento dos tecidos.

**Tabela 4:** Porcentagem de regeneração *in vitro* de ápices caulinares e número de raízes por explante em ápices folhas e pecíolos de breu branco (*Protium spruceanum*) cultivados *in vitro*, tratados AIA, ANA, BAP e TDZ, após 30 dias.

TRATAMENTOS	AUXINAS (mg.L <sup>-1</sup> )		CITOCININAS (mg.L <sup>-1</sup> )		ÁPICE			FOLHA	PECÍOLO
	AIA	ANA	BAP	TDZ	Nº médio de raízes por explante	Nº médio de brotos por explante	Regeneração (%)	Nº médio de raízes por explante	Nº médio de raízes por explante
1	0	0	0	0	0b	0,7a	0	0b	0b
2	3	0	0	0	0b	0,6a	0	0b	0b
3	6	0	0	0	0b	0,6a	0	0b	0b
4	0	3	0	0	1,8a	0,5a	50	1,5a	1,2a
5	0	6	0	0	1,7a	0,6a	60	1,3a	1,0a
6	0	0	5	0	0b	0,4a	0	0b	0b
7	3	0	5	0	0b	0,6a	0	0b	0b
8	6	0	5	0	0b	0,7a	0	0b	0b
9	0	3	5	0	1,9a	0,6a	60	1,4a	1,3a
10	0	6	5	0	2,0a	0,6a	60	1,3a	1,0a
11	0	0	10	0	0b	0,7a	0	0b	0b
12	3	0	10	0	0b	0,6a	0	0b	0b
13	6	0	10	0	0b	0,5a	0	0b	0b
14	0	3	10	0	1,7a	0,6a	60	1,3a	1,1a
15	0	6	10	0	1,9a	0,6a	70	1,2a	1,2a
16	0	0	0	5	0b	0,7a	0	0b	0b
17	3	0	0	5	0b	0,5a	0	0b	0b
18	6	0	0	5	0b	0,7a	0	0b	0b
19	0	3	0	5	1,8a	0,5a	50	1,5a	0,9a
20	0	6	0	5	2,0a	0,6a	60	1,3a	1,3a
21	0	0	0	10	0b	0,5a	0	0b	0b
22	3	0	0	10	0b	0,4a	0	0b	0b
23	6	0	0	10	0b	0,4a	0	0b	0b
24	0	3	0	10	1,9a	0,5a	50	1,6a	1,3a
25	0	6	0	10	1,9a	0,7a	70	1,4a	0,9a

**Obs:** Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

### 5.3 Pau rosa

#### **Estabelecimento *in vitro***

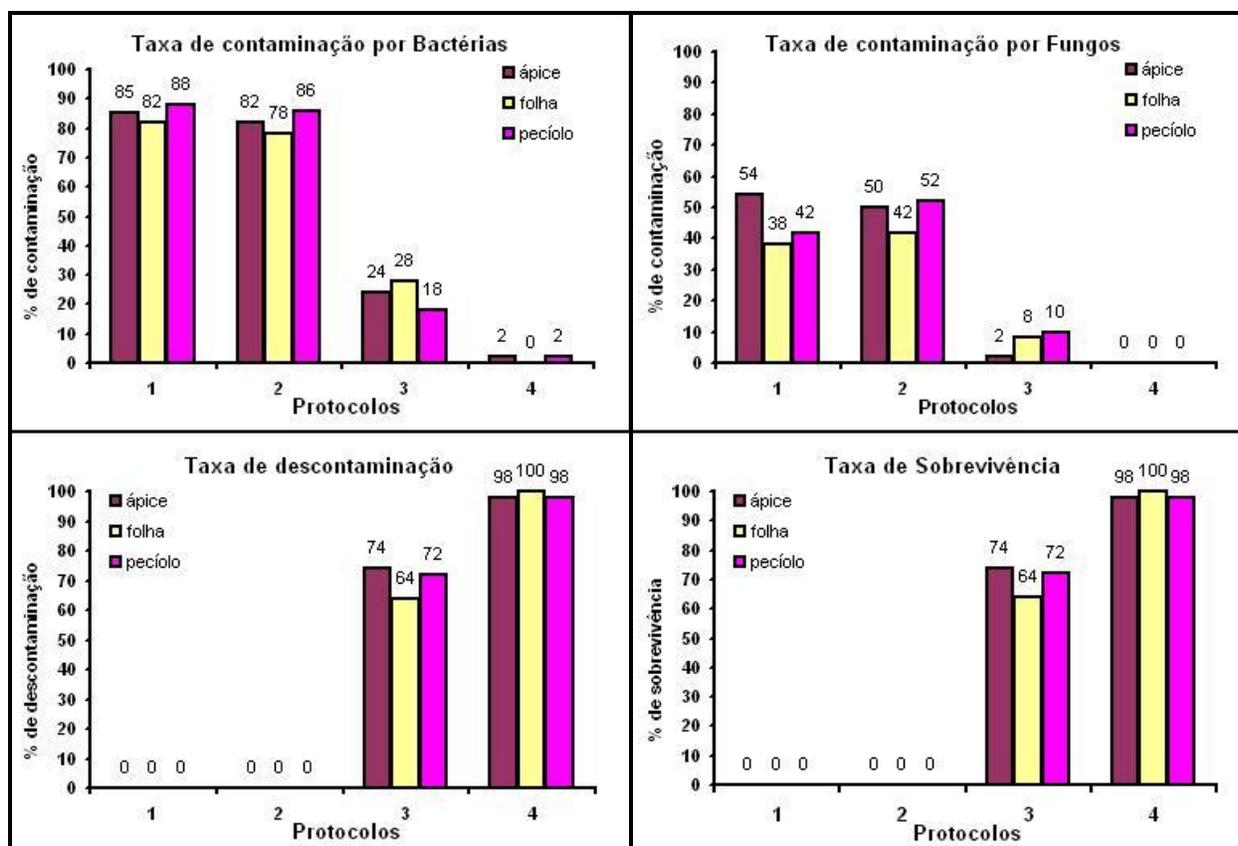
Pela análise da taxa de contaminação por fungos e taxa de contaminação por bactérias apresentada na figura 8 é possível observar que a ausência de agentes bactericidas nos tratamentos 1 e 2 permitiu a incidência de taxas de contaminação por bactérias acima de 77%, e taxa de contaminação por fungos acima de 37% em todos os explantes.

As taxas de contaminação por fungos e bactérias foram reduzidas pelo tratamento 3, que obteve taxa abaixo de 29% e contaminação fúngica menor que 11% em todos os explantes. O tratamento 4 possibilitou o estabelecimento *in vitro* de todos os explantes em taxas de contaminação inferiores a 3%, chegando a zero nas folhas.

Pela comparação da taxa de descontaminação e taxa de sobrevivência apresentada na figura 8 é possível observar que os tratamentos não se mostraram agressivos aos tecidos de nenhum explante, portanto, não houve morte observada por oxidação nos tratamentos 3 e 4. Os tratamentos 1 e 2 não promoveram a descontaminação de nenhum explante.

Os resultados comprovaram a eficiência da aplicação do protocolo 4 (Fig. 8). As taxas de contaminação por fungos, contaminação por bactérias, taxa de descontaminação, e taxa de sobrevivência obtidas pela aplicação deste tratamento apresentaram valores satisfatórios e propiciaram o estabelecimento *in vitro* de todos os explantes em até 100% como no caso das folhas.

Alguma perda é sempre considerada por fatores ligados, na maioria das vezes, na seleção do explante, que é selecionado de partes com pouca maturidade e sofrem agressão dos agentes descontaminantes, principalmente durante a aplicação de hipoclorito de sódio, que provoca rapidamente a oxidação das extremidades dos explantes, essa oxidação é retirada antes da inoculação como uma última ação na confecção do explante.



**Figura 8:** Índices percentuais de contaminação por fungos, bactérias, descontaminação e sobrevivência de ápices, folhas e pecíolos de pau rosa (*Aniba rosaeodora*) tratadas com 4 diferentes protocolos de assepsia, avaliadas aos 15 dias.

### Regeneração *in vitro*

O resumo das análises de variância apresentado na Tabela 5 mostra que a aplicação exógena de auxinas obteve significância a um nível de 1% pelo teste de tukey no enraizamento dos explantes de pau-rosa. O fator citocinina e a interação auxina x citocinina não foram significantes no enraizamento dos explantes.

Na indução da formação de brotos, os ápices foram os únicos explantes que responderam positivamente, apresentando 1% de significância pelo teste de tukey. Até os 30 dias não foi observada nenhuma formação de brotos nas folhas e pecíolos desta espécie.

**Tabela 5:** Resumo da análise de variância para as médias do número de raízes e brotos em ápices caulinares, folhas e pecíolos de pau rosa (*Aniba rosaeodora*) cultivados *in vitro*, em função do efeito diferentes concentrações de ANA, AIA, BAP e TDZ após 30 dias.

	ÁPICE			FOLHA			PECÍOLO		
	Fator	GL	Teste F	Fator	GL	Teste F	Fator	GL	Teste F
<b>Raiz</b>	Auxina	4	<b>18,46**</b>	Auxina	4	<b>48,90**</b>	Auxina	4	<b>28,40**</b>
	Citocinina	4	0,07NS	Citocinina	4	0,02NS	Citocinina	4	0,02NS
	Aux x Cit	16	1,20NS	Aux x Cit	16	0,01NS	Aux x Cit	16	0,01NS
<b>CV (%)</b>	43,27			16,72			33,50		
<b>D. Padrão</b>	0,36			0,15			0,24		
<b>Broto</b>	Auxina	4	0,10NS	Auxina	4	0	Auxina	4	0
	Citocinina	4	<b>4,48**</b>	Citocinina	4	0	Citocinina	4	0
	Aux x Cit	16	0,03NS	Aux x Cit	16	0	Aux x Cit	16	0
<b>CV (%)</b>	38,53			0			0		
<b>D. Padrão</b>	0,43			0			0		

GL - grau de liberdade; CV – Coeficiente de Variação; NS - Não significativo

\*\* = 1% de significância pelo teste de Tukey.

A suplementação com  $6\text{mg.L}^{-1}$  de ANA obteve as maiores médias de número de raízes por explante nos ápices, entre 3,0 e 3,5, este resultado se observa nos tratamentos 5, 10, 15, 20, e 25 mostrados na tabela 6, seguido pelos tratamentos 4, 9, 14, 19 e 24, suplementados com  $3\text{mg.L}^{-1}$  de ANA. Os demais tratamentos apresentaram menores médias, entre 0,2 e 0,5 raízes por explante.

Os ápices também apresentaram diferentes valores médios na emissão de brotos (Tab. 6). As maiores médias foram obtidas nos tratamentos 11, 12, 13, 14, e 15, com  $10\text{mg.L}^{-1}$  de BAP, com valores entre 2,2 e 2,6 brotos por explante, seguido dos tratamentos 6, 7, 8, 9, e 10 com médias entre 1,3 e 1,8 brotos por explante. Os demais tratamentos apresentaram menores médias, inclusive no tratamento testemunha, onde se obteve 1 broto por explante, este resultado não diferenciou das médias obtidas nos tratamentos com AIA, o que indica que as doses de AIA utilizadas neste estudo não surtiram efeito sobre a brotação dos ápices de pau rosa.

As maiores porcentagens de regeneração foram obtidas nos tratamentos 10 e 15, 100%. O tratamento 9 obteve 80% de regeneração, seguido pelos tratamentos 25,

20 e 14. Os tratamentos 4 e 5 apresentaram 60% de regeneração e os demais tratamentos apresentaram índices percentuais de regeneração abaixo de 60%.

O número médio de raízes por explante nas folhas e nos pecíolos foi maior nos tratamentos 5, 10, 15, 20, e 25 com  $6\text{mg.L}^{-1}$  de ANA ficando entre 5,7 e 6,2 nas folhas e 3,5 e 4,0 nos pecíolos. Da mesma forma, as médias dos tratamentos 4, 9, 14, 19 e 24, suplementados com  $3\text{mg.L}^{-1}$  de ANA, obtiveram médias entre 0,9 e 1,3 como menores médias de brotação. Nos demais tratamentos não foi observada a emissão de raízes aos 30 dias. Os padrões de enraizamento de folhas e pecíolos podem ser vistos na figura 9b e 9c respectivamente, a figura 9a mostra um ápice de pau-rosa regenerado *in vitro*.



**Figura 9:** Explantes de pau rosa (*Aniba rosaeodora*) estabelecidos *in vitro* em meio MS e tratados com auxinas e citocininas sendo: a – ápices regenerados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ) e BAP ( $10\text{mg.L}^{-1}$ ); b - segmentos de folha enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ); c - pecíolos enraizados *in vitro* com ANA ( $6\text{mg.L}^{-1}$ ).

### Aclimatização

Os tratamentos testados na aclimatização dos explantes de pau rosa não apresentaram resposta positiva. Foi observada a morte dos explantes por ressecamento após sete dias.

**Tabela 6:** Porcentagem de regeneração *in vitro* de ápices caulinares e número de raízes por explante em folhas e pecíolos de pau rosa (*Aniba rosaeodora*) cultivados *in vitro*, tratados com doses simples e combinadas dos reguladores de crescimento: AIA, ANA, BAP e TDZ após 30 dias.

TRATAMENTOS	AUXINAS (mg.L <sup>-1</sup> )		CITOCININAS (mg.L <sup>-1</sup> )		ÁPICE			FOLHA	PECÍOLO
	AIA	ANA	BAP	TDZ	Nº médio de raízes por explante	Nº médio de brotos por explante	Regeneração (%)	Nº médio de raízes por explante	Nº médio de raízes por explante
1	0	0	0	0	0,5c	1,0c	20	0c	0c
2	3	0	0	0	0,4c	0,9c	20	0c	0c
3	6	0	0	0	0,3c	1,1c	20	0c	0c
4	0	3	0	0	1,4b	0,8c	60	1,9b	0,9b
5	0	6	0	0	3,0a	0,9c	60	5,7a	4,0a
6	0	0	5	0	0,2c	1,6b	20	0c	0c
7	3	0	5	0	0,2c	1,5b	20	0c	0c
8	6	0	5	0	0,3c	1,8b	30	0c	0c
9	0	3	5	0	1,0b	1,6b	80	1,6b	1,3b
10	0	6	5	0	3,4a	1,3b	100	5,7a	3,8a
11	0	0	10	0	0,2c	2,2a	20	0c	0c
12	3	0	10	0	0,4c	2,5a	40	0c	0c
13	6	0	10	0	0,2c	2,4a	20	0c	0c
14	0	3	10	0	1,1b	2,4a	70	2,0b	1,1b
15	0	6	10	0	3,5a	2,6a	100	5,6a	3,7a
16	0	0	0	5	0,3c	0,9c	30	0c	0c
17	3	0	0	5	0,1c	1,0c	10	0c	0c
18	6	0	0	5	0,2c	1,2c	20	0c	0c
19	0	3	0	5	1,4b	1,0c	50	2,1b	1,2b
20	0	6	0	5	3,2a	0,9c	70	6,1a	3,6a
21	0	0	0	10	0,2c	1,2c	20	0c	0c
22	3	0	0	10	0,2c	1,1c	0	0c	0c
23	6	0	0	10	0,3c	1,3c	20	0c	0c
24	0	3	0	10	1,2b	1,0c	50	1,8b	1,0b
25	0	6	0	10	3,4a	1,1c	70	6,2a	3,5a

**Obs:** Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

## 5.4 Copaíba

### **Estabelecimento *in vitro***

O estabelecimento *in vitro* de nenhum ápice, folha e pecíolo de copaíba (*Copaifera multijuga*) foi possível com os 4 protocolos de assepsia aplicados neste estudo. Outros protocolos de assepsia foram testados, mas sem sucesso. O quadro 4 mostra detalhadamente todas as tentativas de se estabelecer esta espécie *in vitro* que foram testadas neste estudo.

**Quadro 4:** Tratamentos testados no estabelecimento *in vitro* de ápices, folhas, pecíolos, embriões e sementes de copaíba (*Copaifera multijuga*).

<b>Data</b>	<b>Protocolo de assepsia</b>	<b>Número e tipo de explantes</b>	<b>Contaminação por fungos (%)</b>	<b>Contaminação por bactérias (%)</b>	<b>Sobrevivência após 7 dias (%)</b>
04/04/2010	2h benomyl 2g.l <sup>-1</sup> e 15min NaOCl 0,85%	20 Ápices	100	0	0
05/04/2007	4h benomyl 2g.l <sup>-1</sup> e 15 min NaOCl 0,85%	20 Folhas	100	0	0
	4h benomyl 2g.l <sup>-1</sup> e 15min NaOCl 0,85%	20 Pecíolos	100	0	0
11/04/2007	24h benomyl 4g.l <sup>-1</sup> e 20min NaOCl 0,85%	50 Ápices	78	22	0
12/04/2007	24h benomyl 4g.l <sup>-1</sup> e 20min NaOCl 0,85%	50 Folhas	30	70	0
	24h benomyl 4g.l <sup>-1</sup> e 20min NaOCl 0,85%	50 Pecíolos	28	72	0
18/04/2007	48h benomyl 4g.l <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Ápices	86	14	0
19/04/2007	48h benomyl 4g.l <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Folhas	66	34	0
20/04/2007	48h benomyl 4g.l <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Pecíolos	98	2	0
02/05/2007	48h benomyl 5g.l <sup>-1</sup> + Ampicilina 500mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Ápices	72	28	0
03/05/2007	48h benomyl 5g.l <sup>-1</sup> + Ampicilina 500mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Folhas	56	44	0
	48h benomyl 5g.l <sup>-1</sup> + Ampicilina 500mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Pecíolos	32	68	0
10/05/2007	48h benomyl 5g.l <sup>-1</sup> + clorafenicol 500mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Ápices	80	20	0
19/05/2007	48h benomyl 5g.l <sup>-1</sup> + clorafenicol 500mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Folhas	46	54	0
	48h benomyl 5g.l <sup>-1</sup> + clorafenicol 500mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Pecíolos	36	64	0
13/06/2007	48h derosal 5ml.l <sup>-1</sup> + cloraf 500mg.L <sup>-1</sup> + Amp. 500mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Ápices	86	14	0
14/06/2007	48h derosal 5ml.l <sup>-1</sup> + cloraf 500mg.L <sup>-1</sup> + Amp. 500 mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Folhas	50	50	0
15/06/2007	48h derosal 5ml.l <sup>-1</sup> + cloraf 500mg.L <sup>-1</sup> + Amp. 500mg.L <sup>-1</sup> e 30min NaOCl 0,85%	50 Pecíolos	26	64	0
14/07/2010	30 min em NaOCl 2,5% e 2min alcool 70%	40 sementes	100	0	0
15/07/2010	30 min em NaOCl 2,5% e 2min alcool 70%	40 sementes	100	0	0
16/07/2010	30 min em NaOCl 2,5% e 2min alcool 70%	40 embriões	30	0	0

## 6. Discussão

### 6.1 Estabelecimento *in vitro*

Uma importante questão no estabelecimento *in vitro* de material propagativo oriundo de viveiro é a sobrevivência dos explantes em função do tempo e concentração dos agentes desinfestantes (Barrueto e Zimmermann, 2006). A utilização de explantes obtidos de mudas produzidas em casa de vegetação é uma forma bastante viável de se iniciar o cultivo *in vitro*, mas se faz necessária à utilização de protocolos de assepsia mais fortes, em virtude da maior incidência de microorganismos nas condições de viveiro (*ex vitro*). As mudas que serviram de fontes de explantes neste estudo ficaram em uma área coberta, pois, nos primeiros ensaios, altas taxas de contaminação foram observadas, em virtude das mudas ficarem expostas à chuva.

Neste estudo se fez necessária a utilização explantes de porções mais maduras das mudas, que apresentavam coloração verde mais escura. Observou-se que os explantes confeccionados com porções mais jovens, de coloração verde clara, apresentaram baixa resistência nos testes preliminares de estabelecimento *in vitro*. Recomenda-se a realização desses testes a fim de se definir o grau de maturidade ideal dos explantes de uma espécie que se quer estabelecer *in vitro*.

O tempo de contato dos explantes com os agentes descontaminantes apresentou uma resposta direta nas taxas de contaminação por microorganismos, pois o aumento do tempo possibilitou uma maior absorção dos agentes químicos. A aplicação de tween foi um passo importante neste momento, pois ele age como um sabão biológico que diminui tensão superficial da parede celular dos explantes, isso permitiu uma maior absorção dos agentes químicos desinfestantes (Holmberg, 2001).

A concentração de um determinado agente, como o hipoclorito de sódio, pode promover um maior estabelecimento dos explantes por meio de uma maior redução da contaminação. Mas pode promover também a oxidação de compostos presentes nos tecidos dos explantes conhecidos como fenóis, flavonóides e taninos (Preece e Compton, 1991), essa oxidação pode ocasionar perdas no material e inviabilizar a continuidade dos trabalhos. Para a retirada destes

compostos oxidáveis Grattapaglia & Machado (1998) recomendam a lavagem em água corrente e uma fase de escuro para os explantes. Davies (1972), afirma que as enzimas de biossíntese de fenóis e sua consequente oxidação têm as atividades incrementadas pela luz. Melo *et al.*, (2001) conseguiram reduzir em 9,94% a oxidação de embriões de *Syagrus oleracea* com a utilização de uma fase de escuro. A suplementação no meio de cultura com ácido ascórbico e carvão ativado também são bastante utilizadas na redução da oxidação, no entanto, se sabe que estes antioxidantes reagem com os reguladores de crescimento reduzindo a sua concentração segundo Preece e Compton, (1991).

A baixa ocorrência de morte dos explantes por oxidação ou exudação neste trabalho se deve a sistematização da seleção de explantes em função do grau de maturidade. Ressaltando que todos os explantes foram obtidos de mudas. De acordo com Preece e Compton, (1991), a principal causa da mortalidade dos explantes é a oxidação, sendo este o principal fator limitante do estabelecimento *in vitro* de plantas.

A utilização de antibióticos na solução descontaminante foi necessária em virtude das altas taxas de contaminação bacteriana. Reed e Tanpraset, (1995) recomendam a utilização de ampicilina em doses entre 100 mg.L<sup>-1</sup> e 500 mg.L<sup>-1</sup> na descontaminação superficial de explantes para o estabelecimento *in vitro*, pois a ampicilina age em uma grande variedade de bactérias inibindo a síntese de β-lactamases, e possui baixa toxicidade. Handa *et al.*, (2005), promoveram o estabelecimento *in vitro* de 18% dos explantes de *Aniba rosaeodora* com a utilização de 300mg.L<sup>-1</sup> de ampicilina e 300mg.L<sup>-1</sup> de agrimicina em bomba a vácuo.

O uso de fungicidas é comum em praticamente todos os protocolos de assepsia de material oriundo de condições *ex vitro*. O derosal está no grupo dos fungicidas benzimidazóis, e possui um amplo espectro de ação (Bergamin *et al.*, 2005). A utilização de derosal se mostrou bastante eficaz na redução da incidência de fungos nos explantes testados neste estudo. Nagao *et al.*, (2009), estabeleceram *in vitro* 71% dos explantes de *Ampelozizyphus amazônicus* utilizando derosal 0,1% sob agitação de 100rpm em seu protocolo de

descontaminação. Cardoso, (2010) obteve taxas de descontaminação de 85,2% em explantes de *Elais guianensis* por meio da aplicação de derosal 0,2%.

Apesar de existir variação no nível de contaminação entre os tecidos das mudas acredita-se que seja possível obter altas taxas de sobrevivência testando o efeito de outras soluções descontaminantes sobre o estabelecimento *in vitro* de *Aniba rosaeodora*, *Carapa guianensis*, *Protium spruceanum* e *Copaifera multijuga*, com a possibilidade de se estabelecer explantes oriundos de porções mais juvenis que as utilizadas neste estudo, isso aumentaria as chances de se obterem melhores respostas na fase de organogênese.

Vale ressaltar que, de acordo com Assis e Teixeira (1998), o estabelecimento é uma fase crítica na propagação *in vitro* de espécies lenhosas, e, a utilização de antibiótico e fungicida, aumenta os custos e pode também causar mutações nos explantes (Erig e Schuch, 2003), mas sua utilização é limitada apenas a esta fase. Após o estabelecimento, a manipulação do material em câmara de fluxo laminar descarta o uso de protocolos de assepsia.

Dessa forma, a correta dosagem dos agentes químicos que compuseram os protocolos de assepsia, e a escolha de explantes maduros mais resistentes à assepsia, são os principais fatores que influenciaram os resultados obtidos no estabelecimento *in vitro* das espécies estudadas neste trabalho. Mesmo sabendo que é mais recomendada, a utilização de explantes mais jovens por possuírem atividade metabólica mais intensa e maior concentração hormonal (Skoog e Miller, 1957).

Apesar de inúmeras tentativas, o estabelecimento de explantes de *Copaifera multijuga* foi inviabilizado pelas altas taxas de contaminação apresentadas pelos explantes. Atribui-se este insucesso a uma possível relação simbiótica com microorganismos (Lacava *et al.*, 2008). Portanto, as condições testadas neste trabalho não propiciaram a descontaminação superficial dos explantes, e, conseqüentemente, nenhum explante foi estabelecido *in vitro*.

Em casos como o do abacaxizeiro (Tarazi, 2010), a presença de bactérias não apresentou efeitos negativos, em outros, a inoculação de microorganismos pode ser utilizada na indução do crescimento vegetal *in vitro* (Hallmann *et al.*,

1997; Dias *et al.*, 2009). Sua presença simbiótica nas raízes das leguminosas auxilia na fixação de nitrogênio (Dobereiner, 1997; Texeira, 2007). Acredita-se que possam existir estreitas relações simbióticas entre espécies florestais de clima tropical úmido e microorganismos. Medeiros (1999) afirma que, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação, são fontes potenciais de microorganismos, que podem se tornar limitantes no cultivo *in vitro*.

## **6.2 Regeneração *in vitro***

As respostas morfogenéticas obtidas pela aplicação exógena de auxinas e citocininas comprovaram que cada tipo de explante apresenta resposta em intensidade diferente. Esta resposta provavelmente está relacionada com gradiente interno de reguladores de crescimento, pois se sabe que, esse gradiente varia nos tecidos das plantas, principalmente em função da maturidade. Dessa forma, tecidos mais jovens, como os utilizados neste estudo, possuem maiores quantidades de reguladores de crescimento endógenos, e, conseqüentemente, maiores chances de responderem aos estímulos gerados pela sua aplicação exógena (Bottino, 1981; Hartman e Kester, 1983; Kerbauy, 1997; Barrueto, 2000).

Outro fator importante na obtenção de respostas morfogenéticas *in vitro* é o grau de determinação dos tecidos (Hartman e Kester, 1983). Regiões que apresentam tecidos meristemáticos, como os ápices caulinares utilizados neste estudo, apresentam menor grau de determinação e podem ser diferenciados por meio de aplicação exógena de reguladores de crescimento (Peres, 2002).

Tecidos diferenciados como folhas e pecíolos já passaram pelo processo de diferenciação celular, e a sua indução para respostas morfogenéticas requer estímulos mais intensos, e, geralmente, ocorre primeiro a formação de calos via organogênese indireta (Hu e Wang, 1984; Paqual, 1985; Pierik, 1990; Kerbauy, 1999). Apesar de ter ocorrido alguma formação de calos nos explantes testados neste estudo, esta não foi analisada em virtude de se tratar de experimentos objetivando a organogênese *in vitro* de forma direta. A obtenção de calos altera as fases pré-estabelecidas para este estudo, se tornando um fator indesejável.

Ponte (1999) e Coelho (1999), relatam que o uso de concentrações de BAP entre  $1\text{mg.L}^{-1}$  e  $5\text{mg.L}^{-1}$  no meio de cultura tem sido indicado para espécies lenhosas, como *Eucalyptus globulus* e *Pterodon pubescens*, pois, segundo Grattapaglia e Machado, (1990), as quantidades necessárias destas substâncias variam de acordo com o tecido utilizado e com seus níveis endógenos. Brum *et al.*, (2002), obtiveram médias de 7cm de comprimento de raízes em explantes de *Ficus carica* com a utilização de  $4\text{mg.L}^{-1}$  de BAP. Nicoloso *et al.*, (2006), ao utilizarem apenas o BAP para a micropropagação de segmentos caulinares de *Apuleia leiocarpa*, obtiveram um grande número de brotos. Neste estudo o BAP se mostrou bastante promissor na indução de brotações.

O tidiazuron aparece em trabalhos com bons resultados na indução de brotações (Lu, 1993; Sakakibara, 2006). Neste estudo sua aplicação apresentou valores medianos quando comparado com os valores obtidos com BAP. Nas folhas e pecíolos das espécies testadas neste trabalho, o TDZ possivelmente não influenciou a emissão de brotos, mas nos ápices de *Aniba rosaeodora* e *Carapa guianensis* sim, mas sem diferença entre as doses utilizadas. Doses de TDZ até  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  influenciaram positivamente a emissão de brotos em pecíolos de *Albizia odoratissima*, e doses superiores a  $2,5\text{mg.L}^{-1}$ , apresentaram resultado negativo, ou seja, inibição das brotações (Rajeswari e Paliwal, 2006).

Algumas vezes a aplicação exógena pode ocasionar o efeito negativo, ou seja, a inibição de respostas morfogênicas, como no caso de Stein *et al.*, (2007), o BAP em concentrações acima de  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  reduziu o número de brotações em explantes de *Inga vera*, mas sua combinação com ANA, em doses inferiores a  $2,5\text{mg.L}^{-1}$ , promoveu um aumento do número de brotações. Deschamps (1993) observou que as brotações de *Sebastiania schottiana* apresentaram melhor desenvolvimento em meio sem reguladores de crescimento, e que a adição de BAP foi responsável pela redução no número de folhas por explante. Montovani *et al.*, (2001) observaram que a adição de ANA provocou excesso de calosidade, inibindo a proliferação e o desenvolvimento de brotações em explantes de *Cordia trichotoma*. Provavelmente as doses de TDZ utilizadas neste estudo apresentaram efeito semelhante às doses utilizadas nos trabalhos citados acima.

O ANA tem obtido bons resultados na organogênese induzida em experimentos *in vitro*. Lopes *et al.*, (2001), obtiveram percentuais de enraizamento acima de 70% para ápices e brotações de *Swetenia macrophylla* com a utilização de 5,0mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Da mesma forma, Quezada, (2006), obteve números médios de raízes por explante superiores a 4,2 com a suplementação com ANA em explante apicais de macieira. Silva *et al.*, (2010), induziram a regeneração de ápices de *Ceiba pentandra* utilizando BAP e TDZ.

Algumas espécies possuem a capacidade de regenerar sem qualquer adição de reguladores de crescimento, como nos casos da *Aniba rosaeodora* (Sampaio, 1988; Ferraz *et al.*, 2004) e da *Tabebuia serratifolia* (Brandão e Sampaio, 2004). Neste trabalho foi constatado que ápices de *Aniba rosaeodora* possuem a capacidade de emitir raízes adventícias *in vitro* sem qualquer adição de reguladores de crescimento. Esta capacidade se deve a maior atividade metabólica e a maior concentração de hormônios vegetais nas regiões meristemáticas apicais que algumas espécies apresentam (Skoog e Miller, 1957), e, provavelmente, a fatores genéticos ligados a evoluções adaptativas (Santos, 2003).

Tecidos foliares vêm sendo estudados em virtude de sua fácil obtenção e fácil manipulação. Neste estudo não houve completa regeneração *in vitro* dos pecíolos nem das folhas, obteve-se apenas a formação de raízes adventícias nos explantes. Costa e Aloufa, (2006), obtiveram resultados similares ao deste estudo ao conseguirem apenas induzir a emissão de raízes em pecíolos de *Phoenix dactylifera* utilizando BAP e AIA (2mg.L<sup>-1</sup>). Beltrão *et al.*, (2008) obtiveram até 51% de enraizamento de folhas de *Solanum paludosum* utilizando doses combinadas de BAP e ANA. Joshi *et al.*, (2003) obtiveram resultados semelhantes ao deste estudo ao aplicarem doses combinadas de ANA e BAP em explantes foliares de *Eucalyptus tereticornis*.

É mais comum a indução de calos em explantes foliares do que o enraizamento, em virtude da sua maior diferenciação (Pereira, 2000). Trabalhos como os de Sahoo *et al.*, (1997), induziram a formação de calos a partir de explantes foliares de *Morus indica*, Cerqueira, (1999) induziu a formação de calo em segmentos foliares de *Tridax procumbens*. *Copaifera langsdorffii* foi testada

por Azevedo, (2003), e Cavalcante, (2001) estudou a formação de calos em explantes foliares em *Theobroma grandiflorum*. Não foram encontrados trabalhos que enraizaram explantes foliares, Fávero *et al* (2005) enraizaram folhas de pecíolos de *Arachis species* por organogênese direta utilizando ANA.

*Aniba rosaeodora* foi estabelecida *in vitro* por Handa *et al.*, (2005) por meio do cultivo de rebrotas e embriões. Jardim *et al.*, (2010), conseguiram regenerar *Aniba rosaeodora* com ANA ( $3,0\text{mg.L}^{-1}$ ) e BAP ( $4,0\text{mg.L}^{-1}$ ), estes resultados foram importantes para a obtenção dos resultados superiores obtidos neste trabalho. Os autores deste trabalho são também colaboradores de Handa, (2005) e Jardim, (2010). Debergh (1991) definem aclimatização como a etapa compreendida entre a transferência das plântulas das condições assépticas *in vitro* para casa de vegetação. Apesar de fatores como substrato e umidade influenciarem na sobrevivência, o tipo e a qualidade do sistema radicular obtidos no cultivo *in vitro* são os fatores tidos como mais importantes para se obter sucesso na sobrevivência das plântulas nas condições *ex vitro* (Grattapaglia e Machado, 1990). Neste estudo os substratos testados foram elaborados de acordo com a disponibilidade e praticidade na preparação.

Os sistemas radiculares adventícios obtidos neste estudo apresentavam raízes curtas, não maiores que 4cm. Raízes curtas em geral são mais desejáveis, pois, além de facilitarem seu manuseio no momento do plantio, normalmente estão em uma fase de crescimento ativo, o que facilita o pegamento da planta (Grattapaglia e Machado, 1990). Porém é necessário lembrar que outros fatores devem ser observados nesse processo. Assim, além da manutenção da alta umidade durante os primeiros dias de aclimatização, o tipo de substrato, bem como a época do ano, parece influenciar esta variável. (Pereira e Fortes, 2001).

Por este motivo, discutem-se também os efeitos do tempo de permanência das plântulas em meio de enraizamento sobre a percentagem de sobrevivência durante a aclimatização (Dias *et al.*, 2010). Acredita-se que o aumento do tempo de permanência das raízes em meio de cultura pode ocasionar um rápido envelhecimento nas mesmas, tornando-as menos funcionais, e prejudicando a sobrevivência das plantas em casa de vegetação (Grattapaglia e Machado, 1990). Neste estudo todas as plântulas ficaram no meio de enraizamento por 30 dias.

A etapa de aclimatização se mostrou bastante problemática promovendo a morte por ressecamento de todos os explantes em pelo menos 4 dias após a retirada do meio de cultura para todas as espécies, mesmo com a redução do teor de açúcares no meio de cultura, como recomenda Grattapaglia e Machado, (1990). Acredita-se que os substratos utilizados não garantiram a umidade necessária para a sobrevivência dos explantes. Mas nesse etapa, apesar de fatores como substrato e umidade influenciarem na sobrevivência, o tipo e a qualidade do sistema radicular obtidos são importantes para se obter sucesso na sobrevivência (Pereira e Fortes, 2001). Raízes curtas, em geral, são mais desejáveis, pois, além de facilitarem seu manuseio no momento do plantio, normalmente estão em uma fase de crescimento ativo, o que facilita o pegamento da planta (Grattapaglia & Machado, 1990).

Por este motivo, discutem-se também os efeitos do tempo de permanência das brotações em meio de enraizamento sobre a percentagem de sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Sugere-se que o aumento do tempo de permanência das raízes em meio de cultura pode proporcionar um rápido envelhecimento nas mesmas, tornando-as menos funcionais, e prejudicando a sobrevivência das plantas em casa de vegetação (Pereira e Fortes, 2001).

Resultados obtidos anteriormente (dados não publicados) demonstraram que uma permanência mais prolongada das brotações em meio de cultura de enraizamento produziu plântulas com parte aérea bastante desenvolvida. Por terem uma alta razão entre parte aérea e raiz, estas plantas tendem a apresentar problemas de sobrevivência, devido à elevada transpiração, com maiores possibilidades de as plantas sofrerem desidratação durante a aclimatização, principalmente se esta ocorrer nos meses mais quentes do ano (Pereira e Fortes, 2001).

## 7. Recomendações

Sugere-se a realização de um experimento multifatorial que avalie o efeito, do tempo de exposição aos agentes químicos descontaminantes, da concentração de agentes químicos descontaminantes, e da maturidade do explante sobre o estabelecimento *in vitro* de pau rosa, andiroba e breu branco. Tal experimento poderá possibilitar o estabelecimento de explantes mais juvenis que os explantes estabelecidos neste estudo (Barrueto e Zimmermann, 2006).

Recomenda-se o teste de outros agentes descontaminantes no estabelecimento *in vitro* de explantes de *Copaifera multijuga*.

Recomenda-se a aplicação exógena de doses de BAP diferentes das utilizadas neste estudo, e em combinação com outras auxinas como o AIB objetivando induzir a regeneração *in vitro* de *Aniba rosaeodora*, *Carapa guianensis* e *Protium spruceanum*.

Sabe-se que o meio apresenta estreitas influências nos resultados obtidos, por isso recomenda-se também a realização de estudos que utilizem outros meios (como o WPM – Wood Palnt Medium) de cultura suplementados com outros reguladores de crescimento como o AIB (ácido-indol-butírico), em explantes de *Aniba rosaeodora*, *Carapa guianensis*, *Protium spruceanum*.

Recomenda-se ainda a elaboração de substratos que retenham umidade de forma mais eficiente que os substratos utilizados para a aclimatização neste estudo.

## 8. Conclusões

Sob as condições testadas neste estudo é possível concluir:

### **Andiroba, breu branco e pau rosa**

- É viável o estabelecimento *in vitro* de ápices, folhas e pecíolos;
- Ápices caulinares podem ser regenerados *in vitro* por meio da aplicação de reguladores de crescimento;
- Folhas e pecíolos podem ser enraizados *in vitro* por meio da aplicação de reguladores de crescimento;
- A aclimatização de plântulas produzidas por meio de regeneração *in vitro* e de explantes enraizados *in vitro* por meio de organogênese direta não é viável.

### **Copaíba**

- É inviável o estabelecimento *in vitro* por meio de ápices, folhas e pecíolos;

## **9. Agradecimentos**

### **Fontes financiadoras**

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM;
- Rede CTPetro Amazônia;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico – CNPq.

### **Instituições colaboradoras**

- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA;
- Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

## 10. Referências bibliográficas

- Alencar, J.C. e Magalhães, L.M.S. 1978. Produção de sementes de essências nativas em floresta primária na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12 (2): p. 257-262.
- Alencar, J.C.; Almeida, R.A.; Fernandes, N.P. 1979. Fenologia de espécies florestais em floresta tropical úmida de terra firme na Amazônia Central. **Acta Amazônica** 9(1): 163-198.
- Alencar, J.C. 1981. Estudos silviculturais de uma população de *Copaifera Multijuga hayne* (Leguminosae) na Amazônia Central. I. Germinação. **Acta Amazônica**. 11(1), p. 3-11.
- Ammirato, P.V., Steward, F.C. 1971. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. **Botanic Gaz**, 132: p.149-158.
- Ammirato, P.V.; Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Bajaj, Y.P.S. 1990. Handbook of plant cell culture. New York: **Macmillan**, v.5.
- Assis, T.F.; Teixeira, S.L. 1998. Enraizamento de Plantas Lenhosas. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 509p, p.261-296.
- Aublet, F. 1977. Historie des Plantes de La Guiane Francaisi. Vol. **Supl. J. Cramer**. Germany. P. 32-34 (reedição).
- Azevedo, K.S. 2003. Indução e Análises bioquímicas de calo e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.). **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, p.86.
- Barrueto Cid, L.P. 2001. A Propagação *in vitro* de plantas. O que é Isso? **Biociência** **7**(1): 16-21.
- Barrueto Cid, L.P.; Zimmermann, M.J.A. 2006. Contaminação *in vitro* de Plantas. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 20p. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, ISSN 1676-1340; 122.
- Benjamins R.; Scheres B. 2008. Auxin: The looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 59: 443–465.
- Bergamin, A.; Kimat, H.; Amorim, L. 2005. Manual de Fitopatologia. vol.1. ed. Agronômica. **Ceres**. São Paulo-SP.
- Brandão, H.L.M.; Sapaio, P.T.B. 2003. Propagação por estaquia de Pau-d'arco-amarelo (*Tabebuia Serratifolia*), Cajuí (*Anacardium Humile*), Cupiúba (*Goupia Glabra*) E Jacareúba (*Calophillum Brasiliensis*). **Monografia** – Engenharia Florestal - Manaus - AM.
- Brum, G.R. 2001. Micropropagação de Figueira (*Ficus carica* L.) **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. p.41.

Cardoso, J.N.O. 2010. Conversão *In Vitro* de Embriões Zigóticos de Híbridos de Dendezeiro (*Elais guineensis* X *E.Oleifera*). em Plântulas. **Dissertação de Mestrado. Belém-PA. 2010.**

Carruyo, L.I. 1972. *Carapa guianensis* Aublet, suas propriedades y características. In: Simpósio Internacional sobre plantas de Interés Econômico de La Floresta Amazônica. Doc. 95, IICA, **Turrialba**. P. 249-254.

Cassana, F.C; Pinto, L.S; Pohl, S; Bianchi, V.J; Braga, E.J.B; Peters, J.A. 2007. Regeneração de brotos a partir de folhas de Mirtilo cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 870-872.

Coelho, M.C.F. 1999. Germinação de Sementes e Propagação *In Vitro* de Sucupira Branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. **Dissertação** (Mestrado Em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. Meios Nutritivos. 1998. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v.1, p.104.

Cassana, F.C; Pinto, L.S; Pohl, S; Bianchi, V.J; Braga, E.J.B; Peters, J.A. 2007. Regeneração de brotos a partir de folhas de *Mirtilo* cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 870-872.

Cavalcante, A.S.L. 2001. Resposta Morfogênicas *in vitro* de acaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) e de Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum.). **Tese** (Doutorado Em Fitotecnia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 124p

Cerqueira, E.S. 1999. Propagação E Calogênese *in vitro* em rrrva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, p.81.

Clay, J.W; Sampaio, P.T.B.; Clement, C.R. 2000. **Biodiversidade Amazônica: Exemplos e Estratégias de utilização**. INPA/SEBRAE. p.409.

Clement, C.R. 1999. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, 53(2):188-202.

Clement, C.R.; Higuchi, N. 2006. A Floresta Amazônica e o futuro do Brasil. **Ciência e Cultura**, 58(3):p.44-49.

Costa, N.M.S.; Aloufa, M.A.I. 2006. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. Via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Giânia-GO, v.36, n.3, p.195-198.

Davies, M.E. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of *Paul's scarlet Rose*. **Planta**, Berlin, v.104, v.6, p.50-65.

Debergh, P.C. 1991. Acclimatization Techniques of Plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, 289p. p.291-300.

Deschamps, C. 1993. Propagação Vegetativa “in vivo” e “in vitro” de Sarandi (*Sebastiania schottiana* Muel. Arg.) espécie florestal de mata ciliar. 128 P. **Dissertação** (Mestrado Em Agronomia) - ESAL, Lavras-MG.

Dias, A.C.F.; Costa, F.E.C.; Andreote, F.D.; Lacava, P.T.; Teixeira, M.A.; Assumpção, L.C.; Araújo, W.L.; Azevedo, J.L.; Melo, I.S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.189-195.

Dias, M.M.; Pasqual, P.; Araújo, A.G.; Santos, V.A.; Custódio, T.N.; Costa F.H.S. 2010. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v.4, n.2, p.29-33.  
Döbereiner, J. A. 1997. Importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. CNPAB/Embrapa, Seropédica - RJ, v.1, n. 1.

Dwyer, J.D. 1951. The central American, West indian and South America species of Copeifera (Cesalpinaceae). **Brittonia**. 7 (3): p.143-172.

Ducke, A. 1938. Lauraceas aromáticas do Amazonas. **Reunião Sulamericana de Botânica**. Rio de Janeiro. 3: p. 55-74.

Echeverrigaray, S.; Andrade, L. B.; Delamare, A. P. L.; Zeni, A. L. B.; Carrer, R. 2001. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: Agropecuária, p. 257-276.

Erig, A.C.; Schuch, M.W. 2003. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, 9, n. 3, p. 221-227.

Fávero, A.P.; Nass, L.L.; Cargnin, A.; Neto, E.L. 2005. Rooting performance from leaf petioles of accessions and hybrids of wild *Arachis* species. **Scientia agricola** (Piracicaba, Braz.) vol.62 no.1.

Ferraz I.D.K.; Camargo, J.L.C; Sampaio, P.T.B. 2002. Sementes E Plântulas de Andiroba (*Carapa guianensis* AUBL. e *Carapa procera* D. C.): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazonica** 32(4): p.647-661.

Ferraz, I.D.K.; Costa, M.M. 2004. Morphology and germination of breu-branco a dormant non-orthodox tree seed from the Amazon. International Seed Testing Association: 1, ISBN: Inglês, Meio digital. **Seed Symposium Abstracts**; p.22-32.

Ferreira, L. A; Braz, E. M. 1997. Avaliação do Potencial de Extração e Comercialização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) In: **Florística e Botânica Econômica do Acre**, Brasil. 27.

Fisch. S.T.V.; Ferraz, I.D.K.; Rodrigues, W.A. 1996. Distinguishing *Carapa guianensis* Aublet from *Carapa procera* d.c. (meliaceae) by morphology of young seedlings. **Acta Amazônica** 25(3/4) p. 193-200.

Firn, R.D. 1986. Growth substance sensitivity: The need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Plant Physiology**, 67:p.267-272.

Gamborg, O.L.; Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.** 50:151-158.

George, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology. Edington: **Exegetics**, p.574.

Grattapaglia, D.; Machado, M.A. 1998. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABPCT/Embrapa CNPH, p.99-169.

Gray, W.M. 2004. Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*, 2(9): 1270-1273.

Guerra, M. P.; Pompelli, M. F. *Conservação de germoplasma in vitro: documento de trabalho*. Santa Catarina: UFSC. [1999]. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/conservainvitro.pdf>>. Acesso em: março de 2011.

Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W.F.; Kloepper, J.W. 1997. Bacterial Endophytes in Agricultural Crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914.

Handa, L.; Sampaio, P.T.B, Quisen, R.C. 2005. Cultura *In Vitro* de Embriões e de Gemas de Mudas de Pau-Rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazônica**. Manaus-AM. v. 35(1): 29-33.

Hartmann, T.H.; Kester, D.E.; Davies, F.T. 1990. Plant Propagation, principles and practices. **Prentice Hall**. New Jersey. p.647.

Holmberg, K. 2001. Natural Surfactants. In: **Colloid & Interface Science**, n, 6, p.148-159.

Jardim, L.S.; Costa, S.S.; Gonçalves, C.Q.B.; Brandão, H.L.M. 2010. Efeito de Diferentes Reguladores de Crescimento Na Regeneração *In Vitro* de Pau-Rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) **Acta Amazônica**. Manaus-AM. v.40 n.2.

Joshi, I. 2003. *In Vitro* Clonal Propagation of Mature *Eucalyptus* F<sub>1</sub> Hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. X *E. grandis* Hill ex Maiden). **Silvae Genetica**, v.52, n.3-4, p.110-113.

Kerbaui, G.B. 1997. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 1, n. (1). p.30-33.

Kohlenbach, H.W. 1976. Basic aspects of differentiation and plant regeneration from cell and tissue cultures. In: Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.). **Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Applications**. New York, Springer-Verlag. p. 355-366.

Lacava, P.T.; Silva-Stenico, M.E.; Araújo, W.L.; Simionato, A.V.C.; Carrilho, E.; Tsai, S.M.; Azevedo, J.L. 2008. Detection of Siderophores in Endophytic Bacteria

*Methylobacterium* spp. Associated With *Xylella fastidiosa* Subsp. *Pauca*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.521-528.

Lopes, J.C.; Dias, P.C.; Macedo, C.M.P. 2006. Tratamentos para acelerar a germinação e diminuir a deterioração das sementes de *Osmozia nitida* VOG. **Revista Árvore**. v.30, n.2, p. 171-177.

Loureiro, A.A; Silva, M.F; Alencar, J.C. 1979. Essências Madeireiras da Amazônia. Vol. II Inpa/Suframa, Manaus, AM, Brasil.

Lu, C. 1993. The use of thidiazuron in tissue cultures. *In Vitro*, **Cellular and Developmental Biology Plant**, Oxon, v. 29, n. 2, p. 92-96.

Mantovani, N.C.; Franco, E.T.H.; Vestena, S. 2001. Regeneração *In Vitro* de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101.

Medeiros, C.P.C. 1999. Indução *in vitro* de respostas morfogenéticas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.). 79p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE.

McHargue, L.A. e Hartshorn, G.S. 1983. Seed and Seedling ecology of *Carapa guianensis*. **Turrialba**. 33(4): p. 399-404.

Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant** 1: 437-496.

Nagao, E.O.; Araújo. M.S.; Silva, C.F.N.; Atroch, E.M.A.C.; Soares, S.K.B., Azevedo D.M.; Calderar, T.S. 2009. Estabelecimento *in vitro* de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. **Notícias da Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Fortaleza-CE.

Nicoloso, F.T.; Garlet, A.; Zanchetti, F.; Sebem, E. 2006. Micropropagação *In Vitro* da *Apuleialeiocarpa*. Disponível em: [www.cnpt.embrapa.br/redbiobr/anais/redv96/res39.html-4k](http://www.cnpt.embrapa.br/redbiobr/anais/redv96/res39.html-4k). acesso em: 10 de fev. de 2011.

Nunes, A.B.; Teles, B.R.; Spironello, W. 2009. Comportamento de estridulação em *Heilipus odoratus* Vanin & Gaiger (Coleoptera, Curculionidae, Molytinae) **Revista Brasileira de Entomologia** vol.53 no.3 6p.

Paiva, H.N.; Gomes, J. P.N. 1993. Propagação vegetativa de espécies florestais. Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, 40p.

Pasqual, M.; Carvalho, G.R.; Hoffmann, A.; Ramos, J.D. Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações: aplicações no melhoramento genético de plantas. **Lavras**: [s.n.], 1997.

Pasqual, M. 1985. Obtenção de plantas por cultura de tecidos. **Informativo Agropecuário**. 11(124): 63-68.

Pereira, A.M.S. 2000. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.60, p.47-53.

- Pereira, J.E.S.; Fortes, G.R.L. 2001. Multiplicação e aclimatização da Macieira Influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência no meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 417-420.
- Peres, L.E.P. 2002. Bases Fisiológicas e Genéticas para a Regeneração de Plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 25 - março/abril. 44-48p.
- Peres, L. E. P. & Kerbauy, G. B. 1999.High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) . **Plant Cell Reports**, 18:1002-1006.
- Pinto, P.G. 1963. Características físico-químicas e outras informações sobre as principais oleaginosas do Brasil. **Boletim Técnico 18**. Ministério da agricultura, Recife-PE. p. 28.
- Pinto, A. A. 2007. Avaliação de danos causados por insetos em sementes de Andiroba (*Carapa guianensis* AUBL) e Andirobinha (*Carapa procera*) na reserva florestal Adolpho Ducke em Manaus, AM, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. 73p.
- Pierik, R.L.M. 1990. Vegetative propagation. In: PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. [S.l.]: **International Association for Plant Tissue Culture**, p.183-230.
- Ponte, E.M.D. 1999. Micropropagação de *Eucalyptus globulus* ssp. *Globulus* Labill. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pelotas-RS.
- Preece, F. E.; Compton, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: 17-high-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer Verlag, 1991. p. 168-189.
- Quak, F. 1988. Meristem culture and virus-free plants. In: Reinert, J.; Bajaj, Y.P.S. (Ed.) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. New Delhi: **Narosa Publishing House**, p.599-615.
- Quezada A.C. 2006. Micropropagação da Macieira (*Malus domestica* Borkh) Cv. Fred Hough. **Dissertação** (Mestrado em Fruticultura) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.
- Raghavan, V.; Torrey, J.G. 1976.Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of capsella in culture. **Plant Physiology**, v.39, p. 691- 699.
- Rajeswari, V.; K. Paliwal, 2006, *In Vitro* Propagation of *Albizia Odoratissima* L.F. (Benth.) From Cotyledonary Node and Leaf Nodal Explants, **In Vitro Cell Development Biology-Plant**, 42:5, 399-404.
- Ramage, C.M.; Williams, R.R. 2002. Mineral Nutrition and Plant Morphogenesis. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, Gaithersburg, v. 38, n. 2, p. 116-124.

- Rizinni, C.T. e Mors, W.B. 1976. Botânica Econômica Brasileira. EPUSP-São Paulo. p. 263.
- Sahoo, Y.; Pattnaik, S.K.; Chand, P. K. 1997. Plant Regeneration from callus cultures of *Morus Indica* L. Derived from seedlings and mature plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 69, n. 1/2, p. 85-98.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. **Annu. Rev. Plant Biol.** 57:431-449p.
- Sampaio, P.T.B. 1988. Propagação vegetativa do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) pelo método da estaquia. Manaus: INPA. **Dissertação de mestrado.** p.112.
- Sampaio, P.T.B.; Santos, M.C.; Vieira, G.; Spironello, W.; Useche, F.L. 2007. Avaliação da rebrota da copa das árvores de pau rosa (*Aniba rosaeodora* DUCKE). **Acta Amazônica.** v.55, 37(1), p. 55-60.
- Santos, E.K. 2003. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: Freitas, L.B.; Bered, F. **Genética e evolução vegetal.** Porto Alegre: Editora de UFRGS, p.415-444.
- Schenk, R.O; HildebrandT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botanic,** 50:199-204.
- Silva, P.P.; Contin, L.A.S.; Freitas, D.V.; Aride, P.H.R.; Santos, A.L.W. 2010. Estabelecimento In Vitro de Ápices Caulinares de Samauma (*Ceiba Pentandra* L. Gaertn). **Scientia Agraria**, Curitiba-PR, v.11, n.6, p.437-443.
- Skoog, F.; Miller, C.O. 1957. Chemical Regulation of growth and organ formation plant tissues culture *In Vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-140.
- Souza, M.H. 1997, **Madeiras tropicais brasileiras + Brazillian tropical woods.** Brasília: Int. Brás. Do meio Ambiente e dos Recursos naturais rebiváveis. Laboratório de produtos Florestais, 152p.
- Soares, G.A. 2003. Aspectos do cultivo *in vitro* do Ingazeiro [*Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (Dc.) T.D. Penn.]. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- Spatz, A.K.; Gray, W.M. 2008. Plant Hormone Receptors: new perceptions. **Gene Development.** 22: 2139-2148.
- Stein, C.V.; Paiva, R.; Soares, P.F.; Nogueira, C.R.; Silva, C.L.; Emrich, E. 2007. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* willd. Subsp. *Affinis* (Dc.) T.D. Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG. v .31, n, 6.

Tanprasert, P.; Reed, B.M. 1998. Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 52, p. 53-55.

Tarazi, M.F.A. 2010. Comunidade Bacteriana Endofítica em Microplantas de Abacaxizeiro: Estrutura, Diversidade e sua influência na morfofisiologia após antibioticoterapia. **Tese de Doutorado**, Piracicaba-SP.

Teixeira, M.A.; Melo, I.S.; Vieira, R.F.; Costa, F.E.C.; Harakava, R. 2007. Microrganismos endofíticos de Mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.43-49.

Torres, A.C.; Caldas, L.S. 1999. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABPCT/Embrapa CNPH, p.99-169.

Vanneste, S.; Friml, J. 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. **Cell** 136:1005–16

Vanin, S. A. & F. Gaiger. 2005. A new spermophagous species of *Heilipus* gemar from the Amazonian region (Coleoptera, Curculionidae, Molytinae). **Revista Brasileira de Entomologia** 49: 240-244.

Vastano Jr., B. 1984. Estudos de aspectos da estrutura genética de uma população natural de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne, Leguminosae – Cesalpinoideae) na região de Manaus. **Tese**, Inpa-Fua, Manaus.

White, P. R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**. 9: p. 585-600.

Woodward, A.W.; Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annual Botanic**, 95:707–35

Zhao, Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, 61: 49–64.

## Propagação *in vitro* de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)

Brandão, H.L.M.<sup>1</sup>; Coelho, L.M.<sup>2</sup>; Jardim, L.S.<sup>3</sup>; Sampaio, P.T.B.<sup>4</sup>.

1 Doutorando Universidade Federal do Amazonas - UFAM; 2 Mestranda Universidade Federal do Amazonas - UFAM; 3 MSc. Universidade Estadual do Amazonas - UEA; 4 Dr. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

### Resumo

A copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) é uma espécie de larga utilização por produzir um óleo que é muito utilizado na medicina popular e vem sendo estudado no combate de diversos tipos de câncer. Neste estudo se avaliou o estabelecimento *in vitro* em meio MS de sementes e embriões de copaíba por meio da utilização de tratamentos compostos por NaOCl (0,85%), ampicilina (500mg.L<sup>-1</sup>), clorafenicol (500mg.L<sup>-1</sup>), derosal (5ml.L<sup>-1</sup>) e álcool 50% combinados em 7 soluções aquosas. Para a indução da germinação *in vitro* foram testados AIA, ANA e AIB, cada um com duas concentrações (5mg.L<sup>-1</sup> e 10mg.L<sup>-1</sup>) totalizando 6 tratamentos em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento. O tratamento composto por ampicilina (500mg.L<sup>-1</sup>), clorafenicol (500mg.L<sup>-1</sup>) e derosal (5ml.L<sup>-1</sup>) obteve 100 por cento de sementes sadias estabelecidas mas nenhuma delas germinou. O mesmo tratamento possibilitou o estabelecimento *in vitro* de 100 por cento dos embriões. Na germinação a dose de 10mg.L<sup>-1</sup> de ANA permitiu o enraizamento de 75% dos embriões, sendo estes os melhores resultados obtidos neste estudo.

**Palavras-chave:** copaíba, estabelecimento *in vitro*, germinação *in vitro*, reguladores de crescimento.

### *In vitro* propagation of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne)

#### Abstract

*The copaiba (Copaifera multijuga Hayne) is largely used because it produce an oil very used as a medicine in popular culture and has been studied to treat several cancer types. In this study the in vitro establishment of seeds and embryos in MS medium was tested trough application of NaOCl (0,85%), ampicilin (500mg.L<sup>-1</sup>), cloraphenicol (500mg.L<sup>-1</sup>), derosal (5ml.L<sup>-1</sup>) e alcohol 50% combined in 7 water solution. To induction of in vitro germination was tested IAA, NAA and IBA, two doses each (5mg.L<sup>-1</sup> e 10mg.L<sup>-1</sup>) totalizing 6 treatments in randomized arrangement with 20 repetitions each treatment. The treatment composed of ampicilin (500mg.L<sup>-1</sup>), cloraphenicol (500mg.L<sup>-1</sup>) and derosal (5ml.L<sup>-1</sup>) obtained 100 percent of establishment but none of them germinated. The same treatment allowed the establishment of 100 percent of embryos. In germination, the dose of NAA 10mg.L<sup>-1</sup> provided the rooting of 75% of embryos. This was the best result obtained in this study.*

**Key words:** *copaiba, in vitro establishment, in vitro germination, growth regulators.*

## 1. Introdução/Justificativa

A copaíba é uma espécie amazônica de grande importância na cultura local em virtude de sua utilização na medicina tradicional (Brum *et al.*, 2007). Por meio de um furo no tronco é possível se extrair um óleo de cor amarela translúcida que é utilizado em infusões, compressas e aplicado diretamente em ferimentos, em virtude de sua reconhecida ação antiinflamatória (Leite *et al.*, 2002). Este óleo vem sendo estudado com bons resultados no combate a diversos tipos de câncer.

O cultivo *in vitro* de embriões é uma técnica utilizada para a obtenção de material vegetal propagativo. Os embriões são fontes promissoras de explantes porque apresentam alta taxa de crescimento e diferenciação dos tecidos já definida o que facilita sua resposta morfogênética na obtenção de plantas completas *in vitro*. E ainda são menos propensos a contaminação em virtude de estarem protegidos no interior da semente (Peres, 2002; Cid, 2006).

A avaliação da viabilidade da germinação *in vitro* de copaíba é importante, tanto para maximizar a taxa de germinação, como para obter plântulas com qualidade genética e fitossanitária superior. Alguns estudos realizados *in vivo*, independentemente da espécie, mostram que o suprimento adequado em água, composição de gases e temperatura convenientes, assim como a luz, são importantes fatores a serem considerados na germinação *in vitro* (Lopes *et al.*, 2006). Mas a escassez de trabalhos publicados nessa linha de pesquisas com espécies amazônicas torna um grande desafio sua realização.

Nas sementes, a presença de microorganismos é mais limitada (Abreu, 2010), em sua maioria, é observada a ausência de contaminação, devido à natural produção de compostos que visam proteger suas reservas nutritivas do ataques e garantir a germinação. O que é uma vantagem quando se compara outras fontes de explante que podem apresentar tolerância à presença de microorganismos ou até mesmo relações simbióticas planta x microorganismo que muitas vezes inviabilizam o estabelecimento de algumas espécies (Dingra, 2005).

No entanto, o estabelecimento de embriões *in vitro* é complicado, devido à grande sensibilidade que eles apresentam aos fatores ambientais ao serem separados da semente. Efeitos como a oxidação e contaminação devem ser cuidadosamente observadas ao se definir o protocolo de estabelecimento *in vitro*

de embriões (Pereira *et al.*, 2005). Deve-se atentar também a dificuldade que algumas espécies apresentam devido à alta aderência que o embrião possui ao endosperma, o que pode dificultar e até inviabilizar a retirada do embrião.

A coleta, armazenamento, e assepsia das sementes são fatores limitantes no estabelecimento de embriões *in vitro*. Considerando a rápida perda de viabilidade das sementes após a queda e o período de exposição no solo até o momento da coleta. A retirada do mesocarpo deve ser executada o mais rápido possível, pois, é fonte de contaminação (Melo *et al.*, 2001).

O condicionamento das sementes em recipientes arejados é importante, pois o abafamento contribui para criar condições favoráveis ao crescimento de microorganismos, ou seja, a rápida aplicação de tratamentos de desinfestação superficial das sementes aumenta bastante à chance de se obter embriões livres de contaminação (Neves *et al.*, 2009).

Recomenda-se que o embrião seja retirado logo após a maturação da semente e antes de se iniciar o processo de germinação, pois assim é possível diminuir a contaminação (Dingra, 2005). Acredita-se também que o estresse causado ao tecido é menor se a retirada do embrião for realizada antes da germinação iniciar, pois o embrião já iniciará a utilização do meio de cultura como fonte de nutrientes, o que causará um estresse menor (Melo *et al.*, 2001).

Neste contexto, o presente estudo objetivou desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* para sementes e embriões de copaíba (*Copaifera multijuga*), por meio da elaboração de um protocolo de assepsia que viabilize o estabelecimento *in vitro* das sementes e embriões, e da aplicação exógena de auxinas, a fim de induzir a germinação *in vitro*.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral:**

Elaborar um protocolo de propagação *in vitro* de sementes e embriões de *Copaifera multijuga*.

### **2.2 Específicos:**

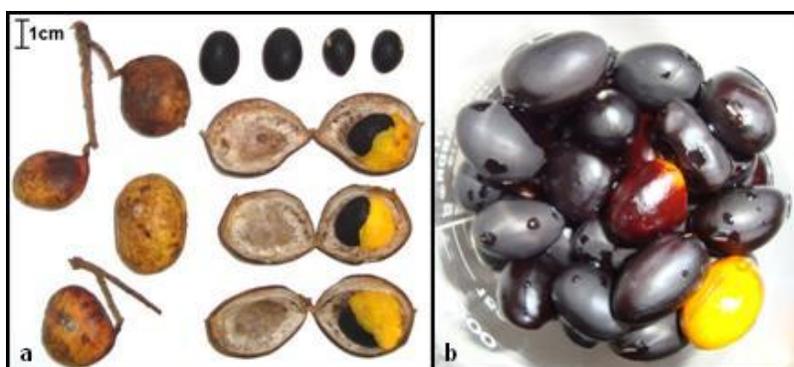
Elaborar um protocolo de assepsia que possibilite o estabelecimento *in vitro* de sementes e embriões de *Copaifera multijuga*.

Avaliar o efeito da aplicação de reguladores de crescimento na germinação *in vitro* de embriões de *Copaifera multijuga*.

### 3. Materiais e métodos

As sementes utilizadas neste estudo (Fig. 1) foram coletadas de populações naturais localizadas na zona rural do município de Coari-AM. Após a coleta as sementes foram armazenadas em sacos plásticos, revestidos internamente com folhas de jornal, e foram enviadas ao laboratório de cultura de tecidos da Universidade do Estado do Amazonas em Manaus-AM, onde os experimentos foram instalados em agosto de 2010.

Foi realizado o beneficiamento manual dos frutos e as sementes foram lavadas em água corrente com sabão neutro por vinte minutos, após esta lavagem as sementes estavam prontas para receber os protocolos de assepsia.



**Figura 1.** Sementes, frutos e plântulas de copaíba (*Copaifera multijuga*) sendo: a – frutos e sementes; b -sementes em processo de assepsia.

#### 3.1 Estabelecimento *in vitro* de sementes

Foram utilizados sete tratamentos (Quadro 1) em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com de ágar ( $4,2\text{g.L}^{-1}$ ) e sacarose ( $30\text{g.L}^{-1}$ ), com vinte repetições em delineamento inteiramente casualizado. A aplicação das soluções descontaminantes (tratamentos) se deu por imersão por 24 horas, armazenados em B.O.D a  $30^{\circ}\text{C}$ , e foi acrescido  $3\text{ml.L}^{-1}$  do biossurfactante tween 20 em todos os tratamentos.

Após a inoculação em câmara de fluxo laminar as sementes foram mantidas em B.O.D. com temperatura ajustada a  $30^{\circ}\text{C}$ . A coleta de dados decorreu em um período de 15 dias, foram coletadas a porcentagem de contaminação por fungos, porcentagem de contaminação por bactérias, porcentagem de sementes sadias e porcentagem de germinação aos 30 dias.

**Quadro 1.** Tratamentos de assepsia aplicados em sementes de copaíba (*Copaifera multijuga*).

Tratamento	Composição
1	Ampicilina 500 mg.l <sup>-1</sup> + Derosal 5ml.l <sup>-1</sup>
2	Clorafenicol 500 mg.l <sup>-1</sup> + Derosal 5ml.l <sup>-1</sup>
3	Derosal 5ml.l <sup>-1</sup>
4	Ampicilina 500 mg.l <sup>-1</sup> + Clorafenicol 500 mg.l <sup>-1</sup>
5	Ampicilina 500 mg.l <sup>-1</sup> + Clorafenicol 500 mg.l <sup>-1</sup> + Derosal 5ml.l <sup>-1</sup>
6	Alcool 50%
7	NaOCl 0,85%

O tegumento das sementes precisou ser mantido devido à intensa oxidação do endosperma que ocorre no contato com as soluções descontaminantes, inclusive da parte mais externa (parte visível) do embrião. O tratamento que apresentou o melhor resultado foi repetido para o experimento de germinação *in vitro* de embriões.

### 3.2 Germinação *in vitro* de embriões

Na indução da germinação *in vitro* dos embriões foram utilizadas diferentes auxinas em meio MS (suplementado com 4,2g.L<sup>-1</sup> de agar e 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose) como está detalhado no quadro 2. O Número de repetições utilizado foi vinte em delineamento inteiramente casualizado. Após a inoculação em câmara de fluxo laminar os embriões foram mantidos no escuro em B.O.D. com temperatura ajustada a 30°C. A coleta de dados decorreu em um período de 42 dias. Foram coletadas a porcentagem de enraizamento e brotação.

**Quadro 2.** Tratamentos testados na germinação *in vitro* de embriões de copaíba (*Copaifera multijuga*).

Tratamento	Auxina	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
1	AIA	5,0
2	ANA	5,0
3	AIB	5,0
4	AIA	10,0
5	ANA	10,0
6	AIB	10,0
Testemunha	ausente	0,0



## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Estabelecimento *in vitro*

Nos tratamentos de assepsia foram observadas respostas diferenciadas dos embriões aos tratamentos aplicados na assepsia como mostra a tabela 1. Após quinze dias de cultivo, obteve-se 100% de desinfestação no tratamento 5 (ampicilina 500mg.L<sup>-1</sup> + clorafenicol 500mg.L<sup>-1</sup> + derosal 5ml.L<sup>-1</sup>) e 90% no tratamento 2 (clorafenicol 500mg.L<sup>-1</sup> + derosal 5ml.L<sup>-1</sup>). Atribui-se este resultado a mistura de dois tipos de antibióticos com o fungicida. Tanprasert e Reed (1998) mostraram que combinações de antibióticos foram mais efetivas que antibióticos isolados, quando usados na assepsia de morango.

**Tabela 1.** Porcentagens de: contaminação por fungos e bactérias, sementes sadias (aos 15 dias) e germinação de sementes de copaíba (*Copaifera multijuga*) tratadas com antibióticos e fungicidas após 30 dias.

Tratamentos	Contaminação por fungos (%)	Contaminação por bactérias (%)	Sementes sadias (%)	Germinação aos 30 dias (%)
1. Ampicilina* + Derosal **	0	20	80	0
2. Clorafenicol* + Derosal **	5	5	90	0
3. Derosal**	0	30	70	0
4. Ampicilina* + Clorafenicol*	75	0	25	0
5. Ampicilina*+Clorafenicol*+Derosal**	0	0	100	0
6. Alcool 50%	100	0	0	0
7. NaClO 2,5%	85	15	0	0

\*= 500 mg.L<sup>-1</sup>; \*\*= 5ml.L<sup>-1</sup>

Os tratamentos 1 (ampicilina 500mg.L<sup>-1</sup> + derosal 5ml.L<sup>-1</sup>) e 3 (derosal 5ml.L<sup>-1</sup>) proporcionaram satisfatória assepsia, 80% e 70% respectivamente, o tratamento 4 apresentou a menor porcentagem de assepsia, 25%. Este resultado indica que a maioria dos microorganismos nas sementes de copaíba testadas neste trabalho é composta por fungos.

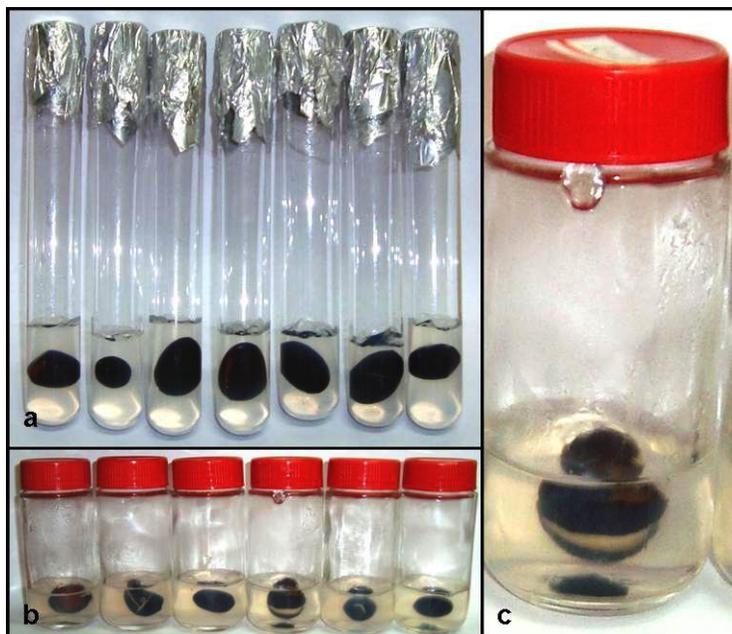
A imersão por 24 horas nas soluções que compuseram os tratamentos 6 (álcool 50%) e 7 (NaClO 0,85%) se mostrou ineficaz em virtude da agressividade dos agentes descontaminantes sobre as sementes, ocorreu intensa oxidação e altas taxas de contaminação por fungos (100% e 85% respectivamente). Esses tratamentos serviram para se testar a resistência do tegumento das sementes, porque sua retirada foi inviabilizada pela excessiva oxidação que ocorreu no endocarpo em todas as soluções descontaminantes.

A utilização de derosal ( $5\text{ml.L}^{-1}$ ) reduziu a zero a incidência de contaminação fúngica nos tratamentos 1, 2, 3 e 5. No entanto é evidente a maior presença de fungos endofíticos nas sementes quando se observa as altas taxas de contaminação por fungos apresentadas pelos demais tratamentos (4, 6 e 7), que possuem apenas agentes químicos com função bactericidas. Nagao *et al.*, (2009) estabeleceram fragmentos foliares de *Ampelozizyphus amazonicus* utilizando  $1\text{ml.L}^{-1}$  de derosal. Moraes *et al.*, (2007) estabeleceram gemas axilares de coroa de *Ananas comosus* utilizando 0,3% de derosal.

Da mesma forma que o derosal se mostrou eficiente no controle da contaminação fúngica a o clorafenicol ( $500\text{mg.L}^{-1}$ ) reduziu a zero a presença de bactérias, este resultado é constatado ao se avaliar as baixas contaminações por bactérias nos tratamentos 1, 4 e 5, com  $500\text{mg.L}^{-1}$  de clorafenicol. Rodrigues (2005) obteve taxa de estabelecimento *in vitro* de 90%, ao utilizar  $500\text{ml.L}^{-1}$  de clorafenicol em ápices de *Heliconia rauliniana*, e Dias (2002) obteve resultados semelhantes ao utilizar  $500\text{mg.L}^{-1}$  de clorafenicol em *Heliconia bihai*.

No tratamento 1, onde o único agente bactericida é a ampicilina ( $500\text{mg.L}^{-1}$ ), houve 20% de contaminação bacteriana. Este resultado indica que a ampicilina ( $500\text{mg.L}^{-1}$ ) possui menor ação na assepsia de sementes de copaíba quando comparada com a ação do clorafenicol na mesma concentração.

Não houve germinação em nenhum dos tratamentos (Tab. 1 e Fig. 3a). Mesmo com o aparente padrão germinativo evidenciado pelo intumescimento e o rompimento do tegumento das sementes nos primeiros 5 dias (Fig. 3b e c). Isso foi causado pelo excesso de umidade, o que ocasionou falta de oxigênio, vital para a germinação das sementes de copaíba, ou seja, a imersão total das sementes no meio de cultura inviabilizou a oxigenação a assim impediu a germinação (Floriano, 2004). Recomenda-se a utilização de outros meios com maiores concentrações dos agentes gelificantes e o posicionamento apenas da metade das sementes sobre o meio de cultura.



**Figura 2.** Sementes de copaíba (*Copaifera multijuga*) estabelecidas *in vitro* por meio da utilização de ampicilina ( $500\text{mg.L}^{-1}$ ), clorafenicol ( $500\text{mg.L}^{-1}$ ) e derosal ( $5\text{ml.L}^{-1}$ ) em solução aquosa após 24h (a) e 7 dias (b e c).

Apesar dos resultados nulos na germinação, a alta taxa de sementes sadias promovida pelo tratamento 5 possibilitou o estabelecimento *in vitro* de embriões para os testes de germinação *in vitro*. A repetição deste protocolo e a retirada dos embriões em câmara de fluxo laminar possibilitaram o estabelecimento dos 140 embriões para os testes de germinação *in vitro* de embriões.

#### 4.1 Germinação *in vitro*

Em relação aos diferentes métodos de indução do enraizamento testados houve resposta positiva apenas nos tratamentos com ANA e AIA (Tab. 2). Os tratamentos 2 ( $5\text{mg.L}^{-1}$  de AIA), 3 ( $10\text{mg.L}^{-1}$  de AIA), e 4 ( $5\text{mg.L}^{-1}$  de ANA) obtiveram 25%, 30% e 30% respectivamente. Nos tratamentos 6, 7 e no tratamento testemunha não houve emissão de raízes até os 42 dias. O tratamento 5 com  $10\text{mg.L}^{-1}$  de ANA induziu o enraizamento (Fig. 3) de 75% dos embriões sendo este o tratamento que obteve a maior porcentagem de enraizamento. Ledo *et al.*, (2007) observaram o incremento no enraizamento de embriões de *Cocos nucifera* com a suplementação de  $1\text{mg.L}^{-1}$  de ANA.

Pierik (1990), e Hu e Ferreira (1998), afirmam que o uso de reguladores de crescimento, associados com a ausência de luz, em condições de temperatura controlada, aceleram o processo de desenvolvimento dos embriões e evitam a oxidação. Melo *et al.*, (2001) conseguiram reduzir em 9,94% a oxidação de embriões de *Syagrus oleracea* com a utilização de uma fase de escuro. Amaral *et al.*, (1997) reduziram a oxidação fenólica em embriões de *Carapa guianensis* com a manutenção das culturas no escuro por até 15 dias.

**Tabela 2.** Percentagem de enraizamento e brotação de embriões de copaíba (*Copaifera multijuga*), tratadas com AIA, ANA e AIB após 42 dias.

Tratamento	Auxina	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Enraizamento (%)	Brotação (%)
Testemunha	Ausente	0,0	0	0
2	AIA	5,0	25	0
3	AIA	10,0	30	0
4	ANA	5,0	30	0
5	ANA	10,0	75	0
6	AIB	5,0	0	0
7	AIB	10,0	0	0

Não houve formação de parte aérea em nenhum explante. Danos ocasionais durante a excisão dos embriões foi uma possível causa para a não germinação por completo. A retirada dos embriões de copaíba foi extremamente problemática em virtude da grande aderência do embrião ao mesocarpo. Mesmo com a utilização de pinça e bisturi, diversos cortes precisaram ser realizados para a excisão de cada um dos embriões. Foram necessárias 317 sementes para se conseguir 140 embriões aparentemente inteiros, os outros 177 foram perdidos por cortes errados ou partiram por estarem fortemente aderidos ao mesocarpo.



**Figura 3.** Evolução da germinação *in vitro* de um embrião de copaíba (*Copaifera multijuga*) tratado com 10mg.L<sup>-1</sup> de ANA após 42 dias.

## 5. Conclusões

Sob as condições testadas neste estudo é possível concluir:

- É viável o estabelecimento *in vitro* em meio MS de embriões de *Copaifera multijuga*;
- Embriões de *Copaifera multijuga* podem ser enraizados *in vitro* por meio da aplicação de  $5\text{mg.L}^{-1}$  e  $10\text{mg.L}^{-1}$  de ANA e AIA;
- É inviável o estabelecimento *in vitro* de sementes de *Copaifera multijuga*.

## **6. Agradecimentos**

### **Fontes financiadoras**

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM;
- Rede CTPetro Amazônia;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico – CNPq.

### **Instituições colaboradoras**

- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA;
- Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

## 7. Referencias bibliográficas

Abreu-Tarazi, M.F.; Navarrete, A.A.; Andreote, F.D.; Almeida, C.V.; Almeida, Marcílio ; TSAI, S.M. 2010. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated axenic pineapple microplants revealed by PCR DGGE. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 555-560.

Amaral, S. A.; Silva, A.T.A.; Mota, M.G.C.; Vieira, I.M.S. 1997. Uso de tratamentos como antioxidantes de embriões e endosperma de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). In: Seminário de Iniciação Científica da FCAP,7.; **Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental**, 1. Belém-PA: FCAP. p. 122-124.

Biancheti, A. 1981. Tecnologia de sementes de essências florestais. Revista Brasileira de Sementes. V.3, n.3, p. 27-43.

Brum, H.D.; Mesquita, R.M.; Ferraz, I.D.K. 2007. Descrição Comparativa dos Propágulos e Plântulas de *Copaifera multijuga* Hayne e *C. officinalis* Jacq. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 351-353.

Cid, L. P. B. ; Miguel Jordan Z. 2006. A contaminação *in vitro* de plantas. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v. 1, p. 1-20.

Dias, M.A.S. 2002. Determinação de fontes de explantes em Heliconia (*Heliconia bihai*, Angiospermae, Heliconiaceae), isolamento, identificação e controle de microrganismos envolvidos nas dificuldades de cultivo *in vitro*. **Dissertação**. Mestrado. Natal: UFRN, 86p.

Dingra, O.D. 2005. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: Zambolim, L. (ed). Sementes: qualidade fitossanitária. **Nota Técnica**. Universidade federal de Viçosa –UFV- Viçosa- MG. p.502.

Floriano, E.P. 2004. Germinação e dormência de sementes florestais, Caderno **Didático** nº 2, 1ª ed. Santa Rosa, p. 19.

Hu, C.Y.; Ferreira, A.G. 1998. Cultura de embriões. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH. p.371-393.

Kerbaui, G.B. 1997. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 1, n. (1). p.30-33.

Ledo, A.S.; Gomes, K.K.P.; Barboza, S.B.S.C.; Vieira, G.S.S.; Tupinambá, E.A.; Aragão, W. M. 2007, Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa agropecuária brasileira**. ISSN 0100-204.vol.42, n.2.

Leite, A.; Alexandre, A.; Rigamonte-Azevedo, C.; Campos, C. A.; Oliveira, A. 2002. Recomendações para o Manejo Sustentável do Óleo de Copaíba. **Nota Técnica**. Rio Branco: UFAC/SEFE, 38p.

Lopes, J.C.; Dias, P.C.; Macedo, C.M.P. 2006. Tratamentos para acelerar a germinação e diminuir a deterioração das sementes de *Osmozia nitida* VOG. **Revista Árvore**. v.30, n.2, p. 171-177.

Melo, B.; Pinto, J.E.B.P.; Luz, J.M.Q. Peixoto, J.R. Juliatti, F.C. 2001. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (mart.) becc.] **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306.

Moraes, A.M.; Almeida, F.A.C.; Filho, J.C. 2007. Desinfestação e Estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de Abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa-PB, v.1, n.2, p.39-44.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tabacco tissue cultures. **Physiology Plant** 1: p,437-496.

Nagao, E.O.; Araújo, M.S.; Silva, C.F.N.; Atroch, E.M.A.C.; Soares, S.K.B., Azevedo D.M.; Calderar, T.S. 2009. Estabelecimento *in vitro* de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. **Notícias da Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Fortaleza-CE.

Neves, W.S.; Pereira, D.F.; Ferreira, P.A.; Lopes, E.A. 2009. Avaliação Fitossanitária de Sementes de Pinhão Manso Provenientes dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. *Revista Trópica*. **Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 3, n. 2, p. 21.

Pereira, J.E.S.; Maciel, T.M.S.; Costa, F.H.S.; Pereira, M.A.A. 2005. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256.

Peres, L.E.P. 2002. **Bases** Fisiológicas e Genéticas para a Regeneração de Plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 25 - março/abril. 44-48p.

Pierik, R.L.M. 1990. Vegetative propagation. In: Pierik, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. [S.l.]: **International Association for Plant Tissue Culture**, p.183-230.

Rodrigues, P.H.V. 2005. Estabelecimento *in vitro* de *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia agricola**, v. 62, n. 1, p. 69-71.

Tanprasert, P.; Reed, B.M. 1998. Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 52, p. 53-55.

Vastano J.R.B. 1984. Estudos de aspectos da estrutura genética de uma população natural de Copaíba (*Copaífera multijuga* Hayne, Leguminosae – Caesalpinoideae) na região de Manaus. **Tese** (Doutorado). INPA-FUA, Manaus-AM.