

# Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke)

Lyana Silva JARDIM<sup>1</sup>, Paulo de Tarso Barbosa SAMPAIO<sup>2</sup>, Suely de Souza COSTA<sup>3</sup>, Cláudia de Queiroz Blair GONÇALVES<sup>4</sup>, Hélio Leonardo Moura BRANDÃO<sup>5</sup>

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), utilizando brotações apicais e segmentos nodais inoculados em meio de cultura com distintas concentrações de diferentes reguladores de crescimento. Explantes esterilizados com soluções de benomyl (4,0 g.L<sup>-1</sup>) por 24 horas e hipoclorito de sódio a 20% + tween 20 por 20 minutos, foram submetidos a um experimento de indução de broto, raiz e calo em meio MS1 acrescido de 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 9g.L<sup>-1</sup> de agar, suplementado com BAP (0,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>), ANA, AIA e 2,4-D (0,0; 3,0 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup>), e suas respectivas combinações. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 7 X 2, com 14 tratamentos e 15 repetições cada, onde foram analisados o número médio de brotos, raízes e calo. Após 90 dias, os resultados mostraram que a presença de auxinas é fundamental para a formação dos parâmetros induzidos nos explantes de pau-rosa. O meio de cultura contendo 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIA apresentou a melhor média para a brotação com 2,13 brotos/explante. Para o enraizamento o meio contendo 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA foi o mais eficiente, apresentando uma média de 2,53 raízes/explante. Em relação à indução de calo, todos os tratamentos apresentaram calogênese, porém o meio suplementado com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, apresentou a melhor média, 1,67 calos/explante.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aniba rosaeodora* Ducke; Regeneração *in vitro*; Reguladores de crescimento;

## Effect of different growth regulators *in vitro* propagation of *Aniba rosaeodora* Ducke.

## ABSTRACT

The objective of this work was to establish a protocol for *in vitro* regeneration of rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke), using apical and nodal segments inoculated in culture medium with various concentrations of growth regulators. Explants disinfected with solutions of benomyl (4,0 g.L<sup>-1</sup>) for 24 hours and sodium hypochlorite in 20% + tween 20 for 20 minutes were submitted in an experiment of shoot, root and callus induction in MS medium, with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose and 9,0 g.L<sup>-1</sup> of agar added with the growth regulators: BAP (0,0 and 4,0 mg.L<sup>-1</sup>), ANA, AIA and 2,4-D (0,0; 3,0 and 6,0 mg.L<sup>-1</sup>), and their respective combinations. The design was complete randomized in arranged factorial 7 X 2, with 14 treatments and 15 replications, where about the explants were analysed the number of shoot, root and callus. After 90 days, the results showed that the presence of auxins is fundamental to induce buds, roots and callus. The medium was contained 4,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 6,0 mg.L<sup>-1</sup> AIA showed the best average for shooting with 2,13 buds/explants. In the rooting, the medium was contained 3,0 mg.L<sup>-1</sup> of ANA was the more efficient, showed 2,53 roots/explant. However, all the treatments obtained formation of callus, but the medium with 4,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 6,0 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D showed the best result, 1.67 callus/explant.

**KEYWORDS:** *Aniba rosaeodora* Ducke; *In vitro* regeneration; Growth regulators.

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Pesquisas Amazônia – INPA, E-mail: lyanjardim@hotmail.com

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Pesquisas Amazônia – INPA, E-mail: sampaio@inpa.gov.br

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Pesquisas Amazônia – INPA, E-mail: sscosta@inpa.gov.br

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Pesquisas Amazônia – INPA, E-mail: blairflorestal@hotmail.com

<sup>5</sup> Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária – INCRA, E-mail: leonardomb@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

*Aniba rosaeodora* Ducke, pertencente à família das lauráceas, é uma árvore de grande porte, podendo atingir até 30 m de altura por 2 m de diâmetro. O valor comercial esta no óleo essencial destilado da madeira, galhos e folhas, fato responsável pelo desaparecimento das populações naturais desta espécie nos estados do Amapá, Pará e em grande parte do Amazonas (May e Barata, 2004).

O óleo do pau-rosa é constituído principalmente (80-90%) por um metabólito secundário conhecido como linalol, uma substância fixadora, de aroma característico usado na fabricação de perfumes, fragrâncias e sabonetes, por grandes multinacionais estrangeiras (May e Barata, 2004), (Maia *et al.* 2007).

Nos últimos 30 anos a exportação do óleo do pau-rosa para o mercado internacional, esta em acentuado declínio. Vários são os motivos que contribuíram para esta redução: desaparecimento das populações naturais da espécie, a falta de logística adequada, custos de produção altos, legislação florestal e o comércio de linalol sintético (Maia *et al.* 2007).

As árvores de pau-rosa apresentam baixa e irregular produção de sementes, que aliada à elevada predação por pássaros, insetos e roedores, transforma a coleta de sementes numa operação difícil e cara. Técnicas de propagação assexuada, a exemplo de micropropagação, pode se consolidar como uma alternativa para propagação desta espécie (Rosa *et al.* 1999; Spironello *et al.* 2001).

Uma das peculiaridades da micropropagação é a possibilidade do maior controle das diferentes fases do crescimento dos explantes *in vitro*. Isso não seria possível, sem adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, compostos orgânicos dos quais em baixas concentrações, promovem, inibem, ou, ainda, modificam o crescimento do vegetal quando cultivados *in vitro* (Hartmann *et al.* 2002). Estes componentes direcionam o metabolismo do explante para o processo desejado, e os efeitos observados quanto às respostas das células, tecidos e órgãos *in vitro*, variam de acordo com as condições ambientais, o tipo do explante e o genótipo da planta (Pasqual, 2001).

O tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* (Hartmann *et al.* 2002)

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo para a regeneração *in vitro* de explantes de pau-rosa, usando-se os reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA), ácido 3 - indolacético (AIA), ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6 - benzilaminopurina (BAP) em meio de cultura, para indução

de broto, raiz e calo em brotações apicais e segmentos nodais de pau-rosa.

## MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade do Estado do Amazonas. Brotações apicais e segmentos nodais coletados de plântulas germinadas em viveiro, foram lavados em água corrente e imersos em solução de benomyl (4,0 g.L<sup>-1</sup>) por 24 horas. Na câmara de fluxo laminar, passaram por uma assepsia utilizando solução de hipoclorito de sódio comercial a 20% (com 2,0 a 2,5% p/p do princípio ativo) acrescido com 3 gotas do agente emulsionante tween 20 por 20 minutos.

Em seguida, os explantes foram lavados com água destilada autoclavada em abundância, e inoculados em tubos de ensaio (20 X 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura **MS1**, composto pelo meio de Murashige e Skoog (1962), com as soluções I, II e III dos macronutrientes, reduzidas pela metade, acrescido de 30g de sacarose e 8g de ágar, com pH ajustado para 5,8. Após a inoculação, os explantes foram acondicionados na estufa incubadora do tipo B.O.D., mantidos no escuro durante 48 horas a uma temperatura de 26°C, e posteriormente conduzidos à sala de crescimento sob condições ambientais controladas: fotoperíodo de 16 horas luz, temperatura de 27°C ± 2°C, umidade relativa do ar de 70%, e luminosidade com 52 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de irradiância.

Passado 15 dias, os explantes visualmente sadios foram transferidos para o meio MS1, acrescido de 30g de sacarose, 9g de ágar, com distintas dosagens de reguladores de crescimento: BAP nas concentrações: 0,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, ANA, AIA e 2,4-D nas concentrações: 0,0; 3,0 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup> e suas respectivas combinações (Tabela 1), para a indução de broto, raiz e calo.

**Tabela 1** – Concentrações e combinações de BAP, ANA, AIA, e 2,4-D, testados no meio MS para indução de broto, raiz e calo em explantes de *Aniba rosaeodora* Ducke, 2005.

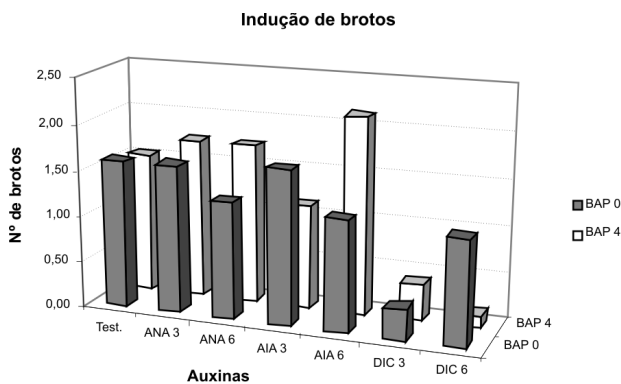
Trat <sup>o</sup>	Dose dos reguladores de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )	Trat <sup>o</sup>	Dose dos reguladores de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )
T <sub>1</sub>	Testemunha	T <sub>8</sub>	0,0 de ANA + 4,0 de BAP
T <sub>2</sub>	3,0 de ANA + 0,0 de BAP	T <sub>9</sub>	3,0 de ANA + 4,0 de BAP
T <sub>3</sub>	6,0 de ANA + 0,0 de BAP	T <sub>10</sub>	6,0 de ANA + 4,0 de BAP
T <sub>4</sub>	3,0 de AIA + 0,0 de BAP	T <sub>11</sub>	3,0 de AIA + 4,0 de BAP
T <sub>5</sub>	6,0 de AIA + 0,0 de BAP	T <sub>12</sub>	6,0 de AIA + 4,0 de BAP
T <sub>6</sub>	3,0 de 2,4 - D + 0,0 de BAP	T <sub>13</sub>	3,0 de 2,4 - D + 4,0 de BAP
T <sub>7</sub>	6,0 de 2,4 - D + 0,0 de BAP	T <sub>14</sub>	6,0 de 2,4 - D + 4,0 de BAP

Após a inoculação os explantes permaneceram na sala de crescimento por 2 semanas, sendo mantidos no escuro nos primeiros 5 dias. Em seguida, foram transferidos para o meio MS1, sem os reguladores de crescimento, e avaliados após 90 dias. Foram avaliados o número médio de brotos, raízes e calo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 X 2, com 14 tratamentos e 15 repetições cada. Os dados foram submetidos à ANOVA e a comparação das médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da ANOVA, revela diferença significativa entre as médias do número de brotos quando os explantes de pau-rosa são submetidos a doses isoladas de auxinas. Entretanto, não existe diferença significativa quando combina-se auxina com citocinina (Figura 1).



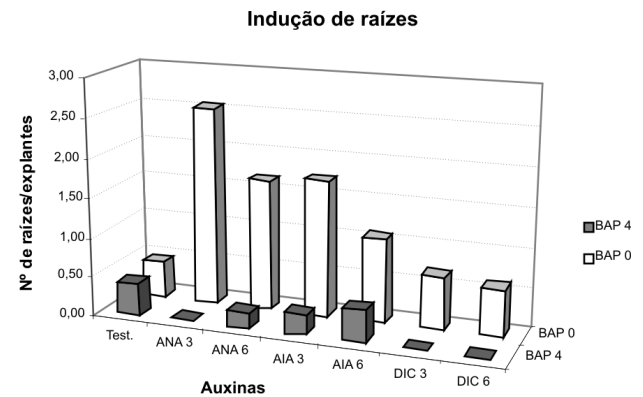
**Figura 1** - Gráfico das médias referentes ao número de brotos formados por explante *in vitro* de *Aniba rosaeodora* Ducke, 2005

O tratamento T12 que combina 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIA estimulou o maior número de brotos por explante (2,13 brotos) de pau-rosa e difere significativamente ( $p < 0,001$ ) do tratamento testemunha (Figura 1). Resultados similares foram observados por Santos *et al.* 2005 e São José *et al.* 2005, que observaram maior número de brotos em segmentos nodais de espécies florestais cultivados *in vitro* em meio MS com combinações de citocininas com auxinas.

As citocininas são responsáveis pela quebra de dormência apical e indução de proliferação de gemas axilares em explantes cultivadas *in vitro*. Neste estudo, a concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP estimulou de maneira significativa o número de brotos nos explantes de pau-rosa. Da mesma maneira, as combinações das auxinas com o BAP, induziram maior número brotações nos explantes de pau-rosa (Figura 1). Maiores concentrações de auxinas podem inibir as brotações e favorecer o enraizamento ou formação de calo (Souza e Junghans, 2006; Grattapaglia e Machado, 1998).

A comparação das médias do número de raízes pelo teste de Tukey revelou diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) quando os explantes de pau-rosa foram submetidos a doses isoladas de

auxinas. Entretanto, não foi observado diferenças significativas para concentrações isoladas do BAP ou a combinação do BAP com as auxinas (Figura 2).



**Figura 2** - Gráfico das médias referentes ao número de raízes formadas por explante *in vitro* de *Aniba rosaeodora* Ducke, 2005

O tratamento T<sub>2</sub> com concentração de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA em meio MS1 apresentou o maior número de raízes/explante (2,53) seguido do tratamento T<sub>4</sub> com 1,66 raízes/explante. Estes resultados são similares aos observados em outras espécies florestais, a exemplo do mogno (*Swietenia macrophylla* King) e *Searsia dentata* (Anacardiaceae) onde explantes submetidos a diferentes concentrações de auxinas (ANA e AIB) desenvolveram maior número de raízes (Lopes *et al.* 2001; Prakash e Staden, 2008).

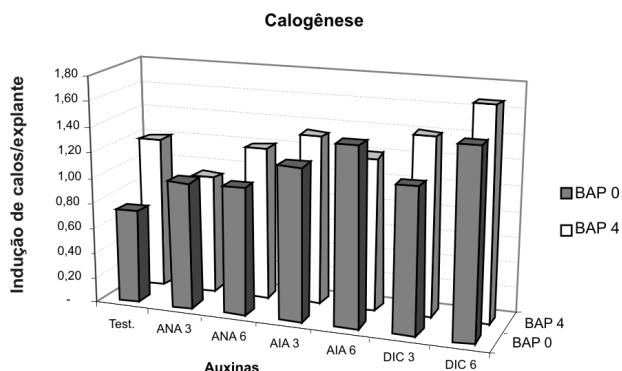
Diversos estudos indicam que as citocininas geralmente são suprimidas no meio de cultura para a formação de brotações adventícias. Enquanto as auxinas são os reguladores de crescimento que estimulam a formação de primórdios radiculares em tecidos que apresentam predisposição ao enraizamento (Santos *et al.* 2003). Este fato foi observado neste estudo, onde explantes de pau-rosa tratados com ANA desenvolveram maior número de raízes (Figura 2).

Deve-se considerar que nem sempre as auxinas naturais ou sintéticas podem induzir primórdios radiculares em explantes *in vitro*. Algumas espécies vegetais, principalmente lenhosas, enraízam com dificuldade ou não enraízam na presença delas, indicando que outros fatores influenciam na função de primórdios radiculares *in vitro* (Souza e Junghans, 2006).

A formação de calo aumentou de maneira significativa ( $p < 0,001$ ) quando os explantes de pau-rosa foram submetidos a doses isoladas de auxinas e a combinação destas com citocininas. Todos os tratamentos testados responderam satisfatoriamente à calogênese (Figura 3).

O tratamento T<sub>14</sub> que combinou 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, apresentou a maior média de calos por explante (1,67) e difere significativamente pelo teste de

Tukey da testemunha. Estes resultados confirmam que o uso de auxinas nos explantes de pau-rosa estimulam a formação de calo e raízes (Figuras 2 e 3).

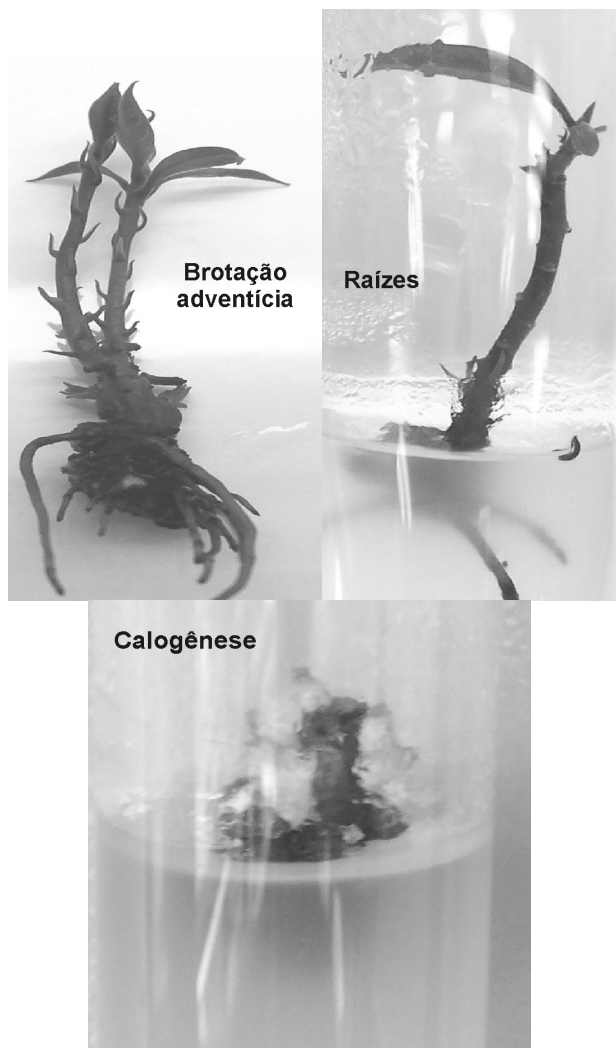


**Figura 3** - Gráfico das médias referentes à formação de calo em explantes de *Aniba rosaeodora* Ducke, obtidos *in vitro*, 2005.

A ação positiva das auxinas para indução da calogênese em explantes de diferentes espécies herbáceas ou lenhosas já foi observado por diversos autores (Cerqueira *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2007). Segundo estes autores, segmentos caulinares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), segmentos nodais e ápices caulinares de unha-de-gato (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) desenvolveram calogênese e raízes quando submetidos a diferentes concentrações e combinações de auxina e citocinina.

Neste estudo, o uso de auxinas e citocinina foram preponderantes para a formação de calo e raízes nos explantes de pau-rosa (Figura 4). Entretanto, a reação de um tecido *in vitro* depende do balanço entre essas duas classes de reguladores. O aumento da auxina induz a formação de raízes; enquanto o aumento da citocinina induz a formação de gemas adventícias; e quando existe uma relação intermediária entre as duas, se induz o calo (Santos *et al.* 2003). Novos estudos testando auxinas e citocininas em diferentes concentrações poderiam contribuir para otimizar a formação de calos e raízes em explantes de pau-rosa.

A propagação do pau-rosa via sexuada ou assexuada é necessária frente à grande demanda de mudas para plantios comerciais visando à produção de óleo. Neste aspecto, a formação de calo é um processo importante para a obtenção indireta de plantas. Os mesmos podem conter células isoladas ou em grupo que possuem centros ativos de divisão celular, onde induzidos em condições adequadas se capacitam para produção de novos órgãos.



**Figura 4** - Brotação adventícia adquirida em um explante (A); Segmento nodal contendo três raízes, após 45 dias de incubação em meio de cultura (B). Brotação apical de *Aniba rosaeodora* Ducke, totalmente envolvida por calo (C).

## CONCLUSÕES

Os segmentos nodais ou brotações dos ápices de plântulas jovens de pau-rosa quando cultivados *in vitro* possuem a capacidade de regenerar brotos, calos e raízes adventícias.

A combinação de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIA estimulou maior número de brotos em segmentos nodais e ápices de plântulas de pau-rosa cultivadas *in vitro*.

A concentração de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA em meio MS induziu o maior número de raízes em segmentos nodais e ápices de plântulas de pau-rosa cultivadas *in vitro*.

A maneira complexa com que auxinas, citocinina e as células interagem *in vitro*, revelam a necessidade de novos estudos sobre concentrações e combinações de reguladores de crescimento visando otimizar o protocolo de regeneração e multiplicação *in vitro* desta espécie.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, à Universidade do Estado do Amazonas e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Assis, T.F.; Teixeira S.L. 1998. Enraizamento de plantas lenhosas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds) *Cultura de Tecido de Plantas*. ABCT/EMBRAPA-CNPq. Brasília. p. 261 – 296.
- Cerqueira, E.S.; Pinto, J.E.B.P.; Moraes, A.R.; Castro, N.E.A.; Cardoso, M.G.; Lameira, O. A. 2002. Callus induction in grass-of-bull (*Tridax procumbens* L.) using different growth regulators and explant types. *Ciência Agrotecnica.*, 26: 301-308 (in Portuguese, with abstract in English).
- Grattapaglia, D.; Machado, M.A. 1998. Micropropagation, p.183-260. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) *Tissue Culture and Genetic Transformation of Plant*. V.1. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq. Brasília (in Portuguese).
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies JR. F. T. D.; GENEVE, R. L. 2002. *Plant propagation: principles and practices*. Prentice-Hall/Englewood Cliffs, New Jersey. 7<sup>th</sup> ed. Upper saddle River: Prentice Hall.
- Lopes, S.C.; Lameira, O.A.; Fortes, G.R.L.; Nogueira, R.C.; Pinto, J.E.B.P. 2001. In vitro rooting of mahogany (*Swietenia macrophylla* King). *Revista Cerne*, 7(1): 124 – 128 (in Portuguese, with abstract in English).
- Maia, J.G.S.; Andrade, E.H.A.; Couto, H.A.R.; Marx, F.; Henke, C. 2007. Plant sources of Amazon rosewood oil. *Química Nova*, 30(8): 1906 -1910.
- May, P.H.; Barata, L.E.S. 2004. Rosewood exploration in the Brazilian Amazon: Optins for sustainable production. *Economic Botany*, 58(2): 257 – 265.
- Oliveira, F.F.M.; Silva, K.M.B.; Oliveira, G.F.; Dantas, I.M.; Camacho, R.G.V. 2007. Micropropagation of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. from nodal segments and apical. *Revista Caatinga*, 20 (3): 152 – 159 (in Portuguese, with abstract in English).
- Pasqual, M. 2001. *Culture Media*. Universidade Federal de Lavras / FAEPE. Lavras – Minas Gerais. 99 pp (in Portuguese).
- Rosa, L.S.; Ohashi, S.T.; Silva, A.S. 1999. Effect of sowing depth on seed germination of rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke). *Revista Ciências Agrárias*, 31: 29 – 36 (in Portuguese, with abstract in English).
- Prakash, S.; Staden, J.V. 2008. Micropropagation of *Searsia dentata* in vitro Cellular and Developmental Biology – *Plant*. 44(4): 338–341.
- Santos, B.R.; Paiva, R.; Nogueira, R.C.; Stein, V.C.; Alvarenga, A.A.; Deuner, S. 2005. Getting shoots pequisheiro the use of NAA and BAP. *Revista Associação Brasileira de Horticultura*. 23(2): 623-624 (in Portuguese, with abstract in English).
- Santos, C.G.; Paiva, R.; Paiva, P.D.O.; Paiva, E. 2003. Induction and biochemical analysis of callus obtained from leaf segments of *Coffea arabica* L., Cultivar Rubi. Ver. *Ciência Agrotécnica*. 27(3): 571 – 577 (in Portuguese, with abstract in English).
- São José, A. R.; Demattê, E.S.P.; Martins, A.B.G. 2005. Effect of different concentration of 6-benziloaminopurina and naphthaleneacetic acid on growth of lateral buds of gipsófila (*Gypsophila paniculata* L. cv Golan). *Revista Associação Brasileira de Horticultura*. 23(2): 612-613 (in Portuguese, with abstract in English).
- Souza, A.S.; Junghans, T.G. 2006. *Introduction to plant micropropagation*. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical – Cruz das Almas – 152 pp (in Portuguese).
- Spironello, W.R.; Barbosa, A. P.; Leite, A.M.C.; Quisen, R.; Sampaio, P.T.B. 2001. Reproductive ecology, management and conservation of rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke). Anais do V Congresso de Ecologia do Brasil. Porto Alegre-RS. p. 289. (in Portuguese).

Recebido em 05/01/2009

Aceito em 16/12/2009

