

Produção de Mudanças de Teca por Micropropagação

Introdução

A *Tectona grandis*, conhecida popularmente como teca, é uma espécie arbórea de origem asiática utilizada na produção de madeira para as mais diversas finalidades. É considerada insuperável na construção naval, sendo também adequada para todo tipo de construções, bem como para interiores luxuosos e mobiliário de alto valor (LAMPRECHT, 1990). Os primeiros plantios comerciais surgiram na década de 1960 no Estado do Mato Grosso (MATRICARDI, 1989), embora atualmente já ocorram em várias regiões brasileiras. Devido à sua importância, a espécie tem sido destinada à produção de madeira para reflorestamento comercial, evitando a exploração inapropriada de espécies nativas.

O cultivo de teca por estaquia e semente é amplamente difundido nos trópicos do mundo inteiro (YASODHA; SUMATHI; GURUMURTHI, 2004). A obtenção de mudas de teca por estaquia tem sido realizada com sucesso na Costa Rica. Nesse tipo de cultivo os ramos laterais de árvores selecionadas são retirados e colocados em uma cama de areia, após aproximadamente 1 mês surgem os brotos que serão utilizados para se fazer as estacas (MURILLO; BADILLA, 2002). A produção de mudas a partir de sementes é a mais utilizada, porém pouco eficiente, pois a quantidade produzida por árvore é reduzida, as taxas de germinação são relativamente baixas e as sementes apresentam pequena longevidade sob condições naturais de armazenamento (HEDEGART, 1974; MONTEUUIS; MAITRE, 2007). Além disso, como as sementes se originam a partir de um processo de fertilização (reprodução sexual e fusão de gametas), a obtenção de mudas por sementes pode não ser a estratégia mais adequada quando o objetivo do trabalho é produzir mudas para plantios comerciais. Essa técnica não permite que as plantas obtidas apresentem características semelhantes à planta matriz, podendo haver, portanto, a formação de plantios desuniformes. Assim, várias técnicas de propagação vegetativa têm sido desenvolvidas com o objetivo de produzir mudas clonais, seja para a propagação de genótipos superiores (bom porte, crescimento adequado, resistência a pragas e doenças, etc.), seja para auxiliar trabalhos de melhoramento genético pela redução dos ciclos de seleção ou fixação de ganhos genéticos nas diferentes etapas de cruzamentos. Com relação à teca, a variabilidade de indivíduos propagados por sementes impulsionou o desenvolvimento de programas de propagação clonal a partir de árvores selecionadas (ABDELNOUR; MUÑOZ, 2005). O uso da micropropagação no lugar da estaquia para a propagação de material selecionado proporciona um número muito maior de clones em um espaço físico reduzido e com grande qualidade fitossanitária.

A propagação *in vitro* de teca tem sido realizada por meio da cultura de tecidos vegetais de diferentes genótipos (GUPTA et al., 1980; KHATRI; KUKADIA; SINGH, 2001; TIWARI; TIWARI; SIRIL, 2002; SHIRIN; SARKAR, 2003; GYVES; ROYANI; RUGINI, 2007; AKRAM; AFTAB, 2008; FERMINO JUNIOR; NAGAO; PEREIRA,

Rio Branco, AC
Dezembro, 2010

Autores

Andréa Raposo
Bióloga, D.Sc. em
Genética e
Melhoramento
de Plantas,
pesquisadora
da Embrapa Acre,
andrea@cpafac.
embrapa.br

**Paulo Cesar Poeta
Fermino Junior**
Biólogo, M.Sc.
em Biologia Vegetal,
professor da
Universidade Federal
do Acre (Ufac/CCBN),
paulofermino@ufac.br

Renata Beltrão Teixeira
Engenheira química,
M.Sc. em Engenharia
de Processos,
analista, Embrapa Acre,
beltrao@cpafac.
embrapa.br

**Jonny Everson
Schervinski Pereira**
Engenheiro-agrônomo,
D.Sc. em Ciências,
pesquisador da Embrapa
Recursos Genéticos e
Biotecnologia,
Brasília, DF,
jonny@cenargen.
embrapa.br

2009). Nesse contexto, o uso da micropropagação a partir de plantações de teca no Brasil pode ser uma importante ferramenta, pois permite a produção de grandes quantidades de novas plantas em um curto espaço de tempo, a partir de um único propágulo vegetativo retirado de uma planta matriz.

Assim, o objetivo deste trabalho é descrever protocolos de micropropagação da espécie *Tectona grandis* a partir de genótipos estabelecidos na Amazônia Sul-Ocidental, no Estado do Acre.

Metodologia

Este trabalho apresenta duas alternativas de propagação *in vitro* para teca: uma utilizando como fonte inicial de explante material oriundo de plantas adultas e outra utilizando material oriundo de mudas obtidas por meio da germinação *in vitro* de sementes. A escolha do protocolo dependerá da estratégia a ser utilizada de acordo com o objetivo do trabalho. Quando o produtor buscar plantas para o reflorestamento, no qual a preservação da variabilidade genética é importante, sugere-se utilizar explantes oriundos de plantas obtidas por meio da germinação *in vitro* de sementes. Entretanto, quando o produtor busca determinado genótipo, que possui características importantes, sugere-se utilizar explantes (gemmas apicais) obtidos de plantas adultas.

Os meios de cultura MS (Anexo I) são distribuídos em tubos de ensaio (20 mm x 150 mm) ou frascos de vidro transparente com capacidade de 250 mL, do tipo maionese, sendo fechados com papel-alumínio e tampas plásticas, respectivamente, e autoclavados por 18 minutos a 1,1 Kgf/cm², em temperatura de 121 °C. O pH deve ser ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. As culturas são mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 °C ± 2 °C, dispondo de luminosidade (38 μmol.m⁻².s⁻¹), fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Fonte de explante: gemmas de plantas adultas

Etapas da micropropagação:

1) Escolha da planta matriz/retirada dos explantes
Devem-se selecionar plantas adultas saudáveis (para este estudo foram utilizadas plantas de 6 anos de idade), mantidas em área de plantio no campo, e com caracteres desejáveis (Figura 1). As gemmas apicais, retiradas do ápice caulinar, devem ser transportadas para o laboratório em sacos plásticos e excisadas, com auxílio de bisturi, com o tamanho aproximado de 1,5 cm.



Foto: Paulo Cesar Poeta Ferrmino Junior

Figura 1. Planta adulta de teca (*Tectona grandis* L.f.) mantida no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre.

2) Desinfestação e estabelecimento dos explantes *in vitro*

Seccionar as gemmas apicais (Figura 2), lavá-las com detergente comercial neutro e água corrente, utilizando escova com cerdas macias. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, submergi-las por 1 minuto em álcool etílico 70% (frasco com 30 gemmas em 200 mL), em seguida realizar a imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 20 minutos (frasco com 30 gemmas em 100 mL), e finalmente enxaguá-las em água destilada e autoclavada.

Após a assepsia, as gemas apicais (com tamanho aproximado de 0,5 cm) devem ser inoculadas em tubos de ensaio (20 mm x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado em média com 6 g.L⁻¹ de ágar (a quantidade de ágar pode variar de acordo com o fabricante), 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 30 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 2a e b). O material deve permanecer por 30 dias nesse meio, em câmara de crescimento, sendo descartado aquele que apresentar contaminação.

Fotos: Paulo Cesar Poeta Ferrmino Junior

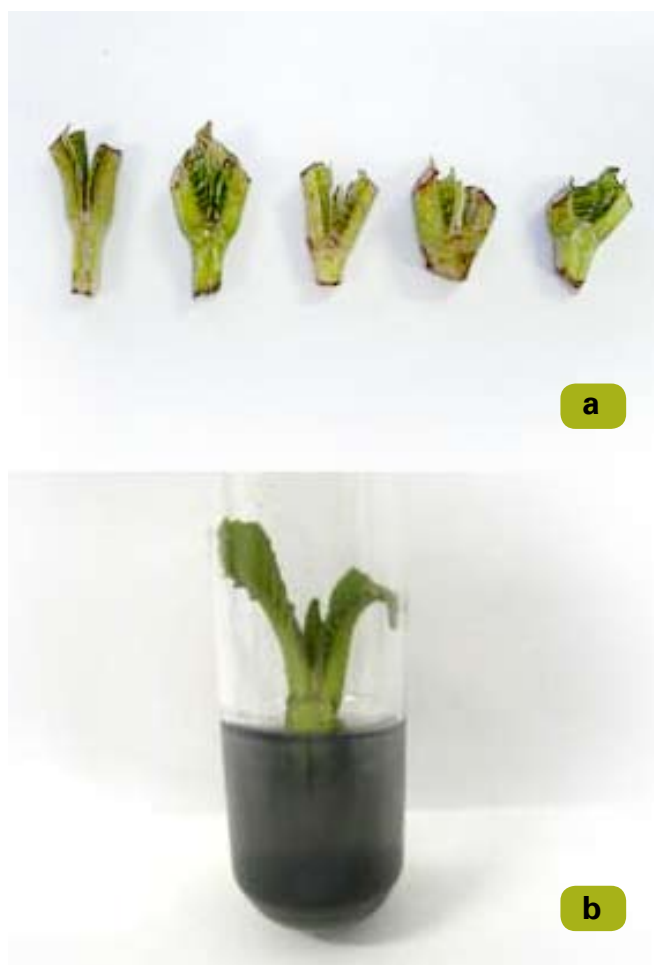


Figura 2. Gemas apicais obtidas de plantas adultas de teca (*Tectona grandis* L.f.): a) gemas apicais seccionadas; b) gemas apicais estabelecidas in vitro em meio de cultura MS.

3) Multiplicação in vitro

Para a fase de multiplicação, deve-se transferir somente material livre de contaminações. Nesse procedimento, realizado em câmara de fluxo laminar, os brotos são retirados dos tubos de ensaio com o auxílio de uma pinça longa, sendo colocados em uma placa de Petri contendo papel esterilizado. Nesse momento, com o auxílio de um bisturi, as raízes e folhas são eliminadas.

Devem ser inoculados pelo menos quatro e no máximo oito explantes (gemas apicais) em frascos de vidro do tipo maionese contendo 30 mL de meio de cultura MS, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, em média com 6 g.L⁻¹ de ágar (a quantidade de ágar pode variar de acordo com o fabricante), 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, com 1,0 mg.L⁻¹ da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,1 mg.L⁻¹ da auxina ácido naftalenoacético (ANA). Os frascos devem ser vedados com três camadas de filme de PVC transparente.

As culturas devem ser mantidas por 60 dias em câmara de crescimento em cada subcultivo, totalizando três. O número médio de brotos regenerados por segmento nodal em cada subcultivo com a utilização desse protocolo é de 1,20 (FERMINO JUNIOR; NAGAO; PEREIRA, 2009).

4) Enraizamento ex vitro e aclimatização

Brotos com aproximadamente 4,5 cm de altura devem ser retirados dos frascos com pinça longa, e suas bases lavadas com água corrente para a remoção do meio de cultura e, posteriormente, colocados sobre papel toalha em bancada. Em seguida, a base dos brotos deve ser retirada com bisturi (aproximadamente 0,5 cm), imersa em solução de 2.000 ppm de ácido indolbutírico (AIB) por 10 segundos (Figura 3a), sendo os brotos transferidos para substrato comercial em tubetes individuais de tamanho médio (115 cm³) (Figura 3b). Os tubetes devem ser então colocados em casa de vegetação, suspensos 0,5 m do solo, sendo mantidos em telados cobertos sem reduzir a radiação solar. A irrigação das plantas deve ser feita por nebulização com ajuda de microaspersores, distantes aproximadamente 1,2 m de altura de onde foram acondicionados os tubetes, com vazão nominal de 60 L/H/m², sendo controlados por um temporizador digital (*Timer*),

com umidade relativa de 80% e temperatura média de 30 °C. Após 60 dias, as plantas micropropagadas com tamanho aproximado de 6 cm de altura podem ser transplantadas para sacos plásticos pretos, com capacidade de 2 L, contendo solo argiloso, e transferidas para viveiros reduzindo-se a radiação solar em 50%, temperatura média anual 35 °C e com rega manual.

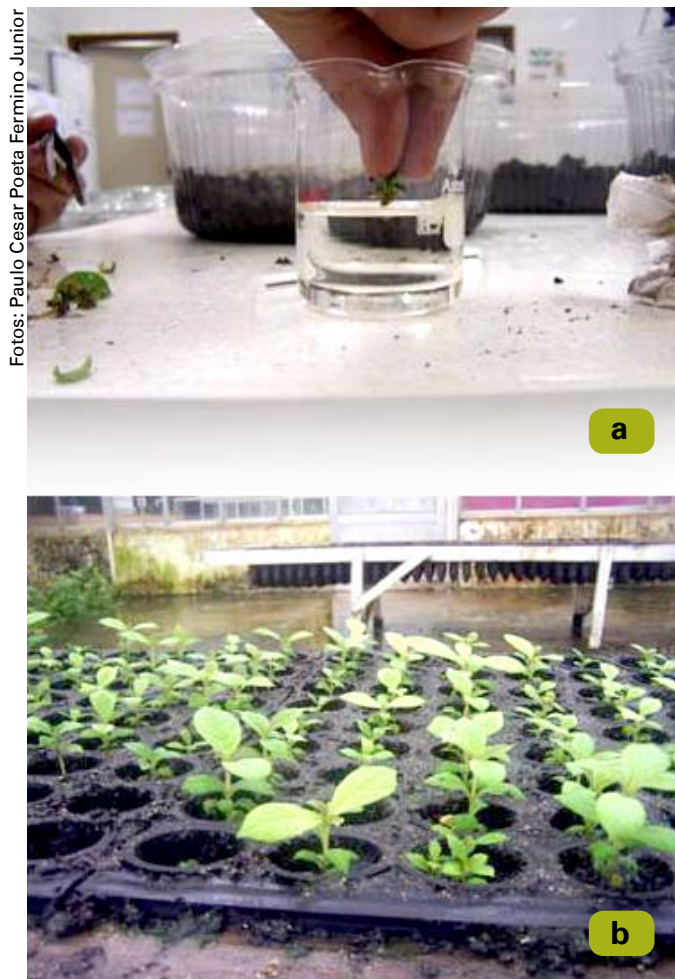


Figura 3. Enraizamento ex vitro e aclimatização de brotos micropropagados de teca (*Tectona grandis* L.f.): a) imersão da base do broto em solução de AIB; b) brotos plantados em tubetes contendo substrato comercial.

Fonte de explante: segmentos nodais de plantas obtidas por meio da germinação in vitro de sementes

Etapas da micropropagação:

1) Desinfestação e germinação das sementes in vitro

As sementes devem ser lavadas com detergente e água corrente, sendo a retirada do fruto realizada com o auxílio de prensa mecânica. Uma vez livres do tegumento, as sementes devem ser novamente

lavadas em água destilada e conduzidas para câmara de fluxo laminar, onde se realiza a desinfestação por imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por 1 minuto, seguida de imersão por 30 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5% (cerca de 150 sementes para 1 litro de solução).

Após a desinfestação as sementes devem ser lavadas por três vezes em água destilada autoclavada e então inoculadas, individualmente, em tubos de ensaio (20 mm x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura de MS, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, e em média com 6 g.L⁻¹ de ágar (a quantidade de ágar pode variar de acordo com o fabricante) (Figura 4).

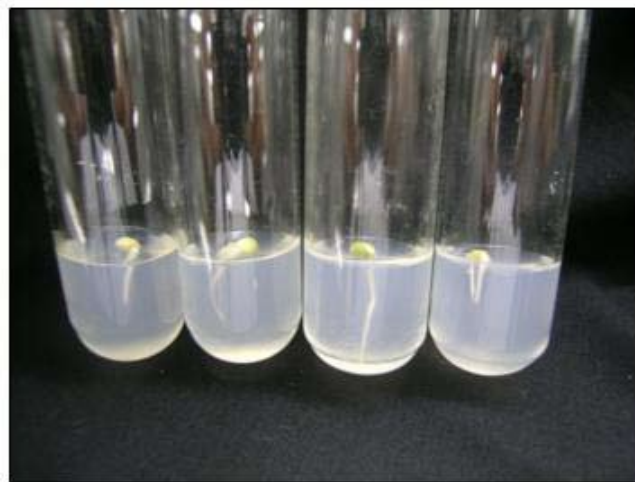


Figura 4. Sementes de teca (*Tectona grandis* L.f.) germinadas in vitro, após 7 dias de inoculação no meio de cultura MS.

2) Multiplicação in vitro

Após 60 dias, as plantas germinadas in vitro devem ser retiradas com o auxílio de uma pinça longa autoclavada, em câmara de fluxo laminar, e colocadas sobre placas de Petri contendo papel esterilizado. Em seguida, com auxílio de bisturi, as folhas e raízes devem ser retiradas e o caule seccionado de maneira que os entrenós, com aproximadamente 1,5 cm, permaneçam com pelo menos duas gemas axilares (Figura 5a).

Devem ser inoculados de 4 a 5 segmentos nodais por frasco de vidro do tipo maionese (250 mL de capacidade), contendo 30 mL de meio de cultura MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, em média com 6 g.L⁻¹ de ágar (a quantidade de ágar pode variar de acordo com o fabricante), 0,5 mg.L⁻¹ da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,1 mg.L⁻¹ da auxina ácido naftalenoacético (ANA) (Figura 5b).

As culturas devem ser mantidas por 60 dias em câmara de crescimento em cada subcultivo, totalizando três subcultivos sucessivos. O número médio de brotos regenerados por segmento nodal em cada subcultivo com a utilização desse protocolo é de 1,75 (FERMINO JUNIOR; NAGAO; PEREIRA, 2009).

Fotos: Paulo Cesar Poeta Fermينو Junior

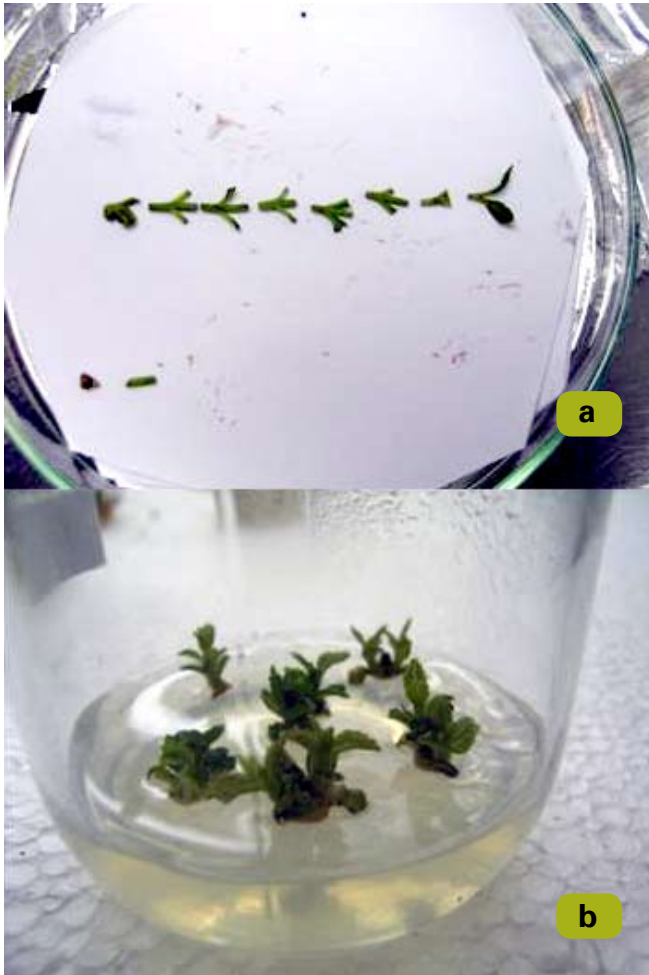


Figura 5. Caules de plantas de teca (*Tectona grandis* L.f.) obtidos após 60 dias da germinação *in vitro* de sementes: a) segmentos nodais seccionados, com aproximadamente 1,5 cm, contendo um par de gemas axilares; b) explantes de entrenós multiplicados *in vitro*, após 20 dias de inoculação no meio de cultura MS.

3) Enraizamento *ex vitro* e aclimatização

Proceder de acordo com a etapa 4 do cultivo *in vitro* utilizando gemas de plantas adultas como fonte de explante.

Referências

- ABDELNOUR, A.; MUÑOZ, A. Micropropagación de teca (*Tectona grandis* L.f.). In: **Kurú: Revista Forestal**, San José, v. 2, n. 5, p. 1-11, 31 ago 2005.
- AKRAM, M.; AFTAB, F. High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron. In: **Propagation of Ornamental Plants**, Sofia, v. 8, n. 2, p. 72-75, 2008.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. In: **Scientia Forestalis**, Piracicaba, vol. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009.
- GUPTA, P. K. et al. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. In: **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 259-268, fev. 1980.
- GYVES, E. M.; ROYANI, J. I.; RUGINI, E. Efficient method of micropropagation and *in vitro* rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. In: **Annals of Forest Science**, Nancy, v. 64, n. 1, p. 73-78, jan./fev. 2007.
- KHATRI, J. H.; KUKADIA, M. U.; SINGH, R. R. Micropropagation of teak (*Tectona grandis* Linn. f.). In: **Indian Journal of Forestry**, Dehradun, v. 24, n. 3, p. 368-371, 2001.
- HEDEGART, T. The teak improvement centre: ten years after initiation. **Vanasam**, v. 32, p. 342-356, 1974.
- LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas: possibilidades e métodos de povoamento sustentado**. Eschborn, GTZ, 1990. 343 p.
- MATRICARDI, W. A. T. **Efeitos dos fatores do solo sobre o desenvolvimento da teca (*Tectona grandis* L.f.) cultivada na Grande Cárceres – Mato Grosso**. 1989, 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MONTEUUIS, O.; MAITRE, H. F. Advances in teak cloning: New developments in teak cloning lead to better plantation stock. In: **ITTO: Tropical forest update**, Yokohama, v. 17, n. 3, p. 13-15, 2007.

MURASHIGE, T. E.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures. In: **Physiologia Plantarum**, Singapore, v. 15, n. 3, p. 473-497, jul. 1962.

MURILLO, O.; BADILLA, Y. **Propagación vegetativa de la Teca en Costa Rica**. Cartago: ITCR/FUNDECOR, 2002. 17 p. (Reporte de Investigación, 3).

SHIRIN, F.; SARKAR, A. K. Removal of phenolic exudates from explants of *Tectona grandis*. In: **Teaknet**, Yangon, v. 30, p. 4-6, 2003.

TIWARI, S. K.; TIWARI, K. P.; SIRIL, E. A. An improved micropropagation protocol for teak. In: **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 1, p. 1-6, out. 2002.

YASODHA R.; SUMATHI, R.; GURUMURTHI, K. Micropropagation for quality propagule production in plantation forestry. In: **Indian Journal of Biotechnology**, Haryana, v. 3, n. 2, p. 159-170, 2004.

Anexo I. Preparação do Meio de Murashige e Skoog (MS) volume: 1.000 mL.

- Em um balão volumétrico de 1.000 mL, colocar aproximadamente 200 mL de água destilada e deionizada.
- Adicionar:
 - 10 mL de solução estoque A.
 - 20 mL de solução estoque B.
 - 10 mL de solução estoque C.
 - 10 mL de solução estoque D.
 - 10 mL de solução estoque E.
 - 10 mL de solução estoque F.
 - 10 mL de solução estoque G.
- Em um becker de 200 mL, pesar 30 g de sacarose e diluir em aproximadamente 150 mL de água destilada e deionizada, adicionar à solução do balão volumétrico.
- Em um becker de 50 mL, pesar 100 mg de inositol e diluir em 2 mL de água destilada e deionizada, adicionar à solução do balão volumétrico.
- Completar o volume do balão volumétrico para 1.000 mL com água destilada e deionizada.
- Passar o meio de cultura para um becker de 2.000 mL.
- Ajustar o peagâmetro.
- Medir o pH do meio de cultura e ajustá-lo para pH 5,8 em agitação, utilizando-se soluções de ácido clorídrico (HCl) e/ou hidróxido de sódio (NaOH).
- Pesar o ágar (a quantidade a ser adicionada ao meio de cultura pode variar de acordo com a marca do produto), geralmente se utilizam 6 g.L⁻¹, e adicionar à solução presente no becker.
- Dissolver o ágar presente na solução do becker em micro-ondas por aproximadamente 6 minutos, observando o ponto de fervura ou até que a solução fique translúcida e homogênea.
- Distribuir 30 mL do meio de cultura em frascos ou 10 mL em tubos de ensaio, fechar os frascos com tampa plástica e os tubos com papel-alumínio, identificando os recipientes com etiqueta.
- Autoclavar por 15 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1,1 Kgf/cm².

Anexo II. Soluções utilizadas no preparo do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962).

Solução estoque	Volume no meio de cultura em mL	Compostos químicos	Concentração da solução estoque g/L ⁻¹	Concentração final do meio de cultura mg/L ⁻¹
A	10,0	NH ₄ NO ₃	165,0	1.650
B	20,0	KNO ₃	95,0	1.900
C	10,0	MgSO ₄ . 7H ₂ O	37,0	370
		MnSO ₄ . 4H ₂ O	2,23	22,3
		ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,86	8,6
		CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0025	0,025
D	10,0	CaCl ₂ . 2H ₂ O	44,0	440
E	10,0	H ₃ BO ₃	0,62	6,2
		KH ₂ PO ₄	17,0	170
		KI	0,083	0,83
		Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,0025	0,025
		CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,25	2,5
F*	10,0	Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	3,73	37,3
		FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,78	27,8
G	10,0	Tiamina Hcl	0,01	0,1
		Piridoxina Hcl	0,05	0,5
		Ácido nicotínico	0,05	0,5
		Glicina (C ₂ H ₅ NO ₂)	0,2	2,0
		Mio-Inositol		100,0
		Sacarose		30.000,0
		Ágar P.A.		6.000,0

*Dilui-se cada composto em 200 mL de água destilada deionizada. As soluções com Na₂EDTA . 2H₂O e FeSO₄ . 7H₂O são preparadas e aquecidas separadamente e então misturadas. Ao esfriar completa-se o volume para 1.000 mL.

Circular Técnica, 56

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Acre

Endereço: Rodovia BR 364, km 14, sentido Rio Branco/Porto Velho, Caixa Postal 321, Rio Branco, AC, CEP 69908-970

Fone: (68) 3212-3200

Fax: (68) 3212-3284

<http://www.cpaafac.embrapa.br>

sac@cpafac.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2010): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Maria de Jesus Barbosa Cavalcante

Secretário-Executivo: Suely Moreira de Melo

Membros: Andréa Raposo, Aurenny Maria Pereira Lunz, Elias Melo de Miranda, Falberni de Souza Costa, Jacson Rondinelli da Silva Negreiros, Maria Clideana Cabral Maia, Paulo Guilherme Salvador Wadt, Tadário Kamel de Oliveira, Uilson Fernando Matter, Virgínia de Souza Álvares

Expediente

Supervisão editorial: Claudia C. Sena/Suely M. Melo

Revisão de texto: Claudia C. Sena/Suely M. Melo

Normalização bibliográfica: Riquelma de S. de Jesus

Tratamento das ilustrações: Bruno Imbroisi

Editoração eletrônica: Bruno Imbroisi