

**Universidade do Estado do Amazonas – UEA**  
**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos**  
**Naturais da Amazônia**  
**Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais - MBT**

**PROPAGAÇÃO *in vitro* DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aublet)**

**Hélio Leonardo Moura Brandão**

Dissertação apresentada a Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos naturais.

**Manaus – AM**

**2005**

# **PROPAGAÇÃO *in vitro* DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aublet)**

**Hélio Leonardo Moura Brandão**

Engenheiro Florestal

**Prof. Orientador: Paulo de Tarso Barbosa Sampaio**

Dissertação apresentada a Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos naturais.

**Manaus – AM**

**2005**

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

**Propagação *in vitro* de Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet)**

Manaus: UEA\INPA, 2006.

59p.

Dissertação de Mesdtrado

Palavras-chave: 1.Microrpopagação, 2.Andiroba, 3.Combinação hormonal e 4.Reguladores de crescimento.

**Sinopse:**

Este trabalho aborda a produção de mudas de Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) por meio da Cultura de Tecidos Vegetais, testando a aplicação dos hormônios ANA, 2,4-D, BAP, TDZ e AIA em material juvenil.

**Palavras-chave:** 1.Microrpopagação, 2.Andiroba, 3.Combinação hormonal e 4.Reguladores de crescimento.

Á minha mãe Elza Moura, á minha vó  
Maria das Dores, á Professora Marlene  
Freitas, (em memória) á minha família e  
aos meus amigos, que muitas vezes me  
serviram como exemplo e me ajudaram  
me dando força para seguir em frente.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

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

Á Engenheira Agrônoma Liana Silva Jardim pelos ensinamentos passados, pela paciência e pela amizade.

Á professora Marlene Freitas da Silva (em memória), pelo apoio profissional e pela amizade.

Á Iselma Teixeira por me ensinar a ter paciência nos momentos difíceis, apoio e amizade.

Aos professores, Bosco, Glória, Luiz Antônio, Mafra, Luiz Lozano, Lucia Maia, Sandra Zanotto e Gil Vieira pelos ensinamentos passados e pela amizade.

Aos meus colegas de curso, Lilian Ururahy, Ranata Teixeira, Fabio Cáuper, Gisele Cândida, Ernesto Mujica, Marlíbia Auzier e Ezequias Andrade pelo companheirismo e pela troca de experiências.

Aos meus amigos, Renata, Melissa, Thana, Karol, Laura, Fabíola, Adilson, Flavio, Carla e Mayra, pelas críticas, paciência, incentivo e pelos momentos inesquecíveis que passamos.

Aos meus amigos e companheiros do volley, Michael, Paulo, Ruy, Cláudio, Orbélio e Alex, pelas partidas memoráveis que me ajudaram a esquecer dos meus problemas.

Á minha família pelo suporte pessoal que me passaram.

Á universidade do Estado do Amazonas pela oportunidade de realização deste curso de Mestrado.

Á FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro á execução do projeto.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1 Geral.....	3
Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1 Propagação vegetativa.....	4
3.2 Cultura de tecidos vegetais.....	5
3.2.1 Fases da Cultura de Tecidos.....	8
3.3 Embriogênese somática.....	11
3.3.1 Enraizamento <i>in vitro</i> .....	13
3.4 Fatores que afetam a propagação <i>in vitro</i> .....	13
3.4.1 Fontes do explante.....	13
3.4.2 Fitossanidade.....	14
3.4.3 Composição mineral do meio de cultura.....	16
3.4.4 Morfogênese e Fitorreguladores.....	17
3.4.5 Fatores ambientais.....	18
<b>4. ESPÉCIES ESTUDADAS</b> .....	<b>19</b>
4.1 Andiroba.....	19
4.1.1 Descrição e fenologia.....	19
4.1.2 Usos.....	20
4.1.3 Floração e frutificação.....	21

4.1.4 Propagação vegetativa.....	21
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
5.1 Preparo do material vegetativo.....	22
5.2 Explantes.....	24
5.3 Assepsia dos explantes.....	24
5.4 Meio de cultura.....	25
5.5 Hormônios.....	25
5.6 Desenho experimental.....	25
5.7 Coleta de dados.....	27
5.8 Análise dos dados.....	28
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
6.1 Folhas.....	31
6.1.1 <u>Fase 1</u> .....	31
6.1.2 <u>Fase 2</u> .....	33
6.1.3 <u>Fase 3</u> .....	34
6.2 Nódulos foliares.....	37
6.2.1 <u>Fase 1</u> .....	37
6.2.2 <u>Fase 2</u> .....	37
6.2.3 <u>Fase 3</u> .....	38
6.2 Ápices.....	43
6.2.1 <u>Fase 1</u> .....	43
6.2.2 <u>Fase 3</u> .....	45
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
7.1 Assepsia.....	46
7.2 Fase 2.....	47
7.3 Fase 3.....	48
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes foliares tratados com doses de AIA ANA 2,4-D e BAP após 30 dias.....33

Tabela 2: Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes foliares tratados com doses combinadas de AIA ANA 2,4-D e BAP após 30 dias.....36

**Tabela 3:** Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes foliares tratados com doses de AIA ANA 2,4-D e BAP após 30 dias.....38

**Tabela 4:** Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes obtidos de nódulos foliares tratados com doses combinadas de AIA ANA e TDZ após 40 dias.....42

**Tabela 5:** Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes obtidos de ápices tratados com doses combinadas de ANA e BAP após 30 dias.....47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sementes de Andiroba em processo de assepsia com benlate (1) e hipoclorito de sódio (2).....23
- Figura 2:** Mudas de Andiroba Germinadas em bandeja plástica contendo areia lavada coberta com vermiculita como substrato.....23
- Figura 3:** Caracterização do tipo de explantes testados: a – explante apical; b – nódulo foliar; c – explante foliar.....24
- Figura 4:** Tipo de folhas que forneceu os explantes: 1 - folha madura; 2 - folha semi-jovem e 3-folhas jovem.....32
- Figura 5:** Porcentagem de contaminação por bactérias e por fungos de explantes foliares tratados com Benlate, Tween e Hipoclorito.....32
- Figura 6:** Raízes em explantes foliares de Andiroba tratados com 3.0mg/l de ANA (a), e calos em explantes foliares tratados com 3,0mg/l de 2,4-D (b) após 30 dias.....33
- Figura 7:** Calos em explantes foliares tratados com 10.0mg/l de 2,4-D e 10,0 mg/l de BAP (a) Raízes em explantes foliares tratados com 10,0 mg/l de ANA e 10,0mg/l de BAP (b), após 30 dias.....34
- Figura 8:** Porcentagem de enraizamento de explantes foliares tratados com ANA, AIA, 2,4-D e BAP após 30 dias.....35
- Figura 9:** Porcentagem de calogênese de explantes foliares tratados com ANA, AIA, 2,4-D e BAP após 30 dias.....35

<b>Figura 10:</b> Porcentagem de descontaminação de explantes foliares tratados com Benlate, Tween e Hipoclorito.....	37
<b>Figura 11:</b> Explantes foliares enraizados com doses combinadas de ANA e TDZ na fase 3 do experimento aos 30 dias.....	38
<b>Figura 12:</b> Calos em explantes foliares tratados com doses combinadas de ANA e TDZ na fase 3 do experimento aos 30 dias.....	39
<b>Figura 13:</b> Porcentagem de contaminação por fungos em explantes apicais tratados com Benlate, Tween, Hipoclorito a Cloraphenicol em cinco diferentes soluções de descontaminação.....	43
<b>Figura 14:</b> Porcentagem de contaminação por bactérias em explantes apicais tratados com Benlate, Tween, Hipoclorito a Cloraphenicol em cinco diferentes soluções de descontaminação.....	43
<b>Figura 15:</b> Porcentagem de contaminação por bactérias em explantes apicais tratados com Benlate, Tween, Hipoclorito a Cloraphenicol (t1, t2, t3, t4, t5) e Ampicilina (t6) em seis diferentes soluções de descontaminação.....	44
<b>Figura 16:</b> Brotos em Ápices de Andiroba tratados com BAP e ANA na fase 3 deste estudo aos 30 dias (a); Plântula de andiroba gerada via embriogênese somática no tratamento 4 com 10,0mg/l de ANA e 5,0mg/l de BAP aos 30 dias...	45

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Composição dos protocolos de assepsia aplicados na fase 1 do estudo.....25
- Quadro 2:** Doses de hormônios aplicadas nos explantes na fase 2 do experimento.....25
- Quadro 3:** Doses combinadas de hormônios aplicada a explantes obtidos de folhas na fase 3 do experimento.....27
- Quadro 4:** Doses combinadas de hormônios aplicada a explantes obtidos de nódulos foliares na fase 3 do experimento.....27
- Quadro 5:** Doses combinadas de hormônios aplicada a explantes obtidos de ápices na fase 3 do experimento.....27

## **PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* AUBLET).**

**Autor: Hélio Leonardo Moura Brandão**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio**

### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* de Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet). Espécie abundantemente utilizada nas indústrias farmacêutica e cosmética por fornecer compostos químicos que virão a servir de matéria prima para a produção de novas drogas. A fim de promover a embriogênese somática foram utilizados os seguintes hormônios: AIA, ANA, 2,4-D, TDZ E BAP, em diferentes concentrações e em doses combinadas em explantes obtidos a partir de mudas e tratados com Benlate. Os explantes foram cultivados em meio MS básico com (Murashige & Skoog, 1962), sendo que a concentração de sais foi diminuída pela metade e adicionado 30 mg de sacarose e 8 mg de Agar, o PH foi ajustado para 5.8. Os explantes foram inoculados em câmara de fluxo laminar e acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26°C por trinta dias. Foram testados três diferentes tipos de explante: Ápice, Folhas e Nódulos foliares. A fonte que apresentou melhores respostas aos hormônios foi os nódulos foliares nas doses de 10,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, da mesma forma os explantes foliares apresentaram melhores resultados nos tratamentos com 10,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, no entanto os explantes obtidos de ápices apresentaram altas taxas de contaminação por bactérias em todos os protocolos de assepsia testados, até 90%, então acrescentou-se um novo protocolo de assepsia, o qual diminuiu essa contaminação a 20%, esta fonte de explante apresentou formação de raízes e brotos na solução com 10,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA e 10,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP.

**Palavras-chave:** 1.Microrpropagação, 2.Andiroba, 3.Combinação hormonal e 4.Reguladores de crescimento.

## IN VITRO PROPAGATION OF ANDIROBA (*Carapa guianensis* AUBLET).

**Author: Hélio Leonardo Moura Brandão**

**Adviser: Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio**

### ABSTRACT

The goal of this work was to develop a protocol for cloning through somatic embryogenesis of Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet). A species abundantly found in north Brazil utilized for medicinal and cosmetic purposes and as a source of compounds that may be used to develop new synthetic drugs. To promote somatic embryogenesis were tested NAA, BAP, 2,4-D, TDZ and IBA, in different concentrations and different combinations in explants obtained of young plants treated with Benolmyl. The explants were cultivated in a medium containing MS salt and vitamins (Murashige & Skoog, 1962) being the mineral salts reduced to half strength and added with myo-inositol ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sucrose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) and agar ( $8.0 \text{ g.L}^{-1}$ ), and the pH was adjusted to 5.8. The cultures were inoculated and then kept at a 16 hour-photoperiod, temperature of  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $25 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  radiation for 30 days. Three different sources of explant were tested: apical, leaf buds and leaves. The source that showed best results of rooting was the leaf buds treated with NAA  $10,0 \text{ mg/l}$ . As well, leaves rooting showed best results treated with NAA. However apical source showed high level contamination, fact that took the increasing of a new protocol of asepsis. The results showed that it is possible to obtain high quantities of shoots and then plantlets which could be cultivated in vitro through the methods tested in this experiment. Apical source appear as the best way to obtain a plant of Andiroba by somatic embryogenesis, NAA promotes the rooting in leaf buds a leaves and BAP promotes shoots in apical explants.

**Key words:** 1.Micropropagation, 2.Andiroba, 3.Hormonal combination and 4. growth regulators.

## 1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A inserção de produtos cosméticos e farmacêuticos de origem Amazônica no mercado internacional pode representar a valorização de produtos extrativistas. Porém, devido à inexistência de um sistema de produção associado a um plano de negócios, óleos, sementes e resina continuam sub-valorizados. Fato que explica a preferência pela madeira nos planos de manejo da região.

Espécies como a Andiroba, cujas sementes produzem óleo com propriedades que podem ser exploradas, estão em um intenso processo de inserção no mercado de cosméticos, fototerápicos e fitofármacos (Ferraz, 2002), mas conseqüentemente está sofrendo com a exploração extrativista mais intensa, o que pode comprometer sua regeneração natural e o equilíbrio das populações naturais (Higuchi *et al.*, 1985).

Dessa forma, surge a necessidade de estudos que forneçam alternativas tecnológicas para a propagação em massa dessa espécie. A fim de dissipar a pressão que esta vêm sofrendo, e de agregar valores na sua comercialização (Clay., *et al*, 2000).

Tais tecnologias fornecem ferramentas que podem maximizar o rendimento do processo produtivo dos óleos. E dessa forma pode se estabelecer um programa de melhoramento genético a fim de propagar indivíduos com características genéticas superiores e assim aumentar a produtividade dos óleos essenciais.

Porém é muito limitado o número de pesquisas que visam estabelecer protocolos alternativos de propagação de espécies florestais. Dessa forma surge uma grande necessidade de se adequar às tecnologias disponíveis a fim de diminuir a pressão que as populações nativas estão sofrendo, e de otimizar os processos de produção de mudas melhoradas.

Os sistemas de propagação *in vitro* são excelentes pela sua eficiência como veículos para a manipulação genética e multiplicação clonal de plantas (Hartman *et al.*, 1990). E superam significativamente o método sexuado de propagação, desagregando alguns fatores limitantes que este método impõe a propagação em larga escala, como as fases fenológicas, obtenção de sementes e a segregação gênica.

Neste contexto, o presente estudo visa avaliar a capacidade e a viabilidade da propagação *in vitro* de Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet). Por meio da aplicação de hormônios vegetais administrados em diferentes concentrações e em três tipos de explantes obtidos a partir de mudas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

- ❖ Determinar um protocolo de propagação *in vitro* de Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) por meio de ápices, folhas e nódulos foliares.

### 2.2 Específicos:

- ❖ Elaborar um protocolo de assepsia que possibilite a descontaminação superficial de ápices, folhas e nódulos foliares durante o processo de estabelecimento *in vitro* dos explantes;
- ❖ Determinar o tipo de explante com maior potencial de enraizamento e/ou brotação;
- ❖ Avaliar o efeito da aplicação de diferentes hormônios, de diferentes doses e diferentes combinações de hormônios sobre o enraizamento e/ou brotação dos explantes;

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Propagação Vegetativa**

A propagação vegetativa constitui uma importante ferramenta na propagação de plantas lenhosas (Assis & Teixeira, 1998). Esse método de propagação possui algumas vantagens quando comparado com o método sexuado, que é mais tradicionalmente utilizado.

Na propagação assexuada todo o componente genético é capturado, o que resulta em maiores ganhos dentro de uma mesma geração. Mas na reprodução sexuada, somente o componente genético aditivo referente à característica superior do genótipo selecionado é obtido (Assis & Teixeira, 1998).

Verifica-se, também, na propagação sexuada de espécies alógamas, que a segregação e a recombinação gênica resultam em um alto grau de variabilidade. Já a reprodução assexuada favorece a uniformidade do desenvolvimento e do crescimento (Hartman & Kester, 1983).

Dentre os métodos de propagação assexuada mais utilizados estão a estaquia, a enxertia e a cultura de tecidos. Sendo a cultura de tecidos o método é o mais viável na clonagem de espécies lenhosas, para a formação de pomares clonais e

produção comercial de mudas, devido à total sanidade obtida, e ao crescimento mais rápido das plântulas (Kerbaudy, 1997).

### **3.2 Cultura de Tecidos Vegetais**

O cultivo *in vitro* consiste em uma técnica para desenvolver em condições de laboratório um segmento da planta chamado explante, partindo de um meio de cultura artificial, sólido ou líquido, sob condições ambientais controladas e total assepsia (Hartman & Kester, 1983).

Dentro da terminologia da cultura de tecidos, em geral, explante é qualquer segmento de tecido oriundo de uma planta para iniciar uma cultura *in vitro*, geralmente, com as vistas a estabelecer um protocolo propagação de plantas de genótipo superior (Barrueto, 1999).

Assim, o explante pode ser um ápice radicular ou caulinar, uma gema axilar um segmento de folha jovem, uma antera, um ovário ou um embrião zigótico. Esses explantes poderão ser obtidos diretamente de plantas, ou passar por uma etapa intermediária de calo, antes de a planta ser obtida (Barrueto, 1999).

O calo é uma massa desorganizada de células em constante divisão. A formação de calo detém considerável importância como processo intermediário na organogênese, assim como em estudos de morfogênese, bioquímica, citologia, genética e etiologia de doenças nas plantas (Hartman *et al.*, 1990).

Do ponto de vista organogênico, um calo é uma massa de células não diferenciadas (brotos, raízes, frutos etc...), que está em contínua proliferação celular, podendo ser compactos, friáveis, esbranquiçados ou amarelados (Barrueto, 1999).

Calos ocorrem naturalmente como resposta a injúrias, infestação de insetos ou patógenos na união de um enxerto, ou pode, ainda, ser induzido, colocando-se um pedaço de tecido vegetal dissecado em contato com um meio de cultura apropriado (Bottino 1981).

O calo é produzido nos explantes cultivados *in vitro* como resultado do ferimento ocorrido por ocasião da dissecação do tecido, e em resposta a reguladores do crescimento endógeno, ou supridos pelo meio de cultura (Hartman & Kester 1983).

Teoricamente, qualquer parte da planta pode ser utilizada para iniciar a cultura de tecidos. Porém, melhores resultados são alcançados com tecido mais jovens e ativos, que apresentam maior potencial morfogênético devido a maior divisão celular (Pasqual, 1985).

Estas células podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (Gerra, 1999). Tais mensageiros são os hormônios vegetais, que agem de forma a regular o crescimento da planta, e dependendo do seu balanço dentro do tecido, podem definir que órgãos a planta irá desenvolver.

Hormônios vegetais são compostos orgânicos não nutrientes produzidos por plantas, geralmente em um local diferente daquele onde são usados. Tais hormônios, em baixas concentrações, regulam o crescimento e as reações fisiológicas das plantas (Komamine *et al.*, 1992).

As plantas são altamente organizadas tanto em termos de forma, quanto de função. São os hormônios vegetais que coordenam e integram os processos de crescimento das plantas e que provocam esse nível de organização. O aspecto do controle do crescimento das plantas fica particularmente evidente no estudo de tecidos vegetais (Guerra, 1999).

Entretanto, se o equilíbrio entre os diferentes hormônios não for extremamente preciso, o resultado será o crescimento de massas tumorais de células vegetais, que parecerão ter perdido completamente o controle do seu poder de organização e de estruturação (Guerra, 1999).

Essas moléculas, por sua vez, são as mediadoras da síntese de enzimas específicas, isto é, moléculas protéicas que controlam a bioquímica e a fisiologia do organismo, que podem ser produzidas por meio da utilização sistemática de hormônios vegetais (Guerra, 1999).

Os hormônios vegetais podem ser agrupados em diversas classes principais. Essas classes são determinadas pelas suas características químicas ou pelos efeitos que exercem sobre as plantas.

Como no caso das auxinas que são os compostos que provocam o alongamento nas células dos brotos de plantas (Barrueto, 1999). As auxinas são sintetizadas, e apresentam as concentrações mais altas nas áreas meristemáticas do broto e da raiz, áreas nas quais as células se dividem rapidamente para renovar o seu crescimento.

As auxinas estimulam a formação de caules incisos quando aplicadas externamente. Em dosagens excessivas, porém, inibem a formação de raízes porque em geral, o tecido da raiz é consideravelmente mais sensível à auxina do que o tecido do caule (Guerra, 1999).

Embora a auxina natural mais amplamente encontrada nas plantas seja o ácido indolil-3 acético, ou AIA, este é muito menos usado na cultura de tecidos que as auxinas sintéticas, tais como o ácido indolbutírico (AIB), o ácido naftalenacético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

A adição de auxina ao meio de cultura torna-se necessária pela continuidade do crescimento do calo, porque a quantidade de calo formada está relacionada com a

concentração de auxina aplicada (Devlin 1975). Altas concentrações desse hormônio causam aumento de crescimento nos tecidos calosos.

Concentrações moderadamente altas de auxinas, acima de 1.0 mg/l, são suficientes para a determinação celular (Hartman & Kester, 1983). Define-se determinação celular como processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula torna-se limitado a uma rota específica, e competência celular, a capacidade das células reagirem a sinais específicos de desenvolvimento ativados por reguladores de crescimento (Christianson, 1985).

### **3.2.1 Fases da Cultura de Tecidos**

A micropropagação de plantas através da cultura de tecidos pode ser operacionalizada em uma sequência 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 e Read (1991) propuseram a inclusão da fase 0 (zero) nesta seqüência de operações e, desta maneira, a indução e a expressão de respostas organogênicas *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 fitoreguladores 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 morfogénicas 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:** Aclimatização: 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 tem 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 torno 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.

### **3.3 Embriogênese Somática**

Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem, através de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Williams & Maheswaran, 1986).

Este processo constitui um exemplo da expressão da “totipotencialidade” das células vegetais postulado por Haberlandt (1902), que afirma que toda célula vegetal viva possui a capacidade de regenerar uma planta inteira.

O padrão de desenvolvimento de um embrião somático em dicotiledôneas apresenta muitas características morfológicas semelhantes as do embrião zigótico. Inicialmente, ambos são caracterizados pela diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular (Guerra *et al.*, 1999).

Ambos passam pelos estádios de desenvolvimento pré-embriônários e embriônários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar num processo ontogenético que pode ser sub-dividido em vinte diferentes estádios que representam três grandes eventos (Jurgens & Mayer, 1992).

As principais diferenças entre os embriões somáticos e zigóticos relacionam-se com o fato de os embriões somáticos se desenvolvem livres de correlações físicas, fisiológicas e genéticas que ocorrem durante o desenvolvimento de um embrião zigótico (Zimmermann, 1993) e poderem apresentar desenvolvimento anormal.

A embriogênese somática *in vitro* é um método importante para propagação massal clonal de genótipos superiores. Nesse processo células haplóides ou diplóides (somáticas), em diferentes estádios de diferenciação, podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos a reprogramarem-se a fim de adquirirem novas competências morfogenéticas (Guerra, 1999).

Dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática são comumente observados *in vitro* (Sharp *et al.*, 1980). O primeiro corresponde ao modelo direto no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos (Guerra *et al.*, 1999).

O segundo padrão corresponde ao modelo indireto no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente com diferentes graus de determinação (Guerra *et al.*, 1999).

### **3.3.1 Enraizamento *in vitro***

A fase de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas do caule provenientes da multiplicação. A rizogênese ocorre de uma a três semanas e segundo Hartmann & Kester (1990), divide-se em iniciação e alongação das raízes.

A obtenção de uma planta com um sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para sua sobrevivência e crescimento nas novas condições ambientais. O tipo do sistema de raízes, obtido no enraizamento *in vitro*, também determina o sucesso do transplante, sendo as raízes mais curtas as mais adequadas, uma vez que apresentam-se na fase de crescimento ativo, facilitando a “pega” da planta (Grattapaglia & Machado, 1990).

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

## **3.4 FATORES QUE AFETAM A PROPAGAÇÃO *IN VITRO***

A propagação de plantas via cultura de tecidos esta sujeita a uma série de fatores. 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 do estudo.

### 3.4.1 Fonte de explante

A fonte de explante deve ser cuidadosamente selecionada. Uma vez que o tipo de explante utilizado muitas vezes determina o grau de sucesso na cultura de tecidos. Explantes juvenis provenientes de sementes e partes juvenis de plantas adultas são os mais indicados, embora tecidos maduros de folhas e flores sejam igualmente utilizados (Teixeira *et al.*, 1993).

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, discos caulinares, embriões, segmentos radiculares, calos e ainda sementes (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 temperaturas, deficiência mineral e ataque de pragas ou doenças (Teixeira *et al.*, 1993).

O ápice caulinar, por ser um sítio ativo de biossíntese de auxinas, dispensaria auxinas exógenas na fase inicial da cultura de tecidos, principalmente quando retirados de plantas em pleno crescimento ativo (Hu & Wang 1984).

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

### 3.4.2 Fitossanidade

A contaminação dos explantes é um dos principais problemas do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas (Pierik, 1990). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. Quando os explantes contaminados são inoculados, ocorre uma rápida infestação do meio de cultura, e o explante tem que ser descartado.

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

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 do 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 nesta 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 ápice estão em divisão ativa, o RNA, dos vírus 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.

Sendo assim, os protocolos de assepsia existem a fim de se obter explantes livres de microorganismos (Grattapaglia & 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.

Dessa forma, e sugerido o uso do etanol, do hipoclorito de sódio e do hipoclorito de cálcio como substâncias desinfestantes (Grattapaglia & Machado 1998). Estes são aplicados tanto diretamente na planta ainda no substrato, quanto nos explantes já cortados, e também acrescidos no meio de cultura.

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).

### **3.4.3 Composição mineral do meio de cultura**

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 Gamborg 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 (Amirato, 1983).

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

### **3.4.4 Morfogênese e Fitorreguladores**

Apesar dos avanços verificados no estudo da cultura de tecidos vegetais, ainda é limitada a compreensão dos estímulos e condições necessárias para a indução e controle do processo de indução da formação de órgãos e tecidos por meio do uso de fitorreguladores (Guerra, 1999).

A possibilidade de manipulação deste sistema experimental para fins tecnológicos depende do domínio preciso de princípios de fisiologia do desenvolvimento. Desta

maneira morfogênese pode ser conceituada como a integração entre os processos decorrentes da divisão e diferenciação celular (Christianson,1985).

Em geral, na maioria dos modelos de embriogênese induzida *in vitro*, os hormônios vegetais são considerados as substâncias responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação e rediferenciação, de forma a alterar determinar e conferir novas competências às células responsivas presentes nos explantes (Ammirato, 1989).

Como no princípio da cultura de tecidos no qual as células vivas que não perderam a capacidade de se dividir forem removidas de uma planta, poderão retomar o crescimento ativo se receberem nutrientes essenciais e hormônios de crescimento.

Por outro lado, ao alterar o equilíbrio e a concentração de hormônios de plantas no meio de cultura, pode-se desenvolver plantas completas com raiz e copa e todas as características típicas de uma planta gerada pelo método sexuado de propagação a partir de uma única célula (Atree *et al.*, 1990).

Ainda não se conhece muito bem o funcionamento dos hormônios vegetais em termos da química celular das plantas. Entretanto, atualmente, acredita-se que um local de atuação dos hormônios vegetais seja próximo ao gene, onde promovem a formação de moléculas específicas de RNA mensageiro (Guerra, 1999).

#### **3.4.5 Fatores ambientais**

As atividades das enzimas da biossíntese bem como as da oxidação são estimuladas pela luz (Creasy, 1968). Desta forma, os problemas relacionados à oxidação são menores em explantes derivados de plantas mantidas no escuro ou em baixa intensidade luminosa no período que antecede a excisão do explante (Durand-Cresswell *et al.*, 1982).

O estabelecimento das culturas pode ter melhores resultados caso os explantes sejam cultivados no escuro ou em baixa intensidade luminosa durante as primeiras semanas de cultivo (Durand-Cresswell *et al.*, 1982). Mesmo após este período, o cultivo em condições de luminosidade intermediária contribui para prevenir a oxidação e melhorar o crescimento do explante.

## **4. ESPÉCIE ESTUDADA**

### **4.1 Andiroba**

Esta espécie pertencente à família Meliaceae possui apenas uma espécie relacionada, a *Carapa procera*. Essas duas espécies se distinguem pelas seguintes características: as plântulas da *C. procera* ao germinar emitem em média seis folhas simples, enquanto que a *C. guianensis* emitem folhas compostas (Fisch *et al.*, 1995).

E ainda, as sementes de *Carapa guianensis* apresentam hilo maior do que as de *C. procera*; o hilo não possui uma saliência delimitante e normalmente apresenta resíduos de tecidos da placentação aderidos (Lorenzi, 1992).

#### **4.1.1 Descrição e fenologia**

Árvore grande podendo atingir até 55m de altura, com fuste cilíndrico e reto de 20-30m. A casca é grossa e amarga, de cor avermelhada ou acinzentada e desprende-se em grandes placas. A copa, de tamanho médio, é densa e composta por ramos eretos. As folhas são alternas, compostas e paripinadas, com vestígio de um folíolo terminal; medem geralmente entre 50 e 75cm de comprimento, chegando até 90cm (Alencar *et al.*, 1979).

Cada folha possui 3-10 pares de folíolos opostos ou sub-opostos, com 10-50cm de comprimento; o ápice dos folíolos varia entre acuminado, agudo e arredondado, enquanto a base é desigual e assimétrica. A inflorescência é uma panícula de 20-80cm de comprimento; as flores são unissexuais com quatro meras, de cor branca a creme, levemente perfumado e 4,5-7mm comprimento (Ribeiro *et al.*, 1999).

A planta é monóica. O fruto é uma cápsula com quatro valvas, de forma globosa ou sub-globosa, medindo geralmente entre 5 e 11cm de diâmetro e pesando entre 90 e 540g; cada fruto pode conter entre 1 e 16 sementes. As sementes de cor marrom podem apresentar grande variação de forma e tamanho; foram encontradas sementes pesando entre um e 70g e medindo entre 1 e 6cm de comprimento (Ribeiro *et al.*, 1999).

A plântula apresenta epicótilo com 9-17cm de altura quando surgem as primeiras folhas, que são alternas, glabras, normalmente compostas, paripinadas ou imparipinadas. O hipocótilo não se desenvolve e os cotilédones permanecem na semente. Neste estágio, a raiz primária é comprida, lenhosa, resistente e de coloração marrom; as raízes secundárias são finas, densas e de cor castanho claro (Ribeiro *et al.*, 1999).

#### **4.1.2 Usos**

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 (Loureiro *et al.*, 1979).

O óleo é usado na preparação de sabão e de cosméticos. Recentemente, a Fundação Oswaldo Cruz lançou no mercado velas de andiroba que são indicadas

para repelir mosquitos transmissores de doenças, como o da dengue e o da malária (Ferraz *et al.*, 2002).

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. Popularmente, o chá da casca e das flores é usado como remédio para combater infecção bacteriana e o chá do cerne como fungicida (Clay *et al.*, 2000).

#### **4.1.3 Floração e frutificação**

Na região de Manaus, floresce anualmente entre dezembro e março e os frutos podem ser coletados entre abril e julho. Porém, em casos isolados, foram observados frutos maduros ao longo do ano (Ribeiro *et al.*, 1999).

#### **4.1.4 Propagação vegetativa**

Não foram encontradas informações sobre métodos vegetativos.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram instalados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola Superior de Tecnologia - EST, localizado na Avenida Darcy Vargas, 1220, Parque Dez, Manaus - AM, entre os meses de agosto de 2004 e dezembro de 2005.

### **5.1 Preparo do material vegetativo**

As sementes foram coletadas diretamente das árvores, em plantios existentes na Reserva Florestal Adolpho Ducke, no km 26 da rodovia Am 010 em Manaus - AM. E foram desinfetadas em solução de fungicida sistêmico Benlate (3g/L) por 24 horas e foram imersas por 30 minutos em solução aquosa contendo hipoclorito a 20 por cento (figura 1).

Figura 1: Sementes de Andiroba em processo de assepsia com benlate (1) e hipoclorito de sódio (2).



Foto: Hélio Leonardo

Em seguida, foram postas para germinar em recipientes plásticos contendo como substrato areia lavada coberta por vermiculita como pode ser observado na figura 2.

Figura 2: Mudanças de Andiroba Germinadas em bandeja plástica contendo areia lavada coberta com vermiculita como substrato.



Foto: Hélio Leonardo

Após o período de germinação as plântulas foram desinfetadas três vezes por semana por meio de borrifamento de Benlate (3g/L). Ao atingirem aproximadamente vinte centímetros de altura os explantes foram coletados.

## 5.2 Explantes

Os explantes testados foram obtidos de três diferentes fontes: Ápices caulinares, nódulos foliares e folhas, como mostra a figura 3. Estes foram excisados com o auxílio de tesoura e acondicionados em copos plásticos durante o processo de coleta.

Figura 3: Caracterização do tipo de explantes testados: a – explante apical; b – nódulo foliar; c – explante foliar.

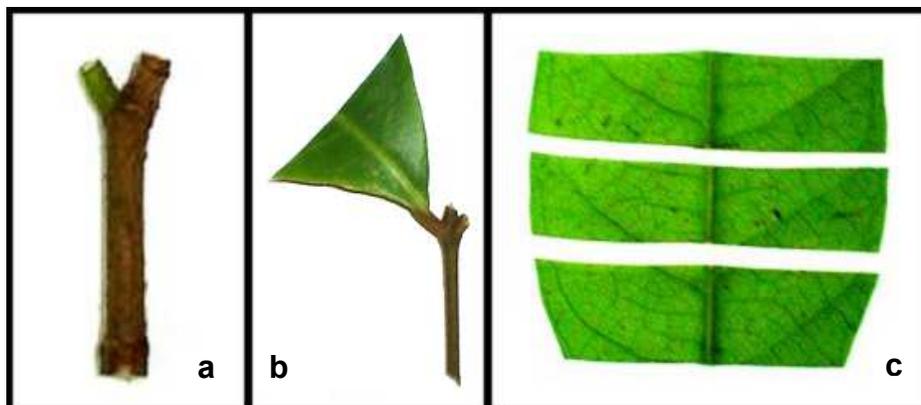


Foto: Hélio Leonardo

### 5.3 Assepsia dos explantes

Os explantes foram lavados em água corrente por vinte minutos e imersos em solução de Benlate. Na câmara de fluxo laminar, foram imersos em solução contendo hipoclorito a vinte por cento acrescido de Tween - 20. Seguindo-se de três lavagens em água destilada e autoclavada, e só então foram inoculados.

### 5.4 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o meio de Murashige & Skoog (1962), com pH ajustado em 5,8. Os meios foram esterilizados por 15 minutos, através da autoclavagem ajustada a 1,5 atm e 121 °C. E Então foram mantidos em uma sala com temperatura de 25°C, e fotoperiodismo artificial de 16 horas por dia.

### 5.5 Hormônios

Os grupos hormônios que foram utilizados neste estudo foram os seguintes:

#### Auxinas

- Ácido-indol-butírico AIB
- Ácido-naftaleno-acético ANA

- Diclorophenoletano 2-4-D

### Citocininas

- Tidiazuron TDZ
- Benzilaminopurina BAP

## 5.6 Desenho experimental

Este estudo foi composto por quatro fases subseqüentes, todas compostas por delineamento inteiramente casualizado - DIC, são elas:

Fase 1 – Assepsia: Nesta fase os explantes foram submetidos a três diferentes protocolos de assepsia. Os quais compuseram os tratamentos descritos no quadro 1. O numero de repetições utilizada em cada protocolo de assepsia foi 100.

Quadro 1. Composição dos protocolos de assepsia aplicados na fase 1 do estudo.

Protocolos de Assepsia	Benlat e 3g/l 2 horas	Benlat e 6g/l 2 horas	Benlat e 3g/l 24 horas	Benlat e 6g/l 24 horas	Hipoclorito 20%	Tween ~1%	Antibiótico Cloraphenicol 250 mg/l
Protocolo 1	X				X	X	
Protocolo 2		X			X	X	
Protocolo 3			X		X	X	
Protocolo 4				X	X	X	
Protocolo 5				X	X	X	X

\* Obs: Caso haja necessidade, novos protocolos de assepsia poderão ser testados.

O tratamento que apresentou menores taxas de contaminação forneceu os explantes para as fases seguintes.

Fase 2 – Hormônios 1: Nesta fase somente os explantes obtidos de folhas foram submetidos a aplicação de hormônios. Foram utilizados oito tratamentos (doses dos hormônios) mais o tratamento testemunha. As doses utilizadas foram 1,5 e 3,0 mg/l dos seguintes hormônios: AIA, ANA, 2,4-D e BAP. Foram utilizadas doze repetições por tratamento. O quadro dois representa a tabela utilizada para distribuir os tratamentos nesta fase.

Quadro 2: Doses de hormônios aplicadas nos explantes na fase 2 do experimento.

<b>2,4-D</b>	<b>2,4-D</b>	<b>BAP</b>	<b>BAP</b>	<b>AIA</b>	<b>AIA</b>	<b>ANA</b>	<b>ANA</b>	<b>Testemunha</b>
<b>1,5mg/l</b>	<b>3,0mg/l</b>	<b>3,0mg/l</b>	<b>5,0mg/l</b>	<b>1,5mg/l</b>	<b>3,0mg/l</b>	<b>1,5mg/l</b>	<b>3,0mg/l</b>	<b>0,0mg/l</b>
<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>	<b>T9</b>

Fase 3 – Esta fase, para os explantes obtidos de folhas, foi composta de 21 tratamentos com 15 repetições como descrito no quadro três.

Quadro 3. Doses combinadas de hormônios aplicada a explantes obtidos de folhas na fase 3 do experimento.

		<b>AIA</b>	<b>AIA</b>	<b>ANA</b>	<b>ANA</b>	<b>2.4 - D</b>	<b>2.4 - D</b>
<b>BAP</b>	<b>0,0</b>	<b>3,0</b>	<b>6,0</b>	<b>3,0</b>	<b>6,0</b>	<b>3,0</b>	<b>6,0</b>
<b>0,0</b>	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
<b>5,0</b>	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
<b>0,0</b>	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21

Já para os explantes obtidos de nódulos foliares esta fase foi composta de 15 tratamentos com 10 repetições, como pode ser visto no quadro quatro.

Quadro 4: Doses combinadas de hormônios aplicada a explantes obtidos de nódulos foliares na fase 3 do experimento.

		<b>AIA</b>	<b>AIA</b>	<b>ANA</b>	<b>ANA</b>
<b>TDZ</b>	<b>0,0</b>	<b>5,0</b>	<b>10,0</b>	<b>5,0</b>	<b>10,0</b>
<b>0,0</b>	T1	T2	T3	T4	T5
<b>5,0</b>	T6	TT7	T8	T9	T10
<b>10,0</b>	T11	T12	T13	T14	T15

Para os explantes apicais, esta fase constara de três tratamentos com 10 repetições, com o descreve o quadro cinco.

Quadro 5: Doses combinadas de hormônios aplicada a explantes obtidos de ápices na fase 3 do experimento.

	<b>ANA</b>	<b>ANA</b>
<b>BAP</b>	<b>5,0</b>	<b>10,0</b>
<b>0,0</b>	T1	T2
<b>5,0</b>	T3	T4

## 5.7 Coleta de dados

Fase 1: Nesta fase os dados foram coletados em intervalos de 30 dias durante 90 dias, e os dados coletados foram:

- N° de explantes contaminados por fungos;
- N° de explantes contaminados por bactérias;
- N° de explantes sobreviventes.

Fase 2: Nesta fase os dados foram coletados em uma única coleta após 30 dias de implantação do experimento, e os dados coletados foram:

- N° de explantes enraizados;
- N° de raízes por explante;
- N° de explantes com brotos;
- N° de brotos por explante;
- N° de explantes com calos;

- N° de calos por explante;
- N° de explantes não contaminados.

Fase 3: Os dados foram coletados uma só vez aos 120 dias de implantação do experimento, e os dados coletados foram:

- N° de explantes enraizados;
- N° de raízes por explante;
- N° de explantes com brotos;
- N° de brotos por explante;
- N° de explantes com calos;
- N° de calos por explante;
- N° de explantes não contaminados.

## 5.7 Análise dos dados

Em todas as fases do estudo o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado – DIC.

**Fase 1:** Os dados foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0.5$  e as médias foram analisadas pelo teste de TUKEY. Os explantes foram inoculados em frascos com 30ml de meio, sendo três explantes por frasco. As avaliações foram feitas por meio de observação direta e contagem do número de explantes não contaminados.

**Fase 2:** Os dados foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0.5$  e as médias foram analisadas pelo teste de TUKEY. Os explantes foram inoculados em tubos de 55 ml com 10 ml de meio. E foram avaliados após trinta dias. A Avaliação de brotos e raízes foi feita por meio da contagem direta do número destes que

partiam dos explantes, já para os calos foi atribuído os seguintes valores: 0 (zero)-para ausência de calo; 1 (um) – para pouca ocorrência de calos; 2 (dois) – para média ocorrência de calos e 3 (três) – para grande ocorrência de calos.

### **Fase 3:**

Folhas: Os dados foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0.5$  e as médias foram analisadas pelo teste de TUKEY. Os explantes foram inoculados em frascos contendo 30 ml de meio, sendo três explantes por frasco. A Avaliação de brotos e raízes foi feita por meio da contagem direta do número destes que partiam dos explantes, já para os calos foi atribuído os seguintes valores: 0 (zero)-para ausência de calo; 1 (um) – para pouca ocorrência de calos; 2 (dois) – para média ocorrência de calos e 3 (três) – para grande ocorrência de calos.

Nódulos foliares: Os dados foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0.5$  e as médias foram analisadas pelo teste de TUKEY. Os explantes foram inoculados em tubos de 55 ml com 10 ml de meio. A Avaliação de brotos e raízes foi feita por meio da contagem direta do número destes que partiam dos explantes, já para os calos foi atribuído os seguintes valores: 0 (zero)-para ausência de calo; 1 (um) – para pouca ocorrência de calos; 2 (dois) – para média ocorrência de calos e 3 (três) – para grande ocorrência de calos.

Ápices: For Os dados foram transformados para raiz quadrada de  $x + 0.5$  e as médias foram analisadas pelo teste de TUKEY. A Avaliação de brotos e raízes foi feita por meio da contagem direta do número destes que partiam dos explantes, já para os calos foi atribuído os seguintes valores: 0 (zero)-para ausência de calo; 1 (um) – para pouca ocorrência de calos; 2 (dois) – para média ocorrência de calos e 3 (três) – para grande ocorrência de calos.

**Fase 4:** As avaliações foram realizadas após trinta dias. Quando foi tirada a porcentagem de plântulas sobreviventes.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Folhas**

#### **6.1.1 Fase 1**

Observou-se durante os testes preliminares que o tipo de explante que mostrou maior resistência aos protocolos de assepsia testados foram os obtidos de folhas maduras, os quais apresentaram coloração mais escura.

Este explante mostrou menor ocorrência de oxidação ou dano relevante ao tecido quando comparado com explantes obtidos de folhas mais jovens, que apresentaram coloração mais clara (figura 4).

Tal fato levou a definição o tipo de explante foliar testado como folha madura, de acordo com a figura 4, sendo assim, tomou-se para este estudo: folha madura (1), folha semi-jovem (2) e folha jovem (3).

**Figura 4:** Tipo de folhas que forneceu os explantes: 1 - folha madura; 2 - folha semi-jovem e 3-folhas jovem.

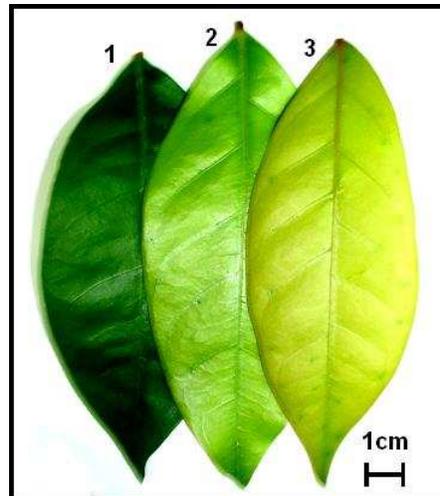
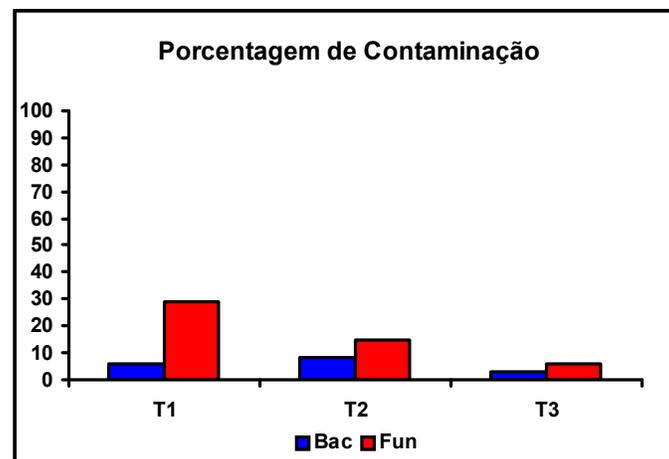


Foto: Hélio Leonardo

Como pode ser observado na figura 5. Os melhores resultados foram obtidos com o protocolo 3. No qual obteve-se uma satisfatória diminuição da porcentagem de contaminação dos explantes, 3% para bactérias e 6% para fungos.

**Figura 5:** Porcentagem de contaminação por bactérias e por fungos de explantes foliares tratados com Benlate, Tween e Hipoclorito.



### 6.1.2 Fase 2

Na tabela 1 pode-se observar que os tratamentos com ANA (7 e 8) apresentaram diferença significativa abaixo de 1%. Os tratamentos com AIA (5 e 6) também induziram o enraizamento (fig 6 a), porém não houve diferença significativa. Os outros tratamentos (1, 2, 3, 4 e 9) não induziram a rizogênese.

**Figura 6:** Raízes em explantes foliares de Andiroba tratados com 3.0mg/l de ANA (a), e calos em explantes foliares tratados com 3,0mg/l de 2,4-D (b) após 30 dias.

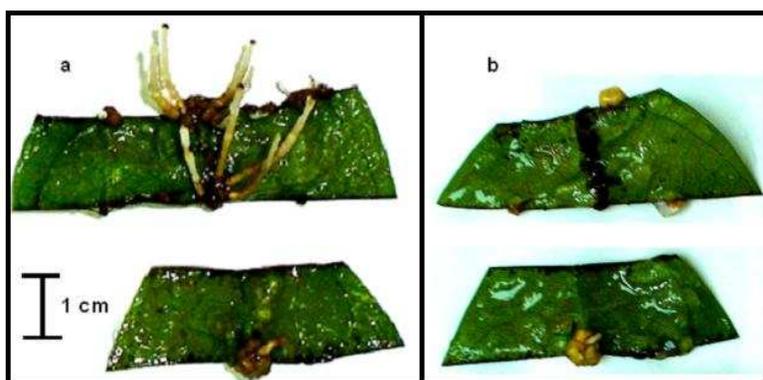


Foto: Hêlio Leonardo

Os tratamentos onde houve formação de calo (fig 6 b) foram o 1, 2, 5 e 6. Sendo que as maiores médias foram obtidas no tratamento com 2,4-D (1 e 2). A significância foi abaixo de 1%, e as médias dos demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si.

**Tabela 1:** Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes foliares tratados com doses de AIA ANA 2,4-D e BAP após 30 dias.

MÉDIAS	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	F
ENRAIZAMENTO	0.71B	0.71B	0.71B	0.71B	0.81B	0.81B	1.81A	1.88A	0.71B	<0,01
BROTAÇÃO	0.71A									
CALOGÊNESE	1.37A	1.45A	0.71B	0.71B	0.81B	0.81B	0.71B	0.71B	0.71B	<0,01

Enraizamento: D.P. = 0.38; ERRO PADRAO = 0.17; MÉDIA GERAL = 1.0; C.V. = 18.19.  
Calogênese: D.P. = 0.21; ERRO PADRAO = 0.09; MÉDIA GERAL = 0.89; C.V. = 13.46.

### 6.1.3 Fase 3

Pode-se observar na figura 7 que ocorreu formação de calos (7 a) e raízes (7 b) nesta fase. A tabela 2 mostra que o tratamento 19 (10,0mg/l de ANA e 10,0mg/l de BAP) obteve a maior média de enraizamento com uma diferença significativa dos demais tratamentos a um nível de 1%.

**Figura 7:** Calos em explantes foliares tratados com 10,0mg/l de 2,4-D e 10,0 mg/l de BAP (a) Raízes em explantes foliares tratados com 10,0 mg/l de ANA e 10,0mg/l de BAP (b), após 30 dias.

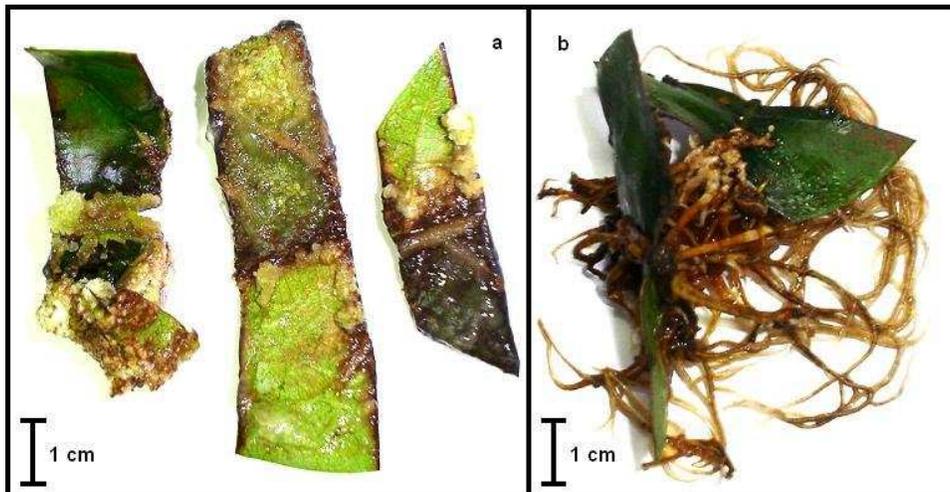
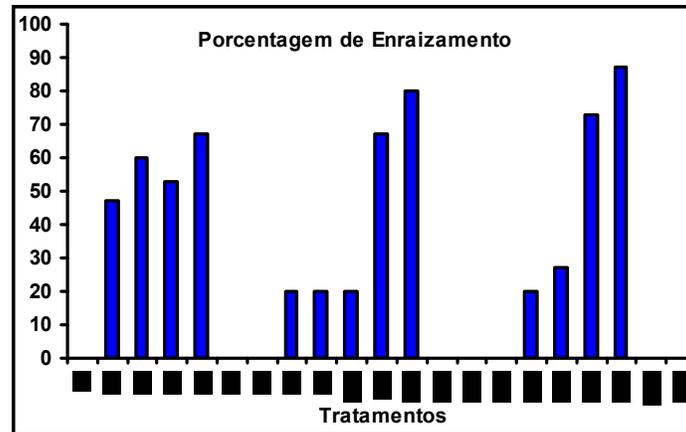


Foto: Hélio Leonardo

Seguido dos tratamentos 18 11 e 12, os quais não apresentaram diferença significativa entre si. Nos tratamentos 1, 6, 7, 13, 14, 15, 20 e 21 não ocorreu o indução ao enraizamento, como pode ser observado na figura 8 e a maior porcentagem de enraizamento ocorreu no tratamento 19 (90%).

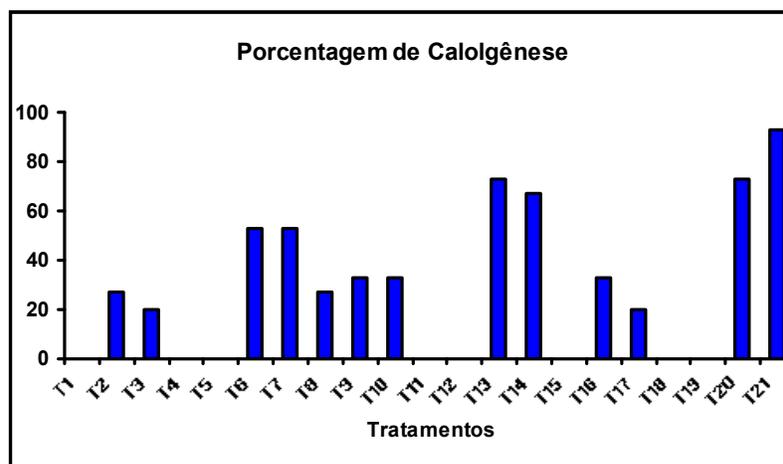
Figura 8: Porcentagem de enraizamento de explantes foliares tratados com ANA, AIA, 2,4-D e BAP após 30 dias.



Nesta fase não houve ocorrência de brotos nos explantes nesta fase do experimento.

O tratamento 21 (fig 9) foi o que apresentou a maior média de calogênese (10,0mg/l de 2,4-D e 10,0mg/l de BAP). Como mostra a figura 9, a maior porcentagem de calogênese foi encontrada respectivamente nos tratamentos 6, 7, 14, 13, 20 e 21, e não ocorreu formação de calos nos tratamentos 1, 4, 5, 11, 12, 18 e 19.

**Figura 9:** Porcentagem de calogênese de explantes foliares tratados com ANA, AIA, 2,4-D e BAP após 30 dias.



**Tabela 2:** Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes foliares tratados com doses combinadas de AIA ANA 2,4-D e BAP após 30 dias.

MÉDIAS	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	F
<b>ENRAIZAMENTO</b>	0.7 D	1.1 D	1.1 D	2.1B C	2.2 B	0.7D B	0.7D B	1.1 D	1.1C D	1.2C D	<b>2.7A</b> B	<b>2.7A</b> B	0.7D D	0.7D D	0.7 D	1.1C D	1.2C D	<b>3.1A</b> B	<b>3.3</b> A	0.7 D	0.7 D	<0, 01
<b>BROTAÇÃO</b>	0.7 1A	0.7 1A	0.7 1A	0.71 A	0.7 1A	0.71 A	0.71 A	0.7 1A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.7 1A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.7 1A
<b>CALOGÊNESE</b>	0.7 1D	1.0 C	0.9 C	0.71 D	0.7 1D	<b>1.6A</b> B	<b>1.7A</b> B	1.0 C	0.9C C	0.9C D	0.71 D	0.71 D	<b>1.9A</b> B	<b>1.8A</b> B	1.0 C	0.9C C	1.0C D	0.71 D	0.71 D	<b>2.1</b> AB	<b>2.3A</b> 01	<0, 01

\*Enraizamento: D.P. = 0.43; ERRO PADRAO = 0.19; MÉDIA GERAL = 1.4; C.V. = 20.52

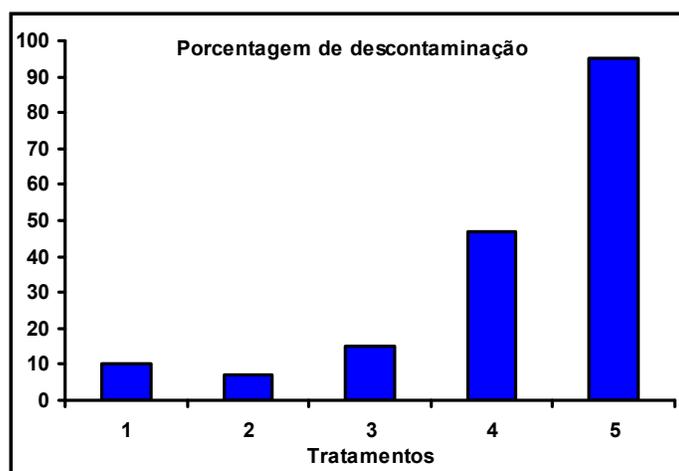
\*Calogênese: D.P. = 0.30; ERRO PADRAO = 0.13; MÉDIA GERAL = 1.16; C.V. = 15.30.

## 6.2 Nódulos foliares

### 6.2.1 Fase 1

Particularmente, este tipo de explante respondeu bem aos protocolos de assepsia. Apesar das altas taxas de contaminação encontradas nos tratamentos 1, 2, 3 e 4, (fig 10) com o protocolo 5 obteve-se um percentual de descontaminação de 95%.

**Figura 10:** Porcentagem de descontaminação de explantes foliares tratados com Benlate, Tween e Hipoclorito.



### 6.2.2 Fase 2

Nesta fase obteve-se a maior média de enraizamento no tratamento 8 (tab 3). Seguido pelo tratamento 7, ambos compostos por ANA 1,5mg/l e 3,0mg/l respectivamente. A significância obtida foi abaixo de 0,01%.

Não houve ocorrência de brotação neste tipo de explante.

As maiores médias de calogênese foram obtidas nos tratamentos 2 e 1 respectivamente, como pode ser observado na tabela 3. Estes tratamentos

continham 2,4-D nas concentrações de 1,5mg/l e 3 mg/l. Os tratamentos 3, 4, 7, 8, e 9 não induziram a formação de calos e os tratamentos 5 e 6 induziram calogênese mas sem diferença significativa.

Tabela 3: Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes foliares tratados com doses de AIA ANA 2,4-D e BAP após 30 dias.

MÉDIAS	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	F
<b>ENRAIZAMENTO</b>	0.71D	0.71D	0.71D	0.71D	0.99CD	1.05BC	1.36B	1.75A	0.71D	<0,01
<b>BROTAÇÃO</b>	0.71A	0.71A	0.71A	0.71A	0.71A	0.71A	0.71A	0.71A	0.71A	
<b>CALOGÊNESE</b>	1.47B	1.71A	0.71D	0.71D	0.96C	1.10C	0.71D	0.71D	0.71D	<0,01

Enraizamento: D.P. = 0.24; ERRO PADRAO = 0.07; MÉDIA GERAL = 0.9; C.V. = 15.04.  
Calogênese: D.P. = 0.16; ERRO PADRAO = 0.05; MÉDIA GERAL = 0.99; C.V. = 16.72.

### 6.2.3 Fase 3

A figura 11 mostra que houve incidência de calos e raízes neste tipo de explante. E a figura 12 apresenta a forma característica que este explante forma calos.

Figura 11: Explantes foliares enraizados com doses combinadas de ANA e TDZ na fase 3 do experimento aos 30 dias.



Foto: Hélio Leonardo

**Figura 12:** Calos em explantes foliares tratados com doses combinadas de ANA e TDZ na fase 3 do experimento aos 30 dias.



Foto: Hélio Leonardo

A tabela 4 mostra que as combinações de ANA de 10,0mg/l e BAP 0,0, 5,0 e 10,0 mg/l respectivamente, aplicadas nos tratamentos 5, 10 e 15 obtiveram os maiores valores de enraizamento, e apresentaram diferença significativa abaixo de 1%.

Nos tratamentos 1, 6 e 11 não houve ocorrência de enraizamento, e os demais tratamentos induziram a formação de raízes mas sem diferença significativa entre si.

Não houve ocorrência de brotos nos explantes nesta fase.

As médias de calogênese apresentaram significância abaixo de 0,01%. Sendo que as maiores médias foram obtidas nos tratamentos com doses combinadas de TDZ e AIA nos tratamentos 7 e 8, como mostra a tabela 4. Não houve incidência de calogênese nos tratamentos 1, 4, 5, 9, 10, 11, 14 e 15. Já nos tratamentos 2, 3, 6, 12 e 13 ocorreu diferença significativa, mas em valores médios.





Tabela 4: Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes obtidos de nódulos foliares tratados com doses combinadas de AIA ANA e TDZ após 40 dias.

MÉDIAS	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	F
<b>ENRAIZAMENTO</b>	0.7D	0.99BC	0.96BC	1.64 B	2.74 A	0.7C	0.99BC	0.96BC	1.1C D	2.74 A	0.71 C	0.99BC	0.98BC	1.65 B	2.77 A	<0,01
<b>BROTAÇÃO</b>	0.71 A	0.71A	0.71A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.71A	0.71A	0.71 A	0.71 A	0.71 A	0.71A	0.71A	0.71 A	0.71 A	
<b>CALOGÊNESE</b>	0.71 D	1.3B	1.3B	0.71 D	0.71 D	0.8C D	1.7A	1.8A	0.71 D	0.71 D	0.71 D	1.0BC D	1.1BC D	0.71 D	0.71 D	<0,01

\*Enraizamento: D.P. = 0.53; ERRO PADRAO = 0.17; MÉDIA GERAL = 1.4; C.V. = 27.58

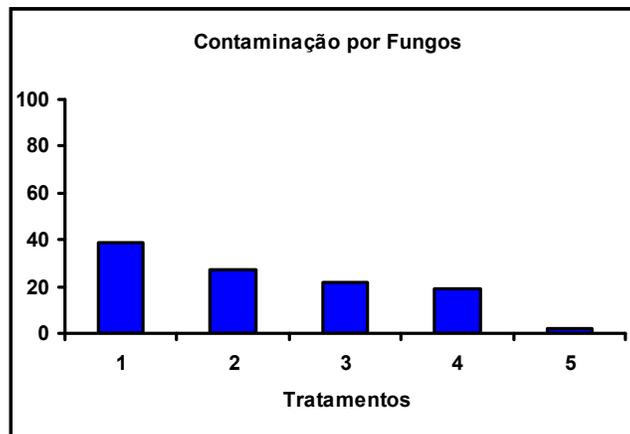
\*Calogênese: D.P. = 0.20; ERRO PADRAO = 0.07; MÉDIA GERAL = 0.99; C.V. = 22.64.

## 6.3 Ápices

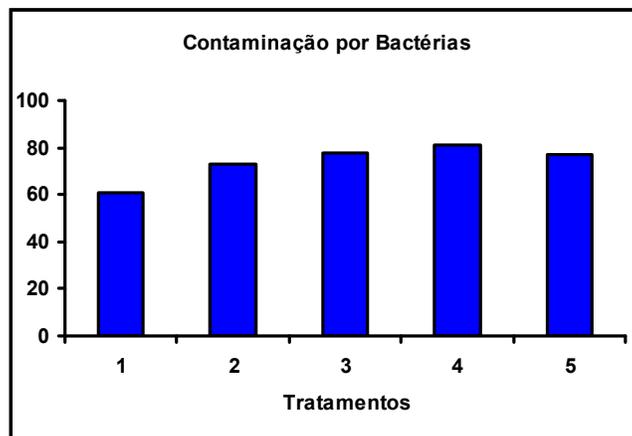
### 6.3.1 Fase 1

Este tipo de explante apresentou razoável taxa de contaminação por fungos, como mostra a figura 13. Esta contaminação diminuiu de acordo com o aumento da concentração e do tempo de exposição ao fungicida. Porém, os níveis de contaminação por bactérias (fig 14) se mantiveram altos em todos os protocolos testados, até mesmo no tratamento cinco.

**Figura 13:** Porcentagem de contaminação por fungos em explantes apicais tratados com Benlate, Tween, Hipoclorito a Cloraphenicol em cinco diferentes soluções de descontaminação.



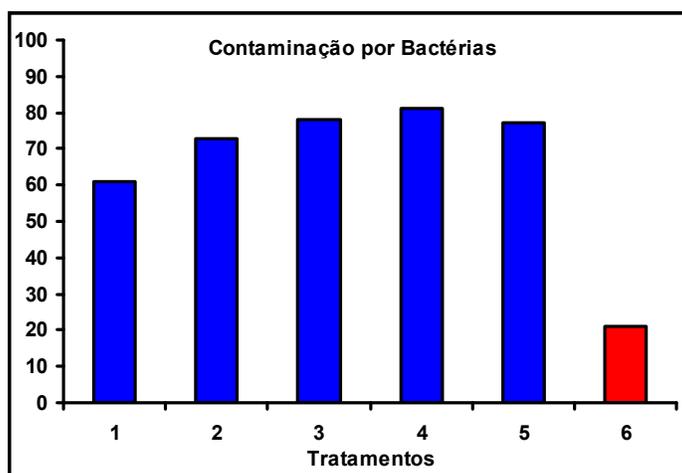
**Figura 14:** Porcentagem de contaminação por bactérias em explantes apicais tratados com Benlate, Tween, Hipoclorito a Cloraphenicol em cinco diferentes soluções de descontaminação.



Mesmo neste último caso o nível de contaminação foi bastante alto (75%), devido a esse fato, um novo protocolo de assepsia foi acrescentado ao estudo especificamente para esta fonte de explante, este constou de: Benlate 6g/l por 24h + Ampicilina 500mg/l + hipoclorito (solução comercial) a 20 % + tween.

Os resultados deste novo protocolo estão descritos na figura 15. Onde pode-se observar que a contaminação por bactérias diminuiu para 19%, o que inviabilizou a continuidade do estudo.

**Figura 15:** Porcentagem de contaminação por bactérias em explantes apicais tratados com Benlate, Tween, Hipoclorito a Cloraphenicol (t1, t2, t3, t4, t5) e Ampicilina (t6) em seis diferentes soluções de descontaminação.



### 6.3.2 Fase 3

Pela observação da tabela 5 pode-se observar que não houve diferença significativa entre as médias de enraizamento. Já nas médias de brotação observa-se que os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos 3 e 4 que continham ANA (5,0mg/l e 10,0mg/l respectivamente) e BAP (5,0mg/l), nestes casos o nível de significância ficou abaixo de 1%.

A figura 16 a mostra o padrão de brotação dos ápices, e a figura 16 b mostra uma plântula de andiroba obtida via cultura de tecidos no tratamento 4 (tab 5).

**Figura 16:** Brotos em Ápices de Andiroba tratados com BAP e ANA na fase 3 deste estudo aos 30 dias (a); Plântula de andiroba gerada via embriogênese somática no tratamento 4 com 10,0mg/l de ANA e 5,0mg/l de BAP aos 30 dias.

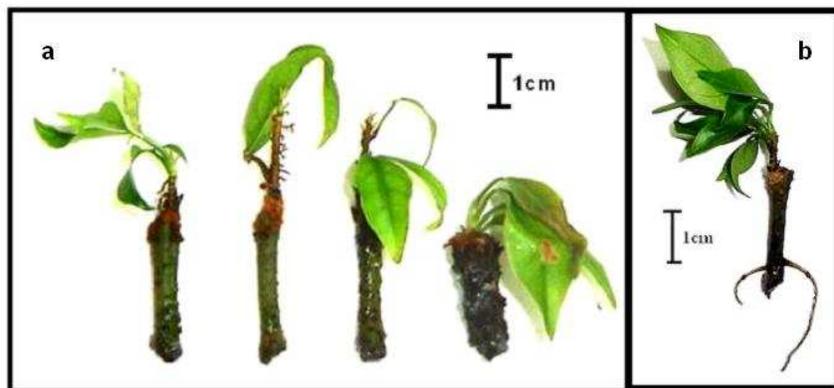


Foto: Hélio Leonardo

Não houve ocorrência de calos em nenhum dos tratamentos testados nesta fase.

Tabela 5: Médias dos valores de enraizamento, brotação e calogênese de explantes obtidos de ápices tratados com doses combinadas de ANA e BAP após 30 dias.

Médias	T1	T2	T3	T4	F
<b>Enraizamento</b>	1,24A	1,42A	1,20A	1,33A	NS
<b>Brotação</b>	0,93B	0,99B	1,33A	1,37A	<0,01
<b>Calogênese</b>	0,71	0,71	0,71	0,71	

Enraizamento: D.P. = 0.47; ERRO PADRAO = 0.15; MÉDIA GERAL = 1.3; C.V. = 16.72.  
 Brotação: D.P. = 0.28; ERRO PADRAO = 0.09; MÉDIA GERAL = 1,14; C.V. = 36.45.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Assepsia

Os protocolos de assepsia testados foram sendo adaptados de acordo com as respostas fitossanitárias dos explantes. No geral, a utilização do Benlate reduziu a contaminação por fungos a níveis baixos quando comparado com Emrich *et. al*, (2005), que reduziu a contaminação fungica a 0% utilizando o benlate em explantes foliares de Cajuí.

Estes resultados vão de acordo com Teixeira, (1993), que sugere o uso de Benlate no combate a contaminação fungica endógena, e também. E como se esperava, o aumento da concentração e do tempo de exposição ao fungicida diminuiu a incidência de contaminação por fungos.

A contaminação por bactérias seguiu o mesmo princípio acima nos explantes foliares e nos nódulos foliares. No entanto, os explantes apicais necessitaram do acréscimo de um novo protocolo de assepsia devido às altas taxas de contaminação por bactérias apresentadas nos cinco primeiros protocolos de assepsia.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as contaminações bacterianas endógenas freqüentemente representam sério problema no estabelecimento das culturas. Neste caso a contaminação bacteriana mostrou-se muito alta em todos os protocolos de assepsia testados, até mesmo no protocolo cinco, no qual utilizou-se o antibiótico Cloraphenicol na concentração de 500 mg/l, que é considerada uma concentração bastante alta.

O acréscimo do protocolo seis surtiu o efeito desejado. A presença da Ampicilina a 500mg/l eliminou 81% da contaminação bacteriana. Permitindo que se instalasse a fase 3 do estudo. A ampicilina também obteve boas taxas de descontaminação em explantes de Batata (Carvalho & Torres, 2005) e de Maracujazeiro (Schewengber *et. al*, 2005).

Ao se comparar à resistência dos explantes aos protocolos no que diz respeito ao dano causado pela manipulação, tendo em vista que a oxidação causada pela solução de hipoclorito é um fator limitante no processo de estabelecimento dos explantes *in vitro* de acordo com Hartman & Kester (1983), pode-se afirmar que os explantes desta espécie possuem alta resistência quando comparados com explantes de oliveira (Rugini, 1990), *Coffea arabica* (Söndahl & Saharp, 1977), os quais necessitaram de substâncias como glutatona e cisteína HCl adicionadas ao meio de cultura devido a grande incidência de oxidação, já no caso das folhas de *Anacardium humille* (Londe *et. al*, 2005) a oxidação foi o fator limitante na propagação *in vitro* desta espécie.

## 7.2 Fase 2

As dosagens testadas na fase dois serviram como um indicador para quais hormônios combinar na fase 3. Os hormônio que apresentou os melhores resultados na formação de raízes em todas as fontes de explante foi o ANA, na formação de calos o 2,4-D obteve bons resultados.

Porém não houve incidência de brotos nos explantes foliares e nem nos nódulos foliares. Isto provavelmente se deve ao fato de estes explantes terem sido retirados de regiões da planta que possuem células “programadas” para outro tipo de função, e não se encontrarem na presença de hormônios de crescimento, devido a isso perderam a capacidade de regenerar brotos nas condições testadas neste estudo (Guerra & Nodari, 2000).

Devido a limitações no tempo estipulado no cronograma, não foi possível instalar a fase 2 para os explantes apicais. No entanto os resultados obtidos nesta fase com as outras fontes de explante foram utilizados na escolha dos hormônios que foram combinados na fase 3 para os explantes apicais ápices.

### **7.3 Fase 3**

Na formação de brotos apenas os explantes apicais responderam significativamente a presença do BAP. Os meristemas apicais são um sítio ativo de biossíntese de hormônios, e possuem uma pré-disposição a incidência de brotos, o que provavelmente foi potencializado pelas doses aplicadas do BAP nos explantes apicais (Hartman & Kester 1983).

Mas no caso dos explantes foliares e dos nódulos foliares não ocorreu a interação desejada entre as combinações de hormônios aplicadas, e a resposta fisiológica que levaria a formação de brotos não se expressou. No entanto estas duas fontes de explante apresentaram uma intensa formação de calo, principalmente nos tratamentos com as doses mais altas de 2,4-D. Resultados semelhantes foram encontrados por Londe *et al.*, (2005) com Cajuí, e Soares *et al.*, (2005) com Mangabeira.

Dessa forma sabe-se que o calo é considerado um tecido indiferenciado, ou pouco diferenciado que pode ser induzido, tornando-se determinado e, finalmente sofrer diferenciação para formar gemas caulinares ou raízes, conforme o balanço hormonal aplicado (Peres 2002).

Tanto a aquisição de competência quanto à determinação são reflexos da expressão diferencial de genes envolvidos nos processos de desenvolvimento (Skoog & Miller, 1957). Dessa forma o calo assume um papel muito importante no processo de organogênese indireta podendo ser diferenciado a fim de formar uma planta inteira em uma segunda fase do experimento.

A formação de raízes nesta fase ocorreu em todas as fontes de explante. Porém esta não apresentou significância nos explantes apicais, acredita-se que a ocorrência natural de auxinas neste tecido não favoreceu a aquisição da competência das células na presença da auxina exógena, assim não induziu a uma significativa formação de raízes nestes explantes.

Nas folhas e nos nódulos foliares associa-se a diferença significativa obtida nos valores de enraizamento ao fato de os explantes terem sido obtidos de material juvenil (Hartman & Kester 1983). Sabe-se que as células mais jovens possuem maior potencial de adquirirem competência na presença de reguladores de crescimento, neste caso especificamente o regulador que melhor induziu o enraizamento foi o ANA nas maiores doses aplicadas em combinação com o BAP.

No entanto não se encontrou nenhuma relação entre o enraizamento e as doses 0,0 e 10,0 mg/l de BAP, isso significa que provavelmente somente o ANA tenha agido positivamente no enraizamento dos explantes.

Tendo em vista que a interação entre o explante e o hormônio se dá em níveis fisiológicos e genéticos, as doses testadas apresentaram resposta significativa a um nível de 1% em quase todos os experimentos implantados, o único

experimento que não apresentou significância foi o enraizamento na fase 3 para explantes apicais, ou seja, as condições testadas ofereceram boas condições para a interação entre explante X hormônio X ambiente.

## 8. CONCLUSÕES

Por meio das condições testadas neste estudo é possível concluir que:

Explantos apicais de andiroba possuem maior capacidade de enraizamento e brotação;

O ANA é o hormônio que mais favorece o enraizamento de explantes de Andiroba;

O 2,4-D é o hormônio que mais favorece a indução de calos em explantes de andiroba;

A dose de 3,0 mg/l de ANA é a melhor dose para favorecer o enraizamento de explantes de Andiroba;

A solução com 10,0 mg/l de ANA e 10,0 mg/l de BAP compõe a melhor via para a obtenção de plântulas de Andiroba via embriogênese somática direta em explantes apicais.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alencar, J. C., Magalhães, L. M. S. 1979. Poder germinativo de sementes de doze espécies florestais da região de Manaus. **Acta Amazônica** 9(3): 411-418.

Attree, S.M., Fowke, L.C. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. In: **Pl. Cell Tis. and Org. Cult.**,35:1-35p.

Ammirato, P.V., Steward, F.C. 1971. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. *Bot.Gaz.*,132:149-158.

Ammirato, P. V. Embryogenesis. In: Evans,D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V.; Yamada, Y. 1983. eds. **Handbook of Plant Cell Culture**. MacMillan Publishing Co.. New York, 970p.

Ammirato, P.V. 1989.Recent progress in somatic embryogenesis. In: **IAPTC Newsletter**, 57:2-16.

Assis, T. F; Teixeira, S. L. 1998. Enraizamento de Plantas Lenhosas. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SP/Embrapa – CPNH, 509p. 261-296p.

Barrueto, C. L. P. 1999. Cultura de tecidos vegetais - uma ferramenta fundamental no estudo da biologia moderna de plantas. In: **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1 , n. 1 mai, p. 30-33p.

Bottino, P.J. 1981. **Methods in plant tissue culture**. Maryland Kemtec Educational Corporation, 74 p.

Christianson, M.L. 1985. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: Henke, R. R., Hughes, K. W., Constatin, M. J., Hollaender, A. (eds). **Tissue Culture in Forestry and Agriculture**. New York: Plenum Press, 83-103 p.

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

Creasy, L.L. 1968. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. **Phytochem.** v.7, 441-446 p.

Debergh, P.C. & Read, P.E. 1991. Micropropagation. In: **Micropropagation Technology and Application**. Debergh, P.C. & Zimmermann, R.H. (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht pp. 3-13..

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

Durand-Cresswell, R.; Boulayl, M.& Franclet, 1982. A. Vegetative propagation of *Eucaliptus*. In: **Tissue Culture in Forestry**. Bonga & Durazan, eds. MartinusNijhoff. The Hague. 15-151p.

Devlin, R.M. 1975. **Plant physiology**. Bed. New York, D. Van Nostrand Company. 585 p.

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

Emrich. E. B., Paiva. R., Silva, A, A, N., Nicioli, P. M. 2005. Desinfestação de explantes foliares de Cajuí (*Anacardium Humile*), visando o estabelecimento *in vitro*. In: **Anais do 2 CBCTP**. Fortaleza, 694p.

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. In: **ACTA AMAZONICA** 32(4): 647-661p.

Ferraz, I.D.K. & Sampaio, P.T.B. 1996. Métodos simples de armazenamento das sementes de **Andiroba** (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D.C. – Meliaceae). **Acta Amazonica**, 26: 137-144.

Fisch. S. T. V., Ferraz I. D. K., Rodrigues, W. <sup>a</sup> 1995. Distinguishing *Carapa Guianensis* Aubl. From *Carapa procera* D. C. (Melizceae) by morphology of Young seedlings. **Acta Amazônica** 25(3/4) 193-200.

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

Giri, A.; Ahuja, P.S. & Ajaykumar, P.V. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Aconitum heterophyllum* Wall. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.32, 213-218 p.

Grattapaglia, D.; Machado, M.A. 1998. Micropropagação. In: Torres. A.C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A., (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPQ, 183-260.p.

Guerra, M. P. & Nodari, R. O .2000. Cultura de tecidos vegetais e micropropagação de plantas. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Depto. Fitotecnia, CCA-UFSC. 21p.

Ferraz, I. D. K. , Camargo, J. L. C. Sampaio, P. T. S. 2002. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica** 32 (4): 647-661p.

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**. 27p.

Guerra, M.P.; Torres, A.C.; Teixeira, J.B. 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568.

Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. **Sitzungsber. Math. Naturwiss. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien.**, 111:69-92p,

Hartman, H.T; D.E. Kester. 1983. Plant propagation.4 ed. New Jersey. **Prentice-Hall**. 727p.

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

Higuchi, N.; Jardim, F. C. S.; Santos, J. dos; Alencar, J. da C. 1985. Bacia 3 - Inventário diagnóstico da regeneração natural. **Acta Amazonica**, 15:199-233.

Hu. C. y P.J. Wang. 1984. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: Evans D.A. *et al*. Handbook of plant cell culture. **Techniques for propagation and breeding**. New York. Mac Millan, V 1. 177-227p.

Jurgens, G., Mayer, U. 1992. Arabidopsis. In: BARD, J. (ed.). Embryos: A colour atlas of developing embryos. London, Wolfe. 32-37p.

Kerbaudy, G. B. 1997. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1 , n. 1 , mai. 30-33 p.

Komamine, A.; Kawahara, R.; Matsumoto, M.; Sunabori, S.; Toya, T.; Fujimura, A.; Tsukahara, M.; Smith, J.; Ito, M.; Fukuda, H.; Nomura, K. & Fujimura, T. 1992. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures. Physiology, biochemistry and molecular biology. In: **Vitro Cell. Dev. Biol.**, 28:11-14p.

Leite, A. C. P. 1997. Estrutura de comercialização do óleo de Copaíba em Rio Branco. In: **Comunicação técnica**, 5p.

Londe, L. N. Silva, A, S. Figueira, E. R. Santana D. G. Bonetti A, M. Luz, J. M. Marques, R. V. Marques S. V. 2005. Indução *in vitro* de respostas morfogenéticas de explantes foliares de *Anacardium humille* St. Hill. (Anacardiaceae). In: **Anais do II CBCTP**. Fortaleza – CE, 694p.

Lorenzi, H. 1992. Árvores Brasileiras - **Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. São Paulo -, Editora Plantarum, 240 p.

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

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

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

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. **Ann. Rev. Plant Phys.**, 25:135-66p.

Pasqual, M. 1985. Obtenção de plantas por culture de tecidos. **Inf. Agropec.** 11(124): 6368.

Pennington, T.D. *et al.* 1981. Meliaceae. **Flora Neotropica**, 28: 406-419. SUDAM. 1979. **Pesquisas e informações sobre espécies florestais da Amazônia.** Belém, SUDAM. 111p.

Peres, L. E. P. 2002. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas in vitro. Depto. de Ciências Biológicas – LCB – São Paulo. *In: Revista biotecnologia.* 47p.

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.

Prance. G. T. 1987. Boy&anica Econômica de algumas espécies Amazônicas: Açaí, Buriti, Pupunha, Pau-rosa, Açaí-boi, Camu-camu, Abiu, Copaíba, Piassaba, Patauá, Sorva e Tucumã. **Relatório de Botânica Econômica, Inpa/Fuá,** Manaus.

Ribeiro, J. E. L. da S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. da S.; Brito, J. M. de; Souza, M. A. D. de; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. da C.; Silva, C. F. da; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C. 1999. **Flora da Reserva Ducke, guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.** INPA, Manaus. 780p.

Rugini, E. 1990. *In vitro* culture of the olive: na overview of the present scientific status. **Acta Horticulturae**, v. 286, p.93-96.

Schenk, R.O., HildebrandT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50:199-204.

Schwengber, J. A, M. Palmeira, J. I. A, Carvalho, A, L. M. Rego. E. R. Taveira M. L. Rego, M. M. 2005. Potencial de desinfestação de extrato etanólico de *Lippia Passiflora* em sementes de Maracujazeiro (*Passiflora edulis f. flavicarpa*. Deg) In: **Anais do II CBCTP**. Fortaleza – CE. 694p.

Skoog, F. & Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In: **Symp. Soc. Exp. Biol.** 11:118-231p.

Sharp, W.R., Sondahl, M., Caldas, L.S., Maraffa, S.B. 1980. The physiology on in vitro asexual embryogenesis. **Hortic. Rev.**, 2:268-310p.

Soares, F. P. Paiva R. Oliveira L. M. Paiva, P. D. O, 2005. Calogênese in vitro de segmentos caulinares de Mangabeira (*Harconia speciosa* Gomes) In: **Anais do II CBCTP**. Fortaleza – CE, 694p.

Söndahl, M. R. & Sharp, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Z. Pflanzenphysiol.**, v.81, p.395-408.

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, 152 p.

Teixeira, J.B.; Söndahl, M.R.; Kirby, E.G. 1993. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.34, p. 227-233p.

Torres, J. S. & Carvalho, A, C. 2005. Sensibilidade de explantes de Batata a meio nutritivo suplementado com antibióticos. In: **Anais do II CBCTP**. Fortaleza – CE, 694p.

Vastano Jr., B. 1984. Estudos de aspectos da estrutura genética de uma população natural de Copaíba (*Copaífera multijuga* Hayne, Leguminosae – Cesalpinoideae) Na região de Manaus. **Thesis MSc**, Inpa-Fua, Manaus

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

White, P. r. 1943. a Handbook of Plant Tissue Culture. **the Jacques Cattell press.**

Williams, E.S., 1986. Maheswaran, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57:443-462.

Zimmerman, J.L. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. **The Plant Cell**, 5:1411-1