

Calogênese e organogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Sm.) da Amazônia Ocidental: Estabelecimento e regeneração de brotos*.

Fermino Jr., Paulo Cesar Poeta ¹; Pereira, Jonny Everson Scherwinski ²; Nagao, Eduardo Ossamu³; Guedes, Rodrigo da Silva⁴

¹Professor Assistente do Departamento de Ciências Agrárias da UFAC, e-mail: paulofermino@ufac.br; ²Pesquisador da Embrapa-Acre; ³ Professor Adjunto da UFAM; ⁴Mestrando em Produção Vegetal-UFAC. * Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

INTRODUÇÃO

A cerejeira brasileira é uma espécie arbórea que ocorre naturalmente nas matas de terra firme do sudoeste da Amazônia (Amazonas e Acre). Usada freqüentemente na fabricação de mobiliários fino, lambris, balcões e tonéis (Rizzini, 1981). Devido ao interesse e exploração, *A. acreana* faz parte da Lista Oficial da Flora Ameaçada de Extinção do IBAMA.

A propagação sexuada desta espécie para a produção de mudas a serem utilizadas em projetos de reflorestamento é reduzida em virtude da dispersão anemocórica das sementes, fato que dificulta as coletas no interior da mata (Firmino et al., 1985). A utilização da biotecnologia permite desenvolver métodos de multiplicação, conservação, e proteção de recursos florestais. Em vista da potencialidade da aplicação das técnicas de propagação *in vitro* em espécies florestais, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de tornar esta tecnologia acessível e economicamente viável (Xavier et al, 2007). Cid et al. (2002), afirmam que estudos básicos de micropropagação para espécies tropicais lenhosas são necessários para aumentar o conhecimento científico e suas aplicações práticas.

Esta pesquisa objetivou avaliar: assepsia, germinação das sementes *in vitro* e regeneração *in vitro* a partir de segmentos nodais de *A. acreana* em meio MS adicionando-se os reguladores de crescimento ANA e BAP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes maduras e sadias de *A. acreana* foram extraídas de árvores nativas do Alto vale do Juruá- AC no mês de setembro de 2006 e conduzidas ao laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa-Acre, onde foram submetidas a uma pré-desinfestação que consistia na imersão em água e detergente neutro por 15 minutos, sendo lavadas em água corrente por três vezes. Posteriormente, as sementes foram submersas em soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,25% e 2,5% por 30 minutos em câmara de fluxo laminar horizontal. Após esta etapa, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada. As sementes desinfestadas foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio com os sais e vitaminas do Meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose, e 6 g.L⁻¹ de ágar em pH ± 5,8 autoclavados a 120 °C por 15 minutos.

Para os experimentos de calogênese foram utilizados segmentos nodais de plântulas de 45 dias germinadas *in vitro* inoculados no meio MS, conforme descrito anteriormente, acrescidos de 1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) com 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Os tubos de ensaio foram colocados em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 60%.

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado com cinco repetições, contendo quatro sementes, em cada unidade amostral. Para os experimentos

de calogênese, foram utilizadas três repetições com dez frascos contendo cinco explantes cada. As médias foram comparadas por teste *t-student* e entre os tratamentos com reguladores foi utilizada ANOVA com teste de separação de Tukey, ao nível de 5% de significância (Sokal & Rohlf, 1995).

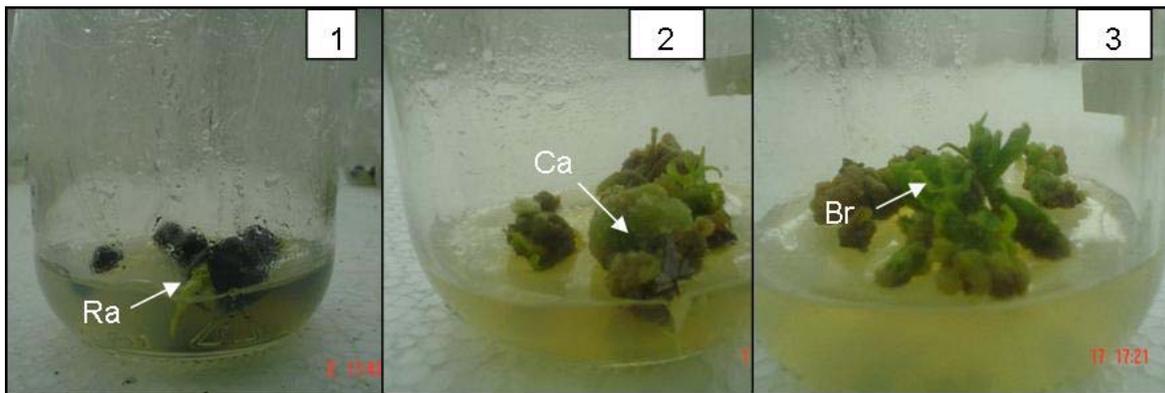
Avaliou-se a porcentagem de contaminação após 15 e 30 dias, e a porcentagem de germinação *in vitro* das sementes. Nos experimentos de calogênese foram avaliadas a porcentagem de explantes com calo e o número médio de brotos regenerados por explante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes, após 15 e 30 dias de cultivo, não apresentaram contaminação biológica quando submetidas aos tratamentos de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e 1,25%. As espécies arbóreas apresentam dificuldade para o estabelecimento *in vitro* devido aos contaminantes, principalmente se for utilizado material vegetal de indivíduos adultos (Couto *et al.*, 2004). Por isso, a utilização de plântulas germinadas *in vitro*, nas condições assépticas, tornam-se mais vantajosas (Skirvin, 1981). Os protocolos de assepsia mais utilizados para sementes de espécies arbóreas florestais envolvem o hipoclorito de sódio, como utilizado para sementes de mogno (Couto *et al.*, 2004), sementes de canjarana (Rocha, 2005), de cedro (Nunes *et al.*, 2002), e de *Miconia sp.* (Cid *et al.*, 1997). As respostas à assepsia variam conforme o tipo de tecido, entretanto, a super exposição ao desinfestante freqüentemente causa morte das células. Devido a menor concentração de hipoclorito de sódio a 1,25% expressando alta eficácia, pode-se recomendar tal concentração para protocolos de assepsia para sementes de *A. acreana*.

A germinação *in vitro* iniciou após oito dias de inoculação (Figura 1), apresentando 78% de germinação após 30 dias (Figura 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Lopes (2000) e Lemos *et al.* (1998) que observaram em seus trabalhos rápida germinação das sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King), de seis a dez dias, com plântulas medindo de 45 a 65 mm.

Após 45 dias de cultivo dos segmentos nodais, observa-se a maior porcentagem de formação de calos (Figura 2) nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹ de BAP. Os calos apresentam coloração variando de marrom-claro, a amarelada e esverdeada, e de aspecto semi-compacto a friáveis. A maior regeneração de brotos (Figura 3) com média de 2,27 brotos/explante foi obtida com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. Alguns estudos mostram que o segmento nodal é o explante mais eficiente para a proliferação de brotos de espécies lenhosas (Brunetta *et al.*, 2006). Investigações com *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá), mostraram que à medida que se aumenta a concentração de BAP, ocorre maior incidência de calos (Cordeiro *et al.*, 2004). Em *Azadirachta indica* (margosa), brotos foram regenerados a partir de gemas apicais e axilares na presença de 4,4 µM de BAP (Yousef & Fattah, 1998). Entretanto, com *Azadirachta excelsa* (nim), maior quantidade de brotos foi obtida a partir de gemas axilares na presença de 4,4 µM BAP e 0,5 µM ANA (Liew & Teo, 1998). Para *Cedrela fissilis* (cedro), brotos adventícios foram obtidos a partir de nós cotiledonares na presença de 1,25 a 5,0 µM de BAP (Nunes *et al.*, 2002). Em mogno (*Swietenia macrophylla* King), brotações adventícias surgiram a partir de segmentos nodais em meio contendo 10 µM de BAP e 2,2 µM de 2-iP (Couto *et al.*, 2000). De acordo com Santos (1998), elevadas concentrações de citocinina parecem interagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calos provocando certa inibição no surgimento de brotos.



FIGURAS 1-3. Sementes e segmentos nodais de *Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith. *in vitro*. 1. Germinação *in vitro* de semente, com emissão da radícula. 2. Formação de calos friáveis. 3. Brotações regeneradas a partir de segmentos nodais. Legendas: Ra= radícula; Ca= calos; Br= brotos.

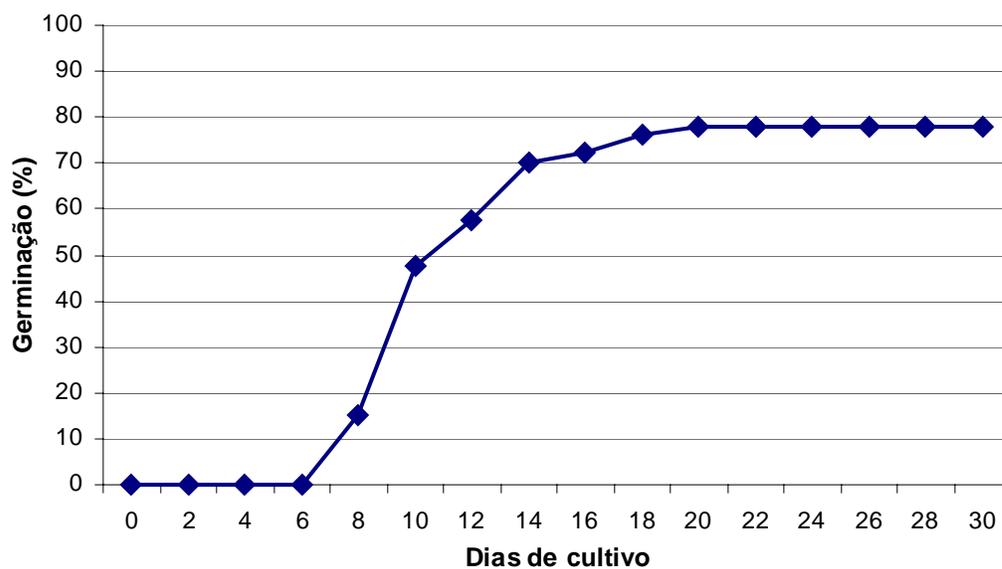


FIGURA 4. Freqüência relativa da germinação *in vitro* de sementes de *Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith. em função dos dias de cultivo.

TABELA 1. Formação de calos e regeneração de brotos a partir de segmentos nodais de *Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith.

BAP (mg.L ⁻¹)	Percentual de Formação de calos	Brotos por explante
0	6±0 a	0 a
0,5	36±3,5 b	0,83±0,06 b
1,0	48±2 c	1±0,2 c
2,0	80,7±4,2 d	2,27±0,06 e
4,0	89,3±1,2 d	1,83±0,12 d

NOTA: Letras diferentes na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a combinação de BAP e ANA tem efeitos significativos na indução de processos morfogênicos *in vitro* de *A. acreana*, visando sua micropropagação. A concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP com 1,0 mg.L⁻¹ de ANA é a mais adequada para a regeneração de brotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRUNETTA, J.M.F.C.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. **Scientia Florestalis**, n.71, p.19-24. 2006.
- CID, L. P. B.; GOMES, A. C. M.; COSTA, S. B. R.; TEIXEIRA, J. B. Micropropagation of *Miconia* sp. a woody melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 9, n. 1, p. 21-25, 1997.
- CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Cerne**, v.10, n.1, p.118-124. 2004.
- COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.633-642. 2004.
- FIRMINO, J.L.; SANTOS, D.S.B.; SANTOS, B.G. Utilização de alguns testes de viabilidade e vigor e composição química em sementes de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith.) **Revista Árvore**, v.19, n.3, p. 286-292. 1995.
- LEMOS, O.F. et al. Produção de plântulas para micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King). In: Congresso Nacional de Genética, 44, 1998. Águas de Lindóia, SP. Resumos do Congresso: 1998. p.216.
- LOPES, S.C. **Micropropagação de mogno (Swietenia macrophylla King)**. 2000. 53p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2000.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497. 1962.

NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 70, p. 259-268, 2002.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de dendrologia**. 2ªed. São Paulo: Edgar Brucher, Ltda. 296p. 1981.

ROCHA, S. C. e QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, nº 1 p. 91-101. 1995.

SANTOS, M.R.A. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach**. 1998. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SKIRVIN, R.M. Fruticulture crops. In: CONGER, B.V. **Cloning agricultural plants via in vitro techniques**. Boca Raton: CRC Press, p.51-139. 1981.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. **Biometry**. San Francisco, Freeman and Company, 776p. 1995.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e Enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: Borém, A. (Ed.). **Biotechnologia Florestal**. Viçosa: Editora UFV. p.55-74. 2007.

PALAVRAS-CHAVE: *Amburana acreana*; Biotecnologia Florestal; Micropropagação; Plantas lenhosas.