

ISSN 1808-9909  
Volume 1, Número 2, 2005

# PLANT CELL CULTURE & MICROPROPAGATION



## Cultura de Células & Micropropagação de Plantas

**Publicação Científica da Associação Brasileira  
de Cultura de Tecidos de Plantas**

**Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras, MG, v. 1, n. 2, p. 53-102, 2005**

# EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE REGULADORES DE CRESCIMENTO SOBRE A MICROPROPAGAÇÃO DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King) POR MEIO DE EXPLANTES JUVENIS

## EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF GROWTH REGULATORS ON THE MAHOGANY (*Swietenia macrophylla* King) MICROPROPAGATION THROUGH YOUNG EXPLANTS

OSMAR ALVES LAMEIRA<sup>1</sup>, SEBASTIÃO DA CUNHA LOPES<sup>2</sup>, RAÍRYS CRAVO NOGUEIRA<sup>3</sup>, IRACEMA MARIA CASTRO COIMBRA CORDEIRO<sup>4</sup>, JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO<sup>5</sup>, LANA ROBERTA SOUZA REIS<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo Doutor, Embrapa Amazônia Oriental, Lab. Biotecnologia – Belém, PA – 66095-100 – osmar@cpatu.embrapa.br

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Bolsista CNPq/Museu Goeldi – Belém, PA.

<sup>3</sup>Bióloga, Doutoranda Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras-MG.

<sup>4</sup>Engenheiro Ftal, Doutoranda Universidade Federal Rural da Amazônia/UFRA – Belém, PA.

<sup>5</sup>PhD. Professor Universidade Federal de Lavras/UFLA.

<sup>6</sup>Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UFRA/Embrapa Amazônia Oriental

### RESUMO

A grande procura pelo mogno (*Swietenia macrophylla* King) tem reduzido a população da espécie nas áreas de ocorrência natural, contribuindo para a erosão genética, além do que a propagação dessa espécie florestal por meio de sementes esbarra na dificuldade da coleta e na perda da viabilidade das sementes em um curto espaço de tempo. Com este trabalho objetivou-se comparar o efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento na indução de brotações e enraizamento de diferentes explantes de mogno, com a finalidade de desenvolver protocolo de micropropagação da espécie. Foram utilizados como fonte de explantes segmentos apical e nodal de aproximadamente 10 mm de comprimento, retirados de plântulas de mogno germinadas *in vitro* e cultivados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. As concentrações de 3,0 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mgL<sup>-1</sup> ANA e 3,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mgL<sup>-1</sup> ANA apresentaram as maiores taxas de brotações, enquanto o ANA foi a auxina mais eficiente na formação do sistema radicular de brotos de mogno.

**Termos para indexação:** Segmento apical e nodal, cultura de tecidos, *Swietenia macrophylla*.

### ABSTRACT

The intense search for the mahogany (*Swietenia macrophylla* King) has reduced the natural population of this species, contributing to its genetic erosion. In addition, the sexual propagation of this forest species presents difficulties of seed harvest dashes and a fast loss of viability. This work had the objective to compare the effect of different concentrations of growth regulators on shoot and rooting induction of different mahogany explants in order to develop a micropropagation protocol. Apical and nodal segments of approximately 10 mm

long, extracted from plantlets germinated *in vitro* and cultivated in 50% MS medium supplemented with different concentrations of growth regulators were used as explants. The combination of 3.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup> NAA presented the largest shoot proliferation rate, while NAA showed to be the most efficient auxin in the formation of rooting system in mahogany shoots.

**Index terms:** Apical and nodal segments, tissue culture, *Swietenia macrophylla*.

### INTRODUÇÃO

A Amazônia possui grande diversidade de espécies florestais de grande valor econômico e ecológico. Em razão disso, o mercado consumidor de madeira tropical tem direcionado cada vez mais a sua atenção para essa região. Entre as espécies mais comercializadas, está o mogno (*Swietenia macrophylla* King), principalmente porque sua madeira apresenta propriedades físicas e mecânicas desejáveis para ser empregada em usos nobres, como o mobiliário (GULLISON & HUBBELL, 1992), o que eleva sua cotação no mercado.

A forte pressão de exploração que a espécie vem sofrendo e a perda da viabilidade das sementes, em um curto espaço de tempo, têm levado à redução cada vez mais rápida nas áreas de ocorrência natural, contribuindo

(Recebido em 02 de setembro de 2003 e aprovado em 27 de julho de 2004)

sobremaneira para a erosão genética. Nesse sentido, as técnicas de cultura *in vitro* são alternativas para sua propagação na medida em que possibilita a conservação do material genético e favorece o melhoramento da espécie.

A micropropagação tem grande aplicação prática na área de produção comercial de plantas. Sua utilização permite obter plantas do mesmo genótipo em larga escala e em um curto espaço de tempo a partir de pequenos fragmentos de tecidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998) e ao mesmo tempo em que possibilita reproduzir plantas idênticas à planta-mãe, tanto pela estimulação da capacidade natural da multiplicação vegetativa das espécies, quanto pela indução de uma nova organogênese de gema e raízes (AUGÉ et al., 1984). Na micropropagação do mogno, Lopes et al. (2001) demonstraram a possibilidade dessa técnica com a espécie.

Para obtenção de plântulas de mogno mediante processo de micropropagação, o tipo e tamanho do explante, concentrações de reguladores de crescimento e a eficiência no processo de assepsia (LOPES et al., 2003) são elementos considerados fundamentais para o sucesso da cultura *in vitro*. Assim sendo, com este trabalho objetivou-se comparar o efeito de diferentes concentrações de reguladores de crescimento na indução de brotações e enraizamento de diferentes explantes de mogno com a finalidade de desenvolver protocolo de micropropagação da espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de mogno utilizadas no trabalho foram coletadas no campo experimental da Embrapa Amazônia Oriental e levadas para o Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia dessa instituição de pesquisa.

Após a desinfestação com álcool a 70% por 2 minutos e imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2%, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (150x20 mm) contendo o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), associado com vermiculita (previamente autoclavada) e suplementado com sacarose a 3% e vitaminas.

O trabalho de micropropagação foi dividido em três fases: **I)** Indução de brotações, **II)** Enraizamento dos brotos e **III)** Aclimatação das plântulas. Para as duas fases iniciais, o pH foi ajustado para 5,8 e os meios de cultura foram autoclavados a 121°C, sob pressão de 1,5 atm, por 15 minutos. A incubação dos meios de cultura foi realizada em condições de temperatura de 25±1°C sob fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 25 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescente brancas.

## MICROPROPAGAÇÃO

### I - Indução de Brotações

Foram utilizados como fonte de explantes segmentos apical e nodal de plântulas germinadas *in vitro*. Os explantes foram excisados em tamanho variando entre 5 a 10 mm e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, solidificado com 0,7 % de ágar, suplementado com vitaminas e 3% de sacarose. Os fatores utilizados foram tipos de explante com dois níveis (apical e nodal), e os reguladores de crescimento ácido naftaleno acético-ANA nas concentrações de 0,0; 0,01; 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e 6-benzilaminopurina-BAP nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Após a inoculação, todo material foi mantido em sala de crescimento no escuro por dois dias e, posteriormente, transferido para a presença de luz.

O delineamento utilizado foi o completamente casualizado, em esquema fatorial, com seis repetições, sendo cada unidade experimental constituída de cinco tubos (100x20 mm) contendo um explante em cada um. A variável número de brotações foi transformada pela  $\sqrt{0,5 + x}$  e analisada pela análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. A avaliação dos brotos foi realizada trinta dias após a inoculação.

### II- Enraizamento dos brotos

Em câmara de fluxo laminar, os brotos de mogno com aproximadamente 15 mm, obtidos do tratamento mais eficiente do experimento anterior, foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo o meio MS com

a metade da concentração dos sais (½ MS), solidificado com 0,7% de agar (ágar ágar puríssimo – Isofar), suplementado com vitaminas e 3% de sacarose. O meio de cultura foi complementado com diferentes concentrações de ácido indolbutírico – AIB (2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup>) e ANA (2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup>) e 0,1% de polivinilpirrolidona – PVP. Cinco dias após a inoculação, os brotos foram transferidos para meio de cultura com ½ dos sais MS na ausência de reguladores de crescimento. O delineamento utilizado foi o completamente casualizado, composto de oito tratamentos. Aos trinta dias de cultiv, avaliou-se a porcentagem de enraizamento e o número médio de raízes.

### III) Aclimação das Plântulas

As plântulas obtidas *in vitro* foram transferidas para bandejas plásticas contendo substrato organo-vegetal e colocadas em telado coberto com sombrite a 70% sob irrigação intermitente e, posteriormente, para sacos de polietileno contendo solo superficial e esterco de curral na proporção 2:1 e, em seguida, cultivadas no campo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1- Indução de Brotações

Na Tabela 1 observa-se que houve significância para o fator explante, ANA x BAP e para a interação entre os três fatores testados.

A interação entre ANA e BAP em todas as concentrações usadas promoveu o desenvolvimento de brotações nos segmentos nodais e apicais; entretanto, o explante mais eficiente na formação de brotos foi o segmento nodal. As combinações entre ANA e BAP têm sido relatadas na literatura como satisfatórias para indução de brotações de diversas espécies.

Lameira et al. (1992), utilizando explantes provenientes de gemas, raízes e folhas de bacuri (*Platonia insignis*, Mart), obtiveram emissão de brotações em meio MS complementado com 1,5 mgL<sup>-1</sup> ANA + 2,5 mgL<sup>-1</sup> BAP. Resultados similares foram encontrados por Arellano & Pinto (1993) em experimento com pau-santo (*Kielmeyera coriacea* I.)

**TABELA 1** – Resumo da análise de variância para o número de brotações de mogno (*Swietenia macrophylla*) em função do efeito da combinação das concentrações de ANA e BAP e explantes. Embrapa Amazônia Oriental. Belém – PA, 2003.

Causa da variação	GL	QM
		Nº brotações <sup>1</sup>
ANA (A)	3	0,076 ns
BAP (B)	3	0,26 ns
Explante (C)	1	22,74**
AxB	9	0,79**
AxC	3	0,056 ns
BxC	3	0,0076 ns
AxBxC	9	1,22**
Resíduo	96	0,133
Total	127	
C.V (%)	19,1	

(ns)-Não-significativo e (\*\*)- Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

1-Dados transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$

Os resultados do número médio de brotos são apresentados na Tabela 2. Para o segmento apical, o tratamento mais eficiente foi a combinação da concentração de 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, produzindo, em média, 2,7 brotos/explante, e o tratamento menos eficiente foi a combinação 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ANA e 3 mg.L<sup>-1</sup> BAP na ausência de ANA, ao passo que, para o segmento nodal, os tratamentos mais eficientes foram as combinações de 3 e 4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, produzindo, respectivamente, 2,6 e 2,5 brotos/explante, não havendo diferença significativa entre as combinações. O tratamento menos eficiente foi a concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP na ausência de ANA.

O segmento nodal superou o segmento apical na produção de brotos em todas as combinações possíveis entre as concentrações usadas de BAP e ANA, exceto para a combinação de 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA.

**TABELA 2** – Efeito de reguladores de crescimento na indução de brotos a partir de segmento apical e nodal de mogno. Embrapa Amazônia Oriental, 2003.

BAP (mgL <sup>-1</sup> )	ANA (mgL <sup>-1</sup> )	Média de número de brotos / segmento apical	Média de número de brotos / segmento nodal
0,0	0,0	1,0 cdef	2,3 abcd
1,0	0,0	1,7 abcde	2,0 d
1,0	0,01	2,2 ab	2,2 bcd
1,0	0,5	0,8 f	2,4 abc
1,0	1,0	1,9 ab	2,2 abcd
2,0	0,0	1,7 abcde	2,5 ab
2,0	0,01	1,5 bcdef	2,4 abc
2,0	0,5	1,0 def	2,3 abcd
2,0	1,0	1,9 ab	2,1 cd
3,0	0,0	0,7 f	2,3 abcd
3,0	0,01	1,8 abcd	2,4 abc
3,0	0,5	2,7 a	2,2 abcd
3,0	1,0	0,9 ef	2,6 a
4,0	0,0	1,6 bcdef	2,2 abcd
4,0	0,01	1,7 abcdef	2,4 abc
4,0	0,5	1,9 abc	2,4 abc
4,0	1,0	1,0 def	2,5 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade

Essas observações estão de acordo com Coelho (1999), Cordeiro et al. (2003) e Del Ponte (1999), que verificaram que o segmento nodal é o explante mais eficiente para propagação das espécies lenhosas *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (sucupira-branca), *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto) e *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá), respectivamente.

As brotações obtidas no segmento apical foram em sua maioria em forma de rosetas. Acredita-se que o surgimento dessas brotações pequenas e em menor número

no ápice seja devido ao fato de a plântula de mogno quando emergida, apresentar poucas gemas foliares, muito próximas umas das outras, e com epicótilo fino na zona apical. Andrade et al. (2000), na propagação de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira), e Cordeiro et al. (2003), na propagação de *Schizolobium amazonicum* (paricá), verificaram que o maior número de brotações surgiram em explantes nodais, pelo fato desse explante possuir maior número de gemas axilares pré-existentes. Apesar de não se ter medido o comprimento das brotações, foi observado que, nos segmentos nodais, as brotações foram maiores e bem formadas, ao passo que, nos ápices, essas foram muito pequenas.

Embora nem sempre sejam necessárias no meio de multiplicação, Quoirin & Lepoivre (1974) relatam que geralmente as auxinas são utilizadas no intuito de estimular o crescimento das partes aéreas. Por outro lado, Grattapaglia & Machado (1998) explicam que se não houver um balanço entre esses reguladores, as concentrações excessivas de auxina podem inibir a multiplicação ou favorecer a formação de calo, enquanto as de citocinina podem reduzir o tamanho dos brotos.

## II- Enraizamento dos brotos

Na Tabela 3, são apresentados os dados referentes à formação do sistema radicular. Todas as concentrações de ANA foram mais eficientes que AIB. Os tratamentos contendo ANA apresentaram porcentagem de enraizamento acima de 65%. Os maiores valores foram obtidos na presença de 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, com 84% e 85% respectivamente. Os maiores número médio de raízes/broto (3,4 e 3,7) foram obtidos nas concentrações de 4,0 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. O tratamento contendo 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB foi o menos eficiente, apresentando 35% de enraizamento e, em média 0,4 raiz por broto. Foi observado que à medida que aumentava a concentração de ANA, maior era o número de raízes por brotos, ao passo que o número de raízes diminuía com o aumento da concentração de AIB. Resultados similares foram obtidos por Lopes

(2000) em seu estudo com a mesma espécie, no qual a auxina ANA, na concentração 5,0 mg.L<sup>-1</sup>, apresentou maior eficiência no enraizamento. Pelos resultados, constata-se que o ANA foi mais eficiente que o AIB na formação do sistema radicular de brotos de mogno.

Lopes et al. (2001) obtiveram até 90% de enraizamento em brotações de mogno cultivados *in vitro* na presença de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Os resultados obtidos estão de acordo com Quezada (1996) que, ao trabalhar com diferentes concentrações de ANA, AIB e AIA, obteve maior eficiência no enraizamento da macieira cv. Fred Hough na presença de ANA. Cordeiro et al. (2003) observaram que na presença de AIB, o processo de rizogênese na cultura *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum*), uma espécie florestal nativa da Amazônia, não foi eficiente. Entretanto, segundo Del Ponte (1999), na cultura de *Eucalyptus globulus*, o AIB tem sido a auxina mais comumente usada para promoção de enraizamento. Certas espécies, entre as quais estão muitas plantas lenhosas, apresentam inúmeros mecanismos que podem contribuir para falha ou retardamento na indução de raízes. Segundo Normanly

**TABELA 3** – Efeito de reguladores de crescimento na porcentagem de enraizamento e número médio de raiz/brotos *in vitro* de mogno. Embrapa Amazônia Oriental, 2003.

ANA (mgL <sup>-1</sup> )	AIB (mgL <sup>-1</sup> )	% enraizamento	Número médio de raiz/broto
2,0	0,0	84 a	1,8 b
3,0	0,0	68 b	2,6 ab
4,0	0,0	85 a	3,4 a
5,0	0,0	65 b	3,7 a
0,0	2,0	55 c	0,5 c
0,0	3,0	50 c	0,5 c
0,0	4,0	35 d	0,4 c
0,0	5,0	40 d	0,4 c

Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

(1962), espécies lenhosas podem apresentar alta atividade de enzimas que inativam a auxina por degradação oxidativa ou por conjugação, afetando sobremaneira no processo de rizogênese.

### III- Aclimação das Plântulas

As plantas obtidas e aclimatadas em bandejas plásticas de 24 células, quando transferidas para sacos de polietileno contendo solo superficial e esterco de curral curtido na proporção de 2:1, apresentaram um percentual de 80% de sobrevivência. Em seguida, foram cultivadas em campo e, após dois anos de cultivo, apresentaram um bom crescimento vegetativo.

### CONCLUSÕES

O segmento nodal é mais eficiente para indução de brotações de mogno

O meio de cultura MS contendo 3,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mgL<sup>-1</sup> de ANA é o mais eficiente para indução de brotações de mogno em segmento nodal.

O ANA é mais eficiente que o AIB na formação do sistema radicular de brotos de mogno.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. de. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All.). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar. 2000.
- ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. B. P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*: I. efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 26-31, 1993.
- AUGÉ, R.; BEUCHESNE, G.; BOCCON-GIBOD, J. **La culture *in vitro* et ses applications horticoles**. Paris: Lavoisier, 1984. 151 p.
- COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

- CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; TEREZO, E. F. de M.; BARROS, P. L. C. de; OHASHI, S. T. Micropropagação de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber Ex Ducke). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 78-82, jan. 2003.
- DEL PONTE, E. M. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus ssp. globulus* Labill.** 1999. 47 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas.** Brasília: Ministério da Agricultura, 1998. p. 99-170.
- GULLISON, R. E.; HUBBELL, S. Regeneración natural de la mara (*Swietenia macrophylla*) em el bosque Chimanes, Bolívia. **Ecologia em Bolívia**, Peru, v. 19, p. 43-56, 1992.
- LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F. de; COSTA MOTA, M. G. da; COSTA, M. da; COSTA, M. da C. Propagação *in vitro* do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) e da castanheira (*Bertolletia excelsa* H. B. K.). **Embrapa Amazônia Oriental**, Brasília, n. 160, p. 1-2, 1992. Pesquisa em andamento.
- LOPES, S. da C. **Micropropagação de Mogno (*Swietenia macrophylla* King).** 2000. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.
- LOPES, S. da C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L. Comparação de procedimentos para descontaminação de explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Ciências Agrárias**, Belém, n. 40, p. 63-71, jul./dez. 2003.
- LOPES, S. da C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NORMANLY, J. Auxin metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 473-497, 1962.
- QUEZADA, A. C. **Micropropagação da macieira (*Malus domestica* Borkh) cv. Fred Hough.** 1996. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1996.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulture**, The Hague, v. 12, p. 165-171, 1974.