

Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético

In vitro callogenesis in epicotyl segments from mahogany (*Swietenia macrophylla* King) plantlets using 6-benzylaminopurine and α -naphthaleneacetic acid

Juliana Margarido Fonseca Couto Brunetta¹, Wagner Campos Otoni²,
Antonio Lelis Pinheiro³, Ésio de Pádua Fonseca⁴

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver técnicas de regeneração *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo provenientes de plântulas de mogno (*Swietenia macrophylla*) germinadas em meio de cultura. Os segmentos de epicótilo foram inoculados em meio MS suplementado com combinações do regulador BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido α -naftalenoacético). Observou-se aos 40 dias após a inoculação, a formação de calos nas extremidades dos segmentos de epicótilo com calejamento em 100% dos explantes para os tratamentos T07 (0,50 mg.L⁻¹ de ANA e 0,50 mg.L⁻¹ de BAP), T10 (0,25 mg.L⁻¹ de ANA e 1,00 mg.L⁻¹ de BAP) e T11 (0,50 mg.L⁻¹ de ANA e 1,00 mg.L⁻¹ de BAP), com variação nas suas intensidades e textura de calejamento. A textura dos calos dos outros tratamentos variou da coloração verde nas extremidades dos explantes a semicompacto de coloração creme. Já com relação à intensidade de calejamento observou-se variação entre pouca e moderada formação de calejamento. A intensidade dos calos observados nos segmentos de epicótilo, variou em função da combinação dos reguladores de crescimento (ANA e BAP), com alta formação de calo nos tratamentos T10 (0,25 mg.L⁻¹ de ANA e 1,00 mg.L⁻¹ de BAP) e T16 (1,00 mg.L⁻¹ de ANA e 2,00 mg.L⁻¹ de BAP).

Palavras-Chave: *Swietenia macrophylla*, Mogno, Segmentos de epicótilo, Organogênese, BAP, ANA

Abstract

The objective of this work was to develop techniques for *in vitro* regeneration of mahogany (*Swietenia macrophylla*), through epicotyl segments from mahogany plantlets germinated in culture medium. The epicotyl segments were inoculated on MS medium supplemented with different combinations of BAP (6-benzylaminopurine) and NAA (α -naphthaleneacetic acid) concentrations and after 40 days of inoculation callus formation was observed at the ends of the segments. On treatments T07 (0,50 mg.L⁻¹ NAA and 0,50 mg.L⁻¹ BAP), T10 (0,25 mg.L⁻¹ NAA and 1,00 mg.L⁻¹ BAP) and T11 (0,50 mg.L⁻¹ NAA and 1,00 mg.L⁻¹ BAP), 100% of explants showed callus varying the intensity and texture. The callus texture from the other treatments varied from greenish on the extremes to semi compact and beige. Related to callus intensity, it was shown a variation between little and moderated, and the explants with callus varied according to the growth regulator combination (BAP and NAA), with high formation on treatments T10 (0,25 mg.L⁻¹ NAA and 1,00 mg.L⁻¹ BAP) and T16 (1,00 mg.L⁻¹ NAA and 2,00 mg.L⁻¹ BAP).

Keywords: *Swietenia macrophylla*, Mahogany, Epicotyl segments, Organogenesis, BAP, NAA

INTRODUÇÃO

O mogno (*Swietenia macrophylla* King) pertence à família Meliaceae, e é uma espécie de grande importância econômica devido à sua madeira, que é durável e muito apreciada para a fabricação de móveis de luxo e artigos de de-

coração. Nas Américas ocorrem três espécies do gênero *Swietenia* e a espécie *macrophylla* ocorre desde a Península de Yucatán, no Sul do México, e estende-se à Região Amazônica do Brasil, abrangendo também o Peru e a Bolívia.

A exploração intensiva da espécie vem diminuindo cada vez mais as reservas naturais do

¹Doutoranda do Curso de Ciência Florestal do Departamento de Engenharia Florestal da UFV - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG - 36570-000 - E-mail: juliana.brunetta@uol.com.br

²Professor Associado do Departamento de Biologia Vegetal da UFV - Universidade Federal de Viçosa - Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - E-mail: wotoni@ufv.br

³Professor Titular do Departamento de Engenharia Florestal da UFV - Universidade Federal de Viçosa - Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - E-mail: pinheiro@ufv.br

⁴Professor Titular do Departamento de Agronomia da UEL - Universidade Estadual de Londrina - Caixa Postal 6001 - Londrina, PR - 86051-970 - E-mail: esiof@uel.br

mogno e por isso o governo decretou a Lei número 3.559, de 14 de agosto de 2000, suspendendo a exploração da espécie pelo período de dois anos na Região Amazônica (BRASIL, 2000). A única maneira de evitar sua extinção e o desaparecimento das reservas naturais seria o incentivo ao reflorestamento, mas este tem sido limitado devido aos ataques severos de larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae).

De acordo com Lee e Rao (1988), apesar de haver relatos de sucesso da propagação de plantas arbóreas de clima temperado usando técnicas de cultura de tecidos, existem poucos trabalhos empregando esta técnica em espécies arbóreas de clima tropical. Com relação ao mogno, destacam-se os trabalhos de Maruyama *et al.* (1989), Maruyama e Ishii (1997) e Venketeswam *et al.* (1988) que obtiveram plântulas a partir de segmentos nodais.

Segundo Maruyama *et al.* (1989), somente ocorreu a formação de calo em sementes de mogno, quando foram inoculadas em meio de cultura acrescido de regulador de crescimento. Por outro lado, utilizando segmentos nodais como explantes, observaram que houve formação de brotações múltiplas.

De acordo com Maruyama e Ishii (1997) foi possível obter a multiplicação, regeneração, enraizamento e embriogênese somática em segmentos de epicótilo e gemas apicais de mogno empregando-se a técnica de cultura de tecidos.

Com o avanço da biotecnologia, novos estudos vêm sendo desenvolvidos por Lopes (2000), para *S. macrophylla* (mogno) e também para outras espécies florestas tropicais, como *Cedrela odorata* (cedro) e *Schizolobium amazonicum* (paricá), por Lameira *et al.* (2000) e Cordeiro *et al.* (2004), respectivamente.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de regeneração *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo, de plântulas de *Swietenia macrophylla* King (mogno) germinadas *in vitro*, com uso de BAP (6-benzylaminopurina) e ANA (Ácido α -naftalenoacético).

METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, no período de agosto de 2001 a janeiro de 2002.

Foram utilizadas sementes de mogno provenientes de Belém, Estado do Pará, coletadas e doadas pela Empresa Tramontina Belém S.A.

A germinação das sementes ocorreu em con-

dições *in vitro*, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), sem regulador de crescimento. Os segmentos de epicótilo foram retirados das plântulas com 5 a 10 dias de idade, após a emissão das partes aéreas (Figura 1) e imediatamente transplantado.

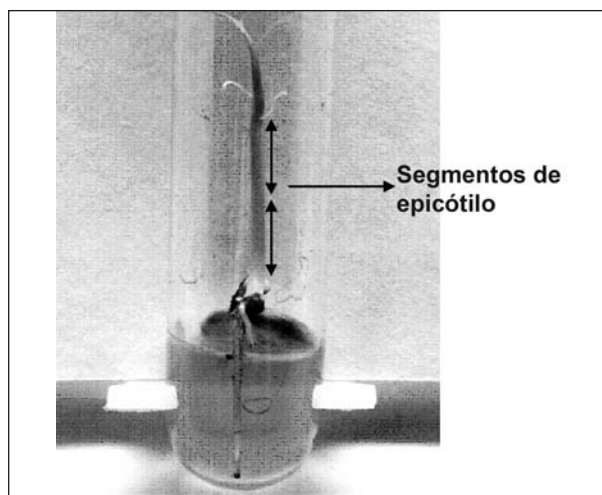


Figura 1. Plântula de mogno (*Swietenia macrophylla* King.), germinada *in vitro*, evidenciando a região de retirada dos segmentos de epicótilo. (Mahogany (*Swietenia macrophylla* King.) plantlet germinated *in vitro*, displaying the region of epicotyl segments obtainment)

Para indução de brotações adventícias desses segmentos, o meio de cultura básico MS foi suplementado com vitaminas MS, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose, 800 mg.L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona), 0,5% (p/v) ágar, variando as combinações de BAP (6-benzylaminopurina), nas concentrações de 0; 0,25; 0,50 e 1,00 mg.L⁻¹ com ANA (ácido α -naftalenoacético), nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹, conforme mostrado na Tabela 1. O pH do meio de cultura foi aferido a $5,8 \pm 0,1$.

Tabela 1. Relação dos tratamentos propostos em função das combinações de ANA(ácido α -naftalenoacético) e BAP (6-benzylaminopurina) utilizadas para a regeneração de plantas de mogno (*Swietenia macrophylla* King) a partir de segmentos de epicótilos. (Proposed treatments on NAA (α -naphthaleneacetic acid) and BAP (6-benzylaminopurine) used on mahogany (*Swietenia macrophylla* King) regeneration, using epicotyl segments)

		mg.L ⁻¹				
ANA\BAP	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
0	T01	T05	T09	T13	T17	
0,25	T02	T06	T10	T14	T18	
0,5	T03	T07	T11	T15	T19	
1,0	T04	T08	T12	T16	T20	

Os segmentos de epicótilo com aproximadamente 1,0 centímetro foram excisados em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, antes da inoculação nos diferentes tratamentos, de modo que toda a extensão dos segmentos permanecesse em contato com o meio. As condições ambientais da sala de crescimento foram

reguladas à temperatura de 27 ± 1 oC e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, disposto em esquema fatorial 4 x 5, sendo 4 níveis de ANA e 5 níveis de BAP, os quais foram desdobrados em polinômios ortogonais para estudo da regressão. Como os dados analisados estavam em porcentagens, foram feitas transformações utilizando-se a transformação arsen (raiz (porcentagem/100)).

Os segmentos de epicótilo foram avaliados aos 20, 30 e 40 dias após a inoculação, porém os dados analisados se referem à análise dos 40 dias, quanto à porcentagem média de brotações de gemas e formação de calos ou (explante calejados), intensidade de calejamento, textura do calo e oxidação no explante.

A intensidade de calejamento foi dividida 4 classes: 0 (sem), 1 (baixa), 2 (moderada), 3 (intensa). Com relação à textura dividiu-se em quatro tipos de calos: A) compactos (células firmemente ligadas), B) semi-compacto (células moderadamente ligadas), C) friáveis (células frouxamente ligadas) e D) sem reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada a resposta quanto à organogênese direta nos explantes, porém ocorreu brotação de gemas pré-existentes nos segmentos de epicótilo inoculados em todos os tratamentos.

As diferenças de brotações ocorridas podem ser explicadas mais em função da ocorrência aleatória de gemas nos explantes e não à adição de reguladores de crescimento no meio de cultura.

Alguns estudos mostram que o segmento nodal é o explante mais eficiente para a proliferação de brotos de espécies lenhosas. Isso foi verificado por Pinto *et al.* (1994) e Lopes (2000) em estu-

dos com pau-santo (*Kielmeyera cociacea*) e mogno (*Swietenia macrophylla*), respectivamente.

Observou-se aos 40 dias após a inoculação, a formação de calos nas extremidades dos segmentos de epicótilo em diferentes tratamentos.

Não se observaram diferenças significativas quanto à porcentagem de brotação para os segmentos de epicótilos quando em função dos níveis de ANA, BAP e para as suas combinações, porém observou-se que houve crescimento e desenvolvimento de brotações em gemas axilares existentes nos explantes.

Estes resultados estão de acordo com Cordeiro *et al.* (2004), que estudaram o efeito benéfico do regulador BAP na multiplicação de brotações. O autor relacionou a influência na liberação das gemas axilares inibidas pela inibição correlativa.

Lee e Rao (1988) ao estudar a micropropagação de mogno com a utilização de segmentos nodais, em meio suplementado com BAP a 0,1 e 1 mg.L⁻¹ obtiveram a indução de brotações múltiplas.

Segundo Maruyama *et al.* (1989) foi possível à obtenção da indução de brotações múltiplas de segmentos nodais do mogno em meio BTM suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. O mesmo ocorreu com Albarrán *et al.* (1997) que obtiveram o desenvolvimento de gemas axilares para o mogno em meio suplementado com BAP e AIA, ambos a 2,0 mg.L⁻¹. Nas Figuras 2 a 6 são apresentadas as características em que ocorreram efeitos significativos de regressão.

Quanto à porcentagem de calejamento em explantes, observou-se diferença ao nível de 1% de probabilidade para os níveis de ANA, sendo que para a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ deste regulador obteve-se 91% de calejamento (Figura 2). Não houve significativo dos níveis de BAP e da interação ANA x BAP sobre a porcentagem de calejamento em explantes.

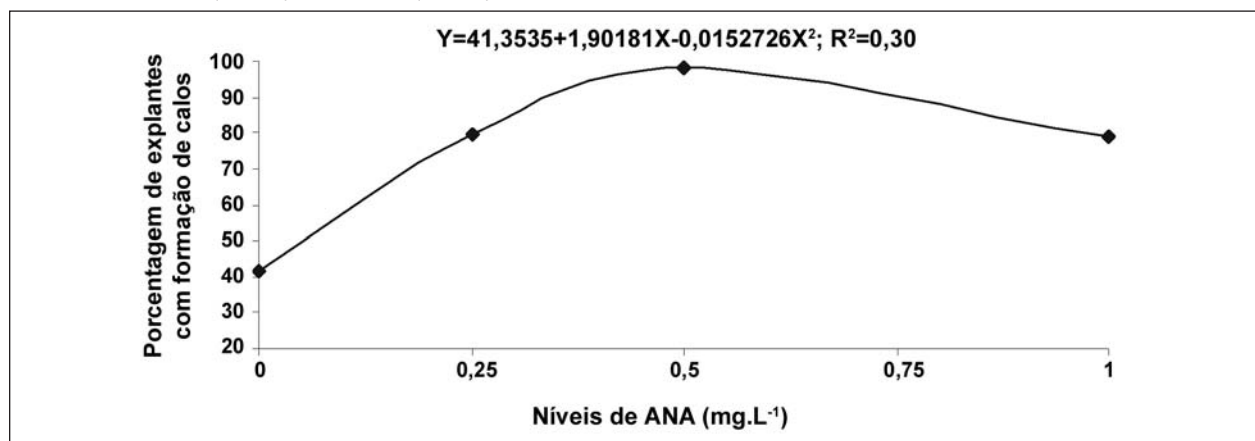


Figura 2. Porcentagem de explantes de mogno (*Swietenia macrophylla*) com formação de calos em função dos níveis de ANA (ácido α -naftalenoacético) aos 40 dias após a inoculação. As médias estão ajustadas em função das equações de regressão. (Percentual average of callused explants from mahogany (*Swietenia macrophylla*) epicotyl segments, developed on basal MS medium culture supplemented with different combinations of NAA (α -naphthaleneacetic acid), after 40 days of inoculation. The averages shown on the graphic are adjusted according to the regression equations)

A porcentagem de calejamento em explantes não foi significativa para os níveis de BAP e para as combinações ANA x BAP.

Os resultados obtidos estão de acordo com os de Cordeiro *et al.* (2004) que observaram baixa frequência de calejamento em *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá) no meio de cultura sem regulador de crescimento, porém observaram que à medida que se aumentou a concentração do regulador BAP, ocorreu maior incidência de calos endógenos. Segundo estes autores, isto se deveu, provavelmente, ao desbalanceamento nos níveis endógenos de fitormônios nos explantes.

Segundo 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 dos brotos.

Para a porcentagem de textura de calejamento, foi observado que houve diferença significativa nos níveis de ANA para todas as texturas avaliadas A, B, C e D (Figura 3).

Para a textura D, aos 40 dias após a inoculação, observou-se efeito quadrático com ponto de mínimo ocorrendo com a concentração próxima de

0,50 mg.L⁻¹ de ANA, sendo que a maior porcentagem de calos (69%) ocorreu para os segmentos de epicótilo desenvolvidos em meio sem nenhuma concentração reguladora de crescimento.

Para os calos com textura A e B houve comportamento quadrático com ponto de máximo, para ambas, ocorrendo para o nível 0,5 mg.L⁻¹. Para a textura C, houve comportamento linear crescente em função do aumento da concentração de ANA (Figura 3).

As porcentagens A, B e C de textura de calejamento foram afetadas significativamente pelos níveis de BAP (Figura 4), e não se observou efeito significativo das interações entre os níveis de ANA e BAP sobre esta característica.

Na Figura 4, observa-se que os segmentos de epicótilo contendo a textura B, apresentaram comportamento quadrático, com ponto de máximo ocorrendo quando os meios de culturas continham 2 mg.L⁻¹.

Para os segmentos com calos classificados como texturas A e C, houve também efeito quadrático, porém com ponto de mínimo ocorrendo quando o meio estava acrescido de 2,0 mg.L⁻¹, porém as maiores porcentagens de calos ocorreram quando os segmentos desenvolveram em meio sem regulador de crescimento.

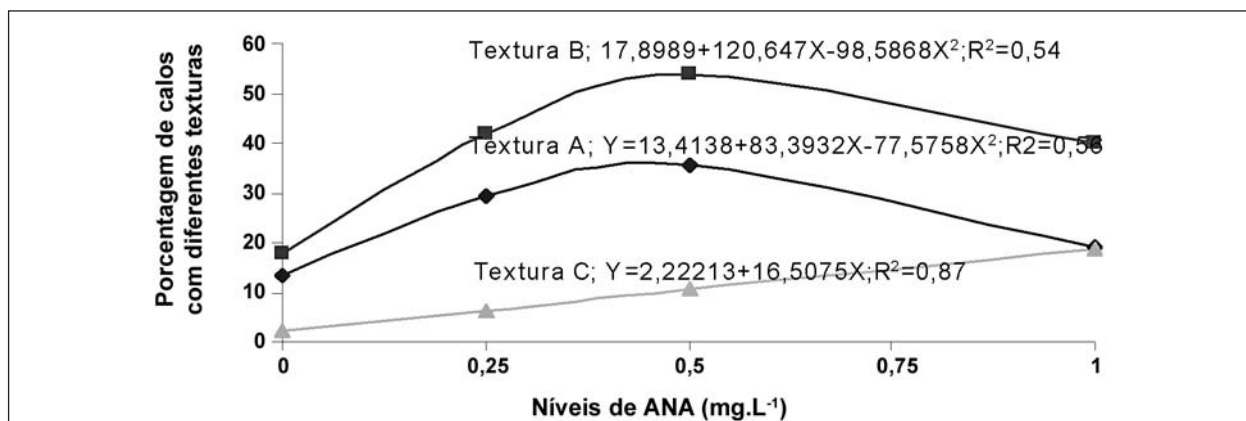


Figura 3. Porcentagem de calos das diferentes texturas (A-compactos; B-semi-compacto e C-friável), em segmentos de epicótilo de mogno, desenvolvidos em meio de cultura com diferentes níveis de ANA (ácido α -naftalenoacético), aos 40 dias após a inoculação. (Percentual callusing from mahogany epicotyl segments, related to different textures (A-compact, B-semi-compact and C-friable), according to NAA levels (α -naphthaleneacetic acid), after 40 days of inoculation. The averages shown on the graphic are adjusted according to the regression equations)

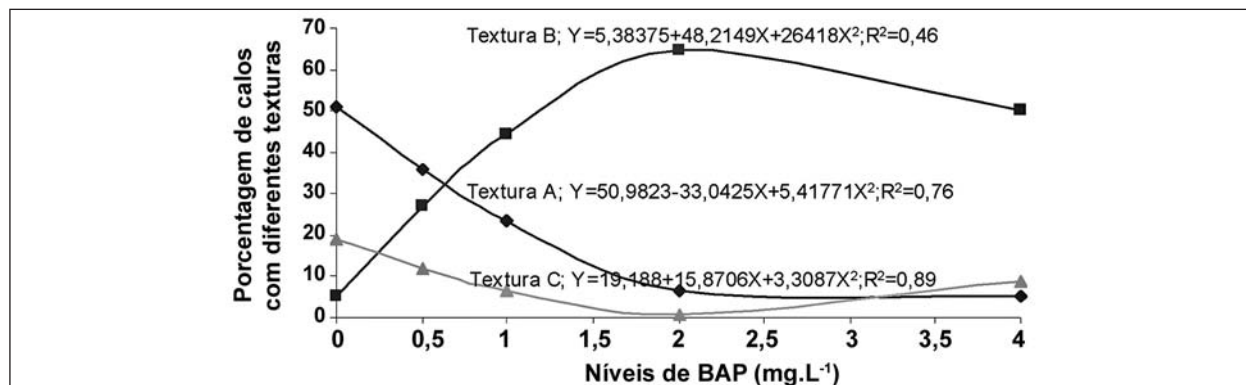


Figura 4. Porcentagem de calos das diferentes texturas (A-compactos; B-semi-compacto e C-friáveis) em segmentos de epicótilo de mogno, desenvolvidos em meio de cultura com diferentes níveis de BAP (6-benzylaminopurina), aos 40 dias após a inoculação. (Percentual callusing from mahogany epicotyl segments, related to different textures (A-compact, B semi-compact and C-friable) according to BAP levels (6-benzylaminopurine), after 40 days of inoculation. The averages shown on the graphic are adjusted according to the regression equations)

Quando se avaliou a intensidade de calejamento sobre a porcentagem de calos, observou-se que, para a intensidade 0, houve redução em função do aumento da concentração de ANA no meio de cultura, por outro lado, para a intensidade 1 o comportamento foi linear crescente (Figura 5).

Nos segmentos desenvolvidos em meios de culturas contendo a adição de BAP, pode-se observar para a intensidade 1 que ocorreu decréscimo significativo em função do aumento de sua concentração. Comportamento inverso foi observado para a intensidade 2 e quadrático para a intensidade 3,

com ponto de máximo para 2,0 mg.L⁻¹ (Figura 6).

Gamborg (1982) e George (1996) afirmam que é possível o estabelecimento de uma cultura de calo de praticamente qualquer planta e da maioria de suas partes, empregando um meio nutritivo simples, acrescido de auxinas e citocininas. A textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nas constituintes do meio nutritivo, produz calos macios, friáveis e úmidos, em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto secos e com células pequenas (Figura 7).

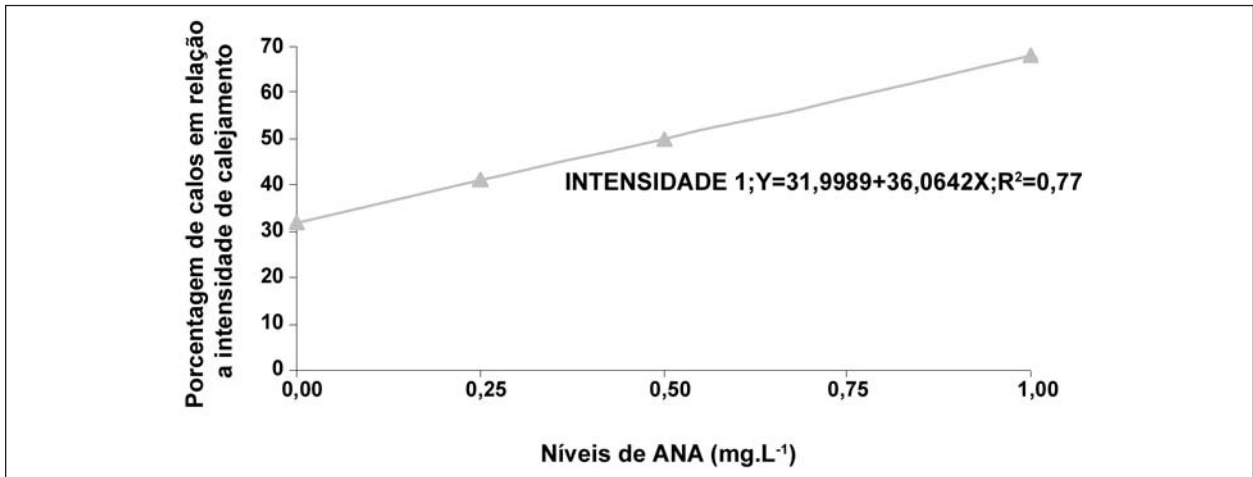


Figura 5. Porcentagens de calos em segmentos de epicótilo de mogno com diferentes intensidades de calejamento (intensidade 1-pouca) em função dos níveis de ANA (ácido α -naftalenoacético) aos 40 dias após a inoculação. (Percentual callusing related to the callusing intensity (1-low) from mahogany epicotyl's segments, related to NAA (α naphthaleneacetic) acid levels after 40 days of inoculation)

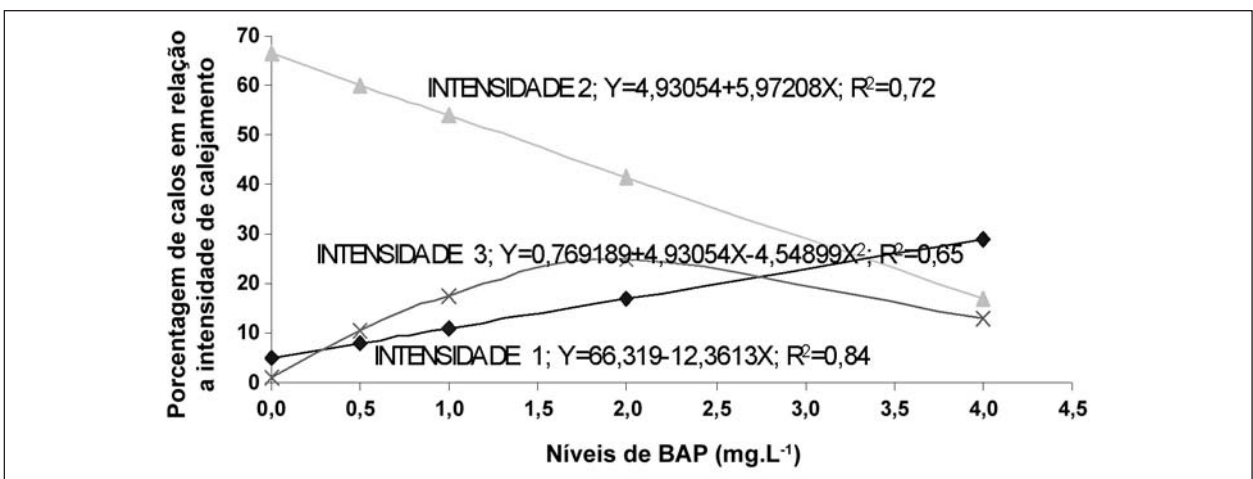


Figura 6. Porcentagem de calos com diferentes intensidades de calejamento (1-baixa; 2-moderada e 3-alta), em função dos níveis de BAP (6-benzylaminopurinea), em segmentos de epicótilo de mogno aos 40 dias após a inoculação. (Callusing intensity (1-low; 2-moderate and 3-high) percentual from mahogany epicotyl's segments, related to BAP levels (6 benzylaminopurine), after 40 days of inoculation)

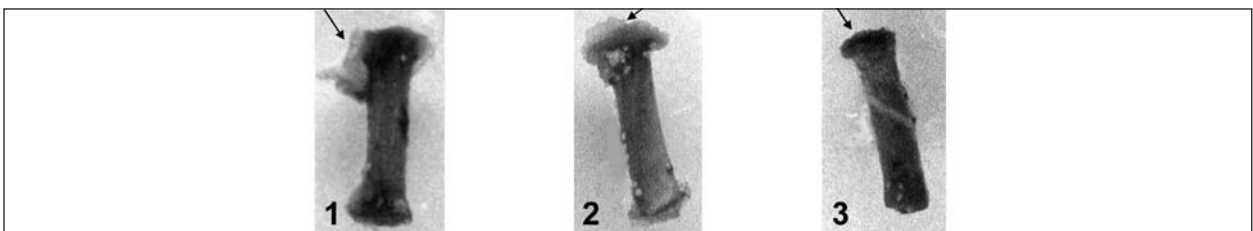


Figura 7. Detalhe da textura de calos em segmento de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) para os calos semicompactos de coloração creme (1 e 2) e compacto de coloração verde (3). (Texture details on mahogany (*Swietenia macrophylla* King) epicotyl segments callus, showing beige semi compact callus (1 and 2) and green compact callus (3))

Segundo Cordeiro *et al.* (2004), há evidências de que espécies lenhosas liberam maior quantidade de compostos fenólicos ao meio, favorecendo a oxidação. Além do que, a intensidade de oxidação depende do tipo e da idade fisiológica do explante, do meio de cultura, da presença dos reguladores de crescimento, dentre outros fatores.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os segmentos de epicótilo responderam aos reguladores de crescimento quanto à calogênese e os mesmos não formaram órgãos a partir dos calos formados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – pela concessão de bolsa de estudo à autora principal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARRÁN, J.G.; VIELMA, M.; CONTRERAS, G.I. Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla*: estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. *Revista Forestal Venezolana, Mérida*, v.41, n.2, p.111-118, 1997.

BRASIL. Decreto n.3.559, de 14 de agosto de 2000. Suspende a exploração da espécie mogno (*Swietenia macrophylla*), na região Amazônica, pelo período de dois anos, e dá providência. *Diário Oficial*, Brasília, 15 ago. 2000. Seção 1, p.2.

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 *Schizobolium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). *Cerne*, Lavras, v.10, n.1, p.118-124, 2004.

GAMBORG, O.L. Callus and cell culture. In: WETTER, L.R.; CONSTABEL, F. *Culture methods*. Ottawa: Saskatoon, 1982. p.1-9.

GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture in practice: Part 2*. London: Exegetics Limited, 1996. 1361p.

LAMEIRA, O.A.; GOMES, A.P.R.; LOPES, S.C. *Efeito da sacarose e luminosidade sobre a germinação in vitro de embriões de cedro*. Manaus: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. p.1-3. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, n. 20).

LEE, S.K.; RAO, A.N. *Plantlet production of Swietenia macrophylla through tissue culture*. *Garden Bulletin Singapore*, v.41, p.11-18, 1988.

LOPES, S.C. *Micropropagação de mogno (Swietenia macrophylla King)*. 2000. 53p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Pelotas, 2000.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. Tissue culture studies on big-leaf mahogany *Swietenia macrophylla*. In: WORKSHOP BIO-REFOR, 1997, Bangkok. *Proceedings*. Bangkok, 1997. p.116-118

MARUYAMA, J.E.; ISHII, K.; SAITO, A.; MIGITA, K. *Screening of suitable sterilization of explants and proper media for tissue culture of eleven tree species*. Tokyo: Forest Product Research Institute, 1989.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Lund, v.15, p.473-497, 1962.

PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.; BARBOSA, M.H.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, 1994.

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

VENKETESWARN, S.; DIAS, M.A.D.L.; SULTANBAWA, F.; MEYERS, U.V. Tissue culture studies on mahogany tree, *Swietenia macrophylla* King. In: AHUJA, M.R. (ed.) *Somatic cell genetics of woody plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p.147-153

Recebido em 19/05/2004

Aceito para publicação em 19/04/2006