

Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental

In vitro establishment, germination and multiplication of teak (*Tectona grandis* L.f) from genotypes of South-Western Amazon

Paulo Cesar Poeta Fermino Junior¹, Eduardo Ossamu Nagao² e Jonny Everson Scherwinski-Pereira³

Resumo

A produção de mudas clonais de teca (*Tectona grandis*) para plantios florestais consiste numa promissora biotecnologia para o Brasil. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para o estabelecimento de gemas e germinação de sementes a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental e avaliar o potencial organogênico de explantes de diferentes idades na multiplicação *in vitro* de teca. Para a isso foram utilizados segmentos nodais apicais oriundos de plantas matrizes adultas e microbrotos de plântulas germinadas *in vitro*. Verificou-se que o tratamento mais eficiente para a assepsia de segmentos nodais de plantas adultas e de sementes foi o uso de hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 e 30 minutos, respectivamente. Na germinação de sementes, os resultados indicaram que as maiores porcentagens de germinação (83,3 e 60%) das sementes *in vitro* ocorreram na presença de luz no meio MS e WPM. Na fase de multiplicação, as combinações de 0,5 μM de ANA + 2,2 μM de BAP promoveram os melhores resultados (1,75 brotos) para os segmentos nodais de plântulas, enquanto nas oriundas de plantas adultas (1,75 brotos) foi de 0,5 μM de ANA + 4,4 μM de BAP em meio MS. Conclui-se que na propagação *in vitro* de teca a juvenilidade dos explantes influencia nas respostas organogênicas durante a multiplicação de brotos.

Palavras-Chave: *Tectona grandis*, Organogênese, Micropropagação

Abstract

The production of clonal plantlets of teak (*Tectona grandis*) for forest plantations is a promising biotechnology for Brazil. The objective of this work was to establish a protocol for establishment of apical buds and germination from genotypes of the South-West Amazon and to evaluate the organogenic potential of explants of different ages in the *in vitro* multiplication of teak. For the *in vitro* multiplication were used shoot bud from adult plants and nodal segments of seedlings germinated *in vitro*. It was verified that the most effective treatment for aseptic of buds from adult plants and seeds is the use of sodium hypochlorite to 2.5% for 20 minutes and 30, respectively. In the germination of seeds, the results indicated that the largest percentages of germination of seeds *in vitro* (83,3 e 60%) occurred in the presence of light in the medium MS and WPM. During the multiplication, the combinations of 0,5 μM of ANA + 2,2 μM of BAP promoted the best results for the nodal segments of seedlings (1,75 buds), while the shoot apical bud (1,75 buds) was 0,5 μM de ANA + 4,4 μM of BAP. It was conclude that in the *in vitro* propagation of teak the juvenility of explants influences the organogenic answers during the shoots multiplication.

Keywords: *Tectona grandis*, Organogenesis, Micropropagation.

INTRODUÇÃO

A Amazônia é um bioma rico em biodiversidade que vem sofrendo diversos impactos ocasionados pela ação antrópica. A exploração madeireira é um dos principais fatores relevantes na causa de danos severos às florestas, propiciando grandes devastações (FEARNSIDE, 2006).

O reflorestamento tornou-se uma alternativa para reduzir o impacto da exploração madeireira na Amazônia, bem como de promover a cobertura florestal das áreas degradadas (FIGUEIREDO *et al.*, 2005). Plantios comerciais de espécies exóticas, como a teca (*Tectona grandis* L.f.) possibilitam a extração de madeiras para a comercialização, evitando assim, a utilização das espécies nativas.

¹Doutorando em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas. Professor Assistente II do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza da Universidade Federal do Acre - Campus universitário - Distrito Industrial - Rio Branco, AC - 69915-900 - E-mail: poetabio@hotmail.com

²Professor Adjunto IV do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas - Campus universitário Mini-campus - Coroado - Manaus, AM - 69077-000 - E-mail: eonagao@ufam.edu.br

³Pesquisador Doutor da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - SAIN Parque Rural - Asa Norte - Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - 70770-900 - E-mail: jonny@cenargen.embrapa.br

O cultivo de teca por estaquia e por sementes é amplamente difundido nos trópicos do mundo inteiro (YASODHA *et al.*, 2004). A produção de mudas a partir de sementes é pouco eficiente, pois a quantidade de sementes produzidas por árvore é reduzida e as taxas de germinação são baixas, variando de 20 a 25% (MONTEUUIS e MAITRE, 2007).

Em diversas espécies florestais tem-se resultados que indicam a possibilidade de obtenção, num curto espaço de tempo, de grandes quantidades de novas plantas a partir de um único explante, em subcultivos periódicos *in vitro* (XAVIER, 2007).

A aplicação da biotecnologia permite desenvolver métodos de conservação, utilização e proteção de recursos florestais (VIANA *et al.*, 1999). A propagação *in vitro* de teca torna-se uma alternativa para conservação e utilização do potencial econômico em reflorestamentos com fins madeireiros, por meio da multiplicação de genótipos selecionados. O plantio clonal de teca a partir de mudas micropropagadas é realidade na Índia, Laos e Tailândia (BALL *et al.*, 2000). No Brasil, já existem biofábricas de produção de mudas clonadas de teca, entretanto, os estudos de micropropagação de genótipos estabelecidos no Brasil não são publicados.

O estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação. Os meios de cultura são ricos em compostos orgânicos como açúcares, aminoácidos e vitaminas, os quais proporcionam condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias e fungos (GEORGE, 1993). A efetividade da desinfestação do explante é dependente do tipo e idade do material utilizado, do tipo e concentração do desinfetante e do tempo de exposição do explante ao agente (SMITH, 2000). 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). Os protocolos de assepsia mais utilizados para sementes de espécies arbóreas florestais envolvem especialmente o hipoclorito de sódio, já utilizado para sementes de mogno (COUTO *et al.*, 2004), canjarana (ROCHA, 2005), cedro (NUNES *et al.*, 2002) e *Miconia* sp. (CID *et al.*, 1997).

O estabelecimento *in vitro* de gemas caulinares de teca apresenta grandes problemas com relação à produção de compostos fenólicos e à baixa resposta morfogênica dos explantes (SHIRIN e SARKAR, 2003). A utilização de solução de áci-

do bórico e ácido ascórbico a 0,1 % tem apresentado resultados satisfatórios para a minimização dos efeitos da oxidação com relação às oxidações no cultivo de teca (SHIRIN *et al.*, 2005).

Os estudos iniciais com a multiplicação *in vitro* de brotos de teca a partir de explantes de plantas adultas com a associação de 6-benziladenina (BA) e ácido 3-indolacético (AIA) nos meios de cultura demonstraram grande potencialidade para produção de mudas (SHARMA *et al.*, 2000; TIWARI *et al.*, 2002). O efeito de 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de brotos de teca tem sido reportado por diversos autores (GUPTA *et al.*, 1980; DEVI *et al.*, 1994; SHARMA *et al.*, 2000).

Shirin *et al.* (2005) descreveram um protocolo para a micropropagação de teca por meio de gemas axilares de plantas com 60 anos de idade, sendo que a multiplicação de brotos foi obtida com sucesso (6,33 brotos/explante) com a utilização de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 10 μM de BA e 1 μM de ANA. A adição de baixas concentrações de auxinas e citocininas aumentaram o número de brotos e o seu alongamento em teca, segundo Tiwari *et al.* (2002). De acordo com Gyves *et al.* (2007), um método eficiente de multiplicação de brotos consiste na redução de 50% da concentração de nitrato de amônia do meio de cultura MS suplementado com 1,5 mg.L^{-1} de BAP, com 0,01 mg.L^{-1} de ácido naftalenoacético (ANA) e com 0,1 mg.L^{-1} de ácido giberélico (GA3). A utilização de combinações de citocininas no meio de cultura também tem demonstrado eficiência na multiplicação clonal, associando 22,2 μM de BA com 11,62 μM de cinetina (KIN) (YASODHA *et al.*, 2005). Recentemente, elevadas taxas de multiplicação desta espécie foram obtidas com o uso de thidiazuron (TDZ) na concentração de 8 μM (AKRAM e AFTAB, 2008).

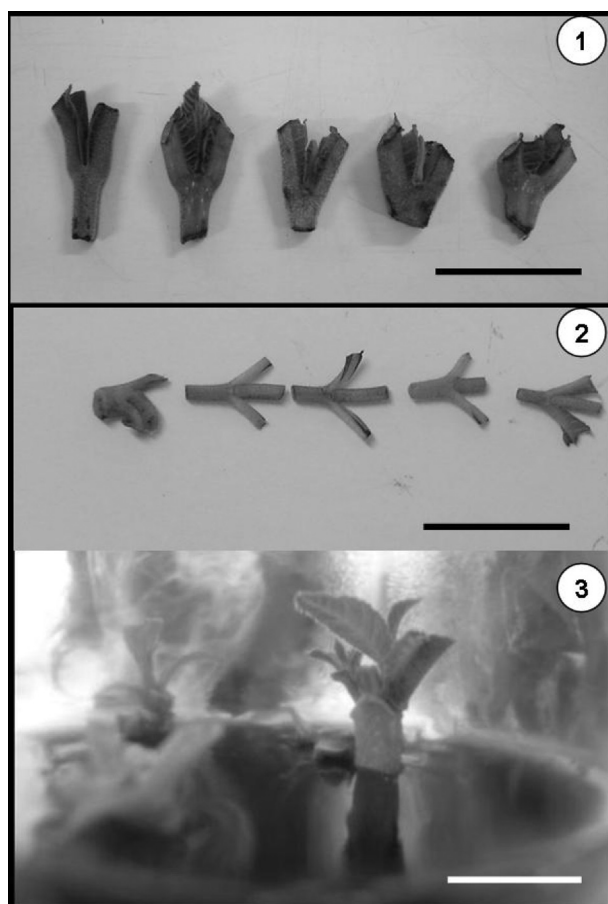
Estudos de micropropagação de teca a partir de genótipos estabelecidos no Brasil são essenciais para o sucesso dos plantios florestais nas regiões Centro-Oeste e Norte, os quais se encontram em expansão. As condições abióticas (variação de temperatura, umidade e chuvas) e bióticas (diversidade de microrganismos), as quais as plantas matrizes estão submetidas são fundamentais para o sucesso do estabelecimento *in vitro* e continuidade da micropropagação, bem como, na aclimatização das mudas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar diferentes protocolos de assepsia para a germinação de sementes e estabelecimento de gemas cauli-

nares provenientes de genótipos da Amazônia Sul-Occidental (Acre), bem como, avaliar as respostas fisiológicas na multiplicação *in vitro* de brotos com o uso de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) a partir de segmentos nodais de plantas de diferentes idades.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados com sementes e segmentos nodais apicais de plantas matrizes (Figura 1) de *Tectona grandis* L.f., coletadas na área experimental da Embrapa Acre, localizada no Km 12 da BR - 364, no município de Rio Branco, AC, e segmentos nodais de plântulas (Figura 2) germinadas *in vitro* no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre.



Figuras 1-3. Explantes e brotos de Teca (*Tectona grandis* L.f.). 1- Gemas oriundas de plantas adultas (6 anos). 2- Segmentos nodais (com 2 gemas axilares) de plântulas de 30 dias germinadas *in vitro*. (Barras= 2 cm). 3- Brotos regenerados após 30 dias em meio de cultura MS com 0,5 μ M de ANA + 2,2 μ M de BAP.

Figures 1-3. Explants and buds of Teak (*Tectona grandis* L.f.). 1- Buds from adult plants (6 years). 2- Nodal segments (with 2 axillary buds), germinated 30 days old. 3- Regenerated buds after 30 days in MS culture media with 0,5 μ M of ANA + 2,2 μ M of BAP. (Bars = 2 cm).

Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais (2 cm com 2 gemas), as mesmas foram coletadas de plantas adultas no início da estação chuvosa na Amazônia (novembro), lavadas com detergente comercial neutro e água corrente e com auxílio de escova com cerdas macias. Posteriormente, os segmentos nodais foram submersos por um minuto em álcool 70% e desinfestados em câmara de fluxo laminar, submetendo-as aos tratamentos de assepsia, considerando: T0 (controle) - imersão em água destilada por 10 min; T1- imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 10 min; T2- imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 20 min; T3- imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 min; T4- imersão em cloreto de mercúrio (0,1%) por 5 min; T5- imersão em cloreto de mercúrio (0,1%) por 10 min; T6- imersão em cloreto de mercúrio (0,1%) por 15 min; T7- imersão em cloreto de mercúrio (0,1%) por 20 min; e T8- imersão em cloreto de mercúrio (0,1%) por 30 min. A avaliação dos experimentos consistiu na determinação da porcentagem de contaminação e de oxidação, bem como na porcentagem de sobrevivência aos 30 dias.

Frutos de teca foram coletados no mês de julho e armazenados em câmara fria seca (10° C) por um mês, quando os frutos foram quebrados e as sementes retiradas manualmente. As sementes foram lavadas com detergente e água corrente. Posteriormente, foram submersas por um minuto em álcool 70% e desinfestadas em câmara de fluxo laminar, submetendo-as aos tratamentos de assepsia: T0 (controle) - imersão em água destilada por 10 min; T1- imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 10 min; T2- imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 20 min; T3- imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 min; e T4- imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 40 min. A avaliação foi feita pela porcentagem de contaminação após 15 dias de inoculação.

Após a imersão dos materiais vegetais nas soluções de desinfestação, procedeu-se à lavagem por 3 vezes com água destilada esterilizada. Posteriormente fez-se a inoculação em tubos de ensaio (20 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Para avaliar o efeito de meios de cultura e o efeito de luz na germinação *in vitro*, as sementes foram submetidas à assepsia, em câmara de fluxo laminar, em hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 min, seguida de tri-lavagem em água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram

inoculadas em frascos de vidro contendo 30 mL de diferentes concentrações salinas de meios nutritivos, na luz e no escuro, considerando: T1- com meio MS na presença de luz; T2- meio MS/2 na presença de luz; T3- meio Wood Plant Medium- WPM (LOYD e MCCOWN, 1981) com luz; T4- meio WPM/2 na presença de luz; T5- meio MS na ausência de luz; T6- meio MS/2 na ausência de luz; T7- meio WPM na ausência de luz; T8- meio WPM/2 na ausência de luz. A avaliação foi feita pela porcentagem de germinação após 15 dias de inoculação.

Nos experimentos de organogênese *in vitro* de brotações foram utilizados como explantes os segmentos nodais (com 2 gemas axilares) de plântulas germinadas *in vitro* (2 meses), e segmentos nodais apicais (2 cm com 2 gemas) de plantas adultas (6 anos). Os explantes foram inoculados em frascos de vidro, após a assepsia, contendo as seguintes formulações básicas de meios de cultura: sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar e a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,0; 2,2 µM; 4,4 µM; 8,8 µM; 17,7 µM combinados com 0,5 µM da auxina ácido naftalenoacético (ANA).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 23±2°C, fotoperíodo de 16h de luz, densidade de fótons de 38 µmol.m⁻².s⁻¹ e umidade ao redor de 58%. As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo, consistindo nos seguintes dados: número de brotos regenerados, número de nós por broto, e comprimento dos brotos.

Os experimentos foram organizados em delineamento completamente casualizado, com seis repetições por tratamento e cinco frascos por parcela, com cinco sementes ou segmentos

nodais, totalizando 25 por repetição. As médias foram comparadas por Análise de Variância (ANOVA), com a separação de médias pelo teste SNK com p<0,05 (SOKAL e ROHLF, 1995) utilizando-se o programa computacional SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de contaminação de segmentos nodais apicais de plantas adultas durante o estabelecimento *in vitro* de *T. grandis* demonstrou que os melhores tratamentos foram aqueles com mais de 15 minutos de exposição ao cloreto de mercúrio (0,1%) e também com 30 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio a 2,5 % (Tabela 1). Entretanto, nesses tratamentos com mais de 15 minutos de exposição ao cloreto de mercúrio foram registradas as mais altas porcentagens de oxidação e as mais baixas taxas de sobrevivência. As menores porcentagens de oxidação e as maiores porcentagens de sobrevivência foram observadas nos tratamentos com hipoclorito de sódio (2,5%). Portanto, nesses experimentos, a utilização hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos apresentou os melhores resultados com relação ao conjunto de fatores, com percentual de contaminação intermediária, menor oxidação e maior sobrevivência.

O sucesso da técnica de micropropagação tem como seu ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento *in vitro* com o maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos (oxidação) e com maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação.

Tabela 1. Tratamentos de desinfestação de gemas apicais de plantas adultas e estabelecimento *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. após 15 dias de inoculação.

Table 1. Treatments of disinfection of apical bud from adult plants and *in vitro* establishment of *Tectona grandis* L.f. after 15 days of inoculation.

	Contaminação Fúngica/bacteriana (%)	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)
Controle	100 a	NA	NA
NaOCl 2,5% por 10 min	63,3 ab	16,6 c	20,0 ab
NaOCl 2,5% por 20 min	60,0 ab	36,6 ab	33,3 b
NaOCl 2,5% por 30 min	43,3 c	56,6 a	0,5 c
HgCl ₂ 0,1% por 5 min	83,3 b	6,6 a	6,6 ab
HgCl ₂ a 0,1% por 10 min	83,3 b	16,6 c	0,8 c
HgCl ₂ a 0,1% por 15 min	26,6 c	63,3 b	10,0 ab
HgCl ₂ a 0,1% por 20 min	46,6 c	60,0 b	0,1 c
HgCl ₂ a 0,1% por 30 min	40,0 c	60,0 b	0,1 c
Média Geral	60,7	39,5	8,9
CV (%)	13	15	14

Nota: Letras diferentes comparadas na vertical indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de SNK (ao nível de 5% de significância). NA= não avaliado.
Note: Different letter compared upright differentiate indicate statistically significant by SNK test (the level of significance of 5%). NA = Not rated.

As espécies arbóreas apresentam dificuldade para o estabelecimento *in vitro* devido à grande diversidade de microrganismo contaminantes, principalmente se for utilizado material vegetal de indivíduos adultos (COUTO *et al.*, 2004). Os agentes desinfestantes comumente utilizados na cultura de tecidos para a assepsia de segmentos nodais e gemas apicais incluem o etanol, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio (HARTMANN *et al.*, 1990; VASSIL e THORPE, 1994).

Para genótipos de *T. grandis* na Amazônia Sul-Occidental (Acre) as médias gerais obtidas demonstram elevados percentuais de contaminação (60,7%) e reduzidas percentagens de sobrevivência de segmentos nodais apicais (8,9%) *in vitro*, indicando dificuldades nessa etapa da propagação *in vitro*.

A maior percentagem de contaminação das sementes por fungos e/ou bactérias foi verificada no tratamento T1 (2,5 % de hipoclorito de sódio por 10 minutos) com média de 70 % (Tabela 2), e as menores percentagens de contaminação nas sementes foram verificadas nos demais tratamentos com hipoclorito de sódio (T2, T3 e T4). Entretanto, o tratamento mais adequado para a assepsia de sementes de teca é a exposição em hipoclorito de sódio a 2,5% por 40 minutos.

Tabela 2. Tratamentos de desinfestação de sementes de *Tectona grandis* L.f. após 15 dias de inoculação.

Table 2. Disinfection treatments of seeds from *Tectona grandis* Lf after 15 days of inoculation.

Tratamentos	Contaminação (%)
Controle	100 a
NaOCl a 2,5% por 10 min	70,0 b
NaOCl a 2,5% por 20 min	10,0 c
NaOCl a 2,5% por 30 min	13,3 c
NaOCl a 2,5% por 40 min	6,6 c
Média Geral	39,9
CV (%)	14,3

Nota: Letras diferentes comparadas na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de SNK (ao nível de 5% de significância).

Note: Different letter compared upright differentiate indicate statistically significant by SNK test (the level of significance of 5%). NA = Not rated.

Diversos estudos apontam diferenças significativas entre os tratamentos empregados na assepsia de sementes. Em estudos com desinfestação de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*), Couto *et al.* (2004) observaram 89 % de contaminação quando as sementes não eram submetidas ao tratamento com substâncias desinfetantes. Em outro estudo com a mesma espécie, Venketeswaran *et al.* (1987) conseguiram

a desinfestação das sementes usando hipoclorito de sódio a 10% por 10 minutos, demonstrando a importância desse agente na assepsia de sementes. Outros pesquisadores desinfestaram as sementes do mogno com etanol 70% (3 segundos), seguido de hipoclorito de sódio comercial na concentração de 5,5% por 20 minutos (VALVERDE-CERDAS *et al.*, 1998). Com *Cedrela fissilis* foram utilizadas sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5% por 75 minutos para a obtenção de explantes assépticos (NUNES *et al.*, 2002). Na propagação *in vitro* do *Eucalyptus sideroxylon*, sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5% e por 20 minutos (CHENG *et al.*, 1992). Os resultados de *T. grandis* indicam facilidade e viabilidade da técnica de micropropagação com a utilização de hipoclorito de sódio nas concentrações comerciais para a assepsia de sementes.

Os diferentes métodos empregados para o estabelecimento *in vitro* em diferentes estudos demonstram a influência dos diferentes biomas brasileiros no que se refere à composição microbiológica associada às plantas, bem como, às particularidades morfológicas das sementes (rugosidade) e gemas (tricomas), abrigando os microrganismos.

A germinação de *T. grandis* começou após 5 dias de inoculação *in vitro* das sementes, e após 15 dias, altos percentuais de germinação foram alcançados (máximo de 83,3%). Em estudos com germinação *in vitro* de *Amburana acreana* (cerejeira), uma espécie arbórea da Amazônia Sul-Occidental, Fermino-Junior. *et al.* (2007), registraram a germinação *in vitro* após oito dias de inoculação, apresentando 78% de germinação após 30 dias. 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), em um período de seis a dez dias.

As maiores porcentagens de germinação das sementes *in vitro* ocorreram na presença de luz no meio MS e WPM (Tabela 3). Estes percentuais de germinação sugerem alto poder germinativo *in vitro* de *T. grandis*, quando comparada com a germinação dessa espécie em campo (20-25%) na Índia ((MONTEUUIS e MAITRE, 2007) e com outras espécies florestais, como é o caso do Pau rosa (*Aniba roseodora* Ducke) e da Sucupira branca (*Pterodon pubescens* Benth), que não apresentam boa germinação *in vitro* ou necessitam de período mais longo para germinar (COELHO, 1999; FRANÇA *et al.*, 1997), respectivamente.

Tabela 3. Germinação *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. em diferentes meios de cultura na presença de luz e no escuro após 15 dias.

Table 3. *In vitro* germination of *Tectona grandis* L.f. in different culture media in the presence of light and the dark after 15 days.

	Meios	Germinação (%)
Luz	MS	83,3 a
	MS/2	40,0 bc
	WPM	60,0 ab
	WPM/2	43,3 bc
Escuro	MS	26,6 bc
	MS/2	10,0 c
	WPM	6,6 c
	WPM/2	23,3 bc
Média geral		36,6
CV (%)		15,4

Nota: Letras diferentes comparadas na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de SNK (ao nível de 5% de significância).

Note: Different letter compared upright differentiate indicate statistically significant by SNK test (the level of significance of 5%). NA = Not rated.

Boas taxas de germinação também foram obtidas por Cordeiro *et al.* (2002) na germinação de sementes de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber), na qual obtiveram 94% de germinação aos 15 dias de cultivo *in vitro*. Os resultados obtidos nesse estudo com *T. grandis* com a maior eficiência nos tratamentos com luz concordam com as conclusões de Passos *et al.* (2006), os quais demonstram que teca é uma espécie heliófita, relatando elevada mortalidade de plantas jovens em situações de alta densidade no plantio, ou seja, com sombreamento.

O processo de germinação é um mecanismo natural que depende da viabilidade das sementes e das condições ambientais favoráveis (BEWLEY e BLACK, 1984). Além da temperatura, os substratos utilizados nos testes de germinação interferem no resultado final, atuando diretamente na aeração, estrutura e capacidade de retenção de água (POPINIGIS, 1985). O excesso de água pode acarretar aceleração da deterioração, enquanto a falta de água pode interromper processos metabólicos importantes (MELLO e BARBEDO, 2007). Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1993). Em *T. grandis*, a utilização dos meios plenos de MS e WPM na presença de luz conferem condições osmóticas mais adequadas à germinação *in vitro*.

Nos experimentos de organogênese *in vitro*, a combinação de 0,5 μM de ANA + 2,2 μM BAP su-

plementada ao meio de cultura básico MS, proporcionou os melhores resultados para as variáveis número de brotos, número de nós por broto e altura dos brotos em gemas cultivadas obtidas a partir de plântulas (Figura 3). Em gemas de plantas adultas, os melhores resultados foram obtidos com a adição exógena de 0,5 μM de ANA + 4,4 μM de BAP. Segundo Tiwari *et al.* (2002), a adição exógena de baixas concentrações de auxinas e citocininas aumentam o número de brotos e o seu alongamento em teca, entretanto, com os explantes avaliados nesse experimento, baixos números de brotos e altura das brotações também foram observadas em pequenas concentrações de BAP, existindo, portanto, uma concentração hormonal exógena ótima para os maiores números de brotos e altura das brotações.

Os resultados obtidos com a utilização de meio MS suplementado com BAP e ANA nesse protocolo favorecem o desenvolvimento de uma taxa pequena de multiplicação (1,2) de brotos, quando comparado com protocolos de Gyves *et al.* (2007) com redução da concentração de nitrato de amônia no meio MS suplementado com BAP, AIB e GA3 favorecendo a formação de 4,0 brotos por explante, e com o protocolo de Akram e Aftab (2008), com meio de cultura MS suplementado com 8 μM de TDZ.

De modo geral, observa-se que altas concentrações de BAP para as variáveis analisadas são consideradas de menor eficiência nas respostas organogênicas *in vitro*, reduzindo principalmente o número e altura dos brotos formados. Segundo Grattapaglia e Machado (1998) as citocininas constituem o grupo de fitoreguladores indispensável para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, tipo e a concentração das mesmas são os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro*. O uso de baixas concentrações de BAP ao meio de cultura também tem sido indicado como eficiente na multiplicação de brotos para espécies lenhosas como paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) (CORDEIRO *et al.*, 2004), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) e sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.), espécies estudadas por Ponte (1999) e Coelho (1999).

A comparação dos resultados entre as gemas obtidas de plântulas e de plantas adultas indica a existência de diferenças nas respostas morfológicas com relação à idade dos explantes. (Tabela 4). Em explantes mais jovens (segmentos nodais de plântulas), a indução de organogênese de brotos foi

Tabela 4. Multiplicação *in vitro* de brotos de *Tectona grandis* L.f. a partir de gemas caulinares de plantas de diferentes idades.

Table 4. *In vitro* multiplication of shoots of *Tectona grandis* Lf from shoot buds of plants in different stages.

Concentração de BAP + 0,5 µM ANA	Número de brotos		Número de nós/broto		Altura dos brotos (cm)	
	Plântulas	Plantas adultas	Plântulas	Plantas adultas	Plântulas	Plantas adultas
0	1,12 bA	1,04 bA	2,33 bA	2,83 cA	1,62 bcA	1,78 abA
2,2 µM	1,75 aA	1,20 bB	3,91 aA	4,70 aA	3,00 cA	1,00 cB
4,4 µM	1,08 bB	1,75 aA	2,62 bB	4,95 aA	1,52 bcB	2,12 aA
8,8 µM	1,04 bA	1,16 bA	2,66 bA	3,54 bA	1,77 bB	2,00 aA
17,7 µM	1,12 bA	1,20 bA	2,45 bA	1,62 dA	1,10 cA	1,50 cA
Média geral	1,22	1,27	2,79	3,52	1,8	1,68
CV (%)	8,8	9,3	9,1	9,7	9,3	8,8

Nota: Letras minúsculas diferentes comparadas na vertical e letras maiúsculas diferentes comparadas na horizontal indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de SNK (ao nível de 5% de significância).

Note: Small Caps different compared upright and capitalization different compared horizontally indicate statistically significant differences by SNK test (the level of significance of 5%).

mais eficiente com menor adição exógena de BAP, indicando provavelmente a existência de menor quantidade de receptores nas células meristemáticas e/ou menor concentração endógena hormonal das gemas de plantas adultas de *Tectona grandis* L.f.. A composição do meio de cultura e os fatores ambientais podem resultar na intensificação das respostas morfogênicas, bem como em maior número de explantes responsivos (GEORGE, 1993). A variação no número de receptores e sua distribuição, durante o desenvolvimento, podem alterar a sensibilidade das células aos hormônios ou outros sinais (BARENDSE e PEETERS, 1995).

CONCLUSÕES

A utilização de hipoclorito de sódio a 2,5 % por 20 minutos na assepsia de gemas apicais de plantas adultas é mais eficiente do que o cloreto de mercúrio (0,1%) no estabelecimento *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. nas condições da Amazônia Sul-Occidental (Acre).

As menores porcentagens de contaminação em sementes são verificadas nos tratamentos com imersão em hipoclorito de sódio por 20, 30 e 40 minutos.

Maiores porcentagens de germinação das sementes *in vitro* ocorrem na presença de luz nos meios MS e WPM na composição original de sais.

A combinação de 0,5 µM de ANA + 4,4 µM de BAP promovem nas gemas apicais de plantas adultas o maior número de brotos, número de nós/broto e altura dos brotos. A combinação de 0,5 µM de ANA + 2,2 µM de BAP promovem nos segmentos nodais de plântulas os maiores números de brotos, número de nós/broto e altura dos brotos.

Gemas caulinares oriundas de indivíduos jovens de *T. grandis* são induzidas para a formação de brotos com menor concentração de BAP do que gemas de plantas adultas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa Biotecnologia Vegetal da Amazônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRAM, M; AFTAB, F. High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron. **Propagation of ornamental plants**, Sofia, v.8, n.2, p.72-75, 2008.

BALL, J.B.; PANDEY, D.; HIRA, I.S. Global overview of teak plantations. **Teaknet publication**, Yangon, v.3, p.11-33, 2000.

BARENDSE, G.W.M.; PEETERS, T.J.M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Botanica of Netherland**, Amsterdam, v.44, n.1, p.3-17, 1995.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum, 1984. 445p.

CHENG, B.; PETERSON, C.M.; MITCHELL, R.J. The role of sucrose, auxin and explant source on *in vitro* rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. **Plant science**, Amsterdam, v.87, n.2, p.207-214, 1992.

CID, L.P.B.; GOMES, A.C.M.; COSTA, S.B.R.; TEIXEIRA, J.B. Micropropagation of *Miconia* sp. a woody melastomataceae from Brazil, using Thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.9, n.1, p.21-27, 1997.

- COELHO, M.C.F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth.)**. 1999. 119p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- CORDEIRO, I.M.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*, Lavras, 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*, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642, 2004.
- DEVI, Y.S.; MUKHERJEE, B.B.; GUPTA, S. Rapid cloning elite teak (*Tectona grandis* Linn.) by *in vitro* multiple shoot production. *Indian Journal Experimental Biology*, Delhi, v.32, p.668-671, 1994.
- FEARNSIDE, P.M. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. *Acta Amazonica*, Manaus, v.36, n.3, p.395-400, 2006.
- FERMINO JUNIOR, P.C.P.; PEREIRA, J.E.S.; NAGAO, E.O.; GUEDES, R.S. 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. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v.13, supl., p.811-815, 2007.
- FIGUEIREDO, E.O.; OLIVEIRA, L.C.; BARBOSA, L.K.F. **Teca (*Tectona grandis* L.f.): principais perguntas do futuro empreendedor florestal**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2005. p.10-19.
- FRANÇA, R.B.; SANTOS, D.S.B.; MOTA, M.G.C.; VIEIRA, I.M.S.; CABRAL, B.L.R. Indução e crescimento de plântulas de pau-rosa (*Aniba roseodora* Ducke) *in vitro*. In: REUNIÃO DOS BOTÂNICOS DA AMAZÔNIA, 2., Salinópolis, 1997. **Resumos...** Belém: Sociedade Botânica do Brasil, 1997.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture. *Exegetics*, Edington, v.1, p.1-555, 1993.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v.1, p.99-169.
- GUPTA, P.K.; NADGIR, A.I.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANATHAN, V. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* (teak) by tissue culture. *Plant Science Letters*, Amsterdam, v.17, p. 259-268, 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. *Annals of Forest Science*, Nancy, v.64, p.73-78, 2007.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. (Eds) **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 647p.
- LEMOS, O.F. Produção de plântulas para micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, 1998. p.216.
- LOPES, S.C. **Micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla*)**. 2000. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.
- LOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, Carlisle, v.30, p.421-427, 1981.
- MELLO, J.I.O.; BARBEDO, C.J. Temperatura, luz e substrato para germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Árvore*, Viçosa, v.31, n.4, p.645-655, 2007.
- MONTEUUIS, O.; MAITRE, H.F. Advances in teak cloning. *ITTO Tropical Forest update*, Yokohama, v.17, n.3, p.13-15, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.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, v.70, p.259-268, 2002.
- PASSOS, C.A.M.; BUFULIN-JUNIOR, L.; GONÇALVES, M.R. Avaliação silvicultural de *Tectona grandis* L.f., em Cáceres, MT, Brasil: resultados preliminares. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v.16, n.2, p.225-232, 2006.

- PONTE, E.M.D. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus* sp. *Globulus* Labill.** 1999. 47p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** Brasília: AGIPLAN, 1985. 285p.
- ROCHA, S.C. **Micropropagação da canjarana (*Cabrlea canjarana*).** 2005. 85p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- SHARMA, S.; RANA, P.K.; MANDAL, A.K.; ANSARI, S.A. Promotion of shoot multiplication by vipul (triacontanol) and adventitious rhizogenesis by rice bran extract in *Tectona grandis*. **Journal of Plant Biology**, Pohang, v.27, p.265-269, 2000.
- SHIRIN, F.; SARKAR, A.K. Removal of phenolic exudates from explants of *Tectona grandis*. **Teaknet publication**, Yangon, v.30, p.4-6, 2003.
- SHIRIN, F.; RANA, P.K.; MANDAL, A.K. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **Journal Forest Research**, Tokyo, v.10, p.465-469, 2005.
- SMITH, J. **Micropropagation of the Gynea Lily.** Barton: Rural Industries Research & Development Corporation, 2000. 50p.
- SOKAL, R.R.; ROHLE, F.J. **Biometry.** San Francisco: Freeman and Company, 1995. 776p.
- TIWARI, S.K.; TIWARI, K.P.; SIRIL, E.A. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.71, p.1-6, 2002.
- VALVERDE-CERDAS, L.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. *In vitro* organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla*. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v.42, p.225-228, 1998.
- VASSIL, I.K.; THORPE, T.A. **Plant cell, and tissue culture.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 593p.
- VENKETESWARAN, S.; DIAS, M.; SULTANBAWA, F.; WEYERS, U.V. **Tissue culture on mahogany tree *Swietenia*.** London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p.147-153.
- VIANA, A.M.; MAZZA, M.C.; MANTELL, S. Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian rain forests. In: BENSON, E.E. **Plant conservation biotechnology.** London: Taylor & Francis, 1999. cap.6, p.83-95.
- XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal.** Viçosa: Editora UFV, 2007. p.55-74.
- YASODHA, R.; SUMATHI, R.; GURUMURTHI, K. Improved micropropagation methods for teak. **Journal of Tropical Forest Science**, Kepong, v.17, n.1, p.63-75, 2005.
- YASODHA, R.; SUMATHI, R.; GURUMURTHI, K. Micropropagation for quality propagule production in plantation forestry. **Indian Journal of Biotechnology**, Haryana, v.3, n.2, p.159-170, 2004.

Recebido em 16/02/2009

Aceito para publicação em 18/09/2009

