

**CALOGÊNESE E RIZOGÊNESE EM EXPLANTES DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)  
CULTIVADOS *IN VITRO*****CALLOGENESIS AND RHIZOGENESIS IN MAHOGANY (*Swietenia macrophylla* King) EXPLANTS  
CULTURED *in vitro***Silvana Cruz da Rocha<sup>1</sup> Marguerite Quoirin<sup>2</sup>**RESUMO**

A exploração de árvores tropicais realizada de forma indiscriminada, buscando espécies de alto valor econômico, tem levado várias espécies, como o mogno (*Swietenia macrophylla* King), ao perigo de extinção. O desenvolvimento de uma metodologia de regeneração de gemas, direta ou indireta, poderia auxiliar na obtenção de um grande número de mudas e constituir uma perspectiva à propagação sexuada. Essa última é limitada pelo fato das sementes perderem rapidamente a capacidade germinativa. No presente trabalho, foram utilizados dois tipos de explantes: fragmentos foliares e de raízes de plantas cultivadas *in vitro*. Após desinfestação, os explantes foram colocados em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) contendo três quartos da concentração de sais, vitaminas do mesmo meio, 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose, auxina (ácido naftalenoacético, ANA, 0,11 µM e 0,54 µM), citocinina (cinetina, CIN, 1,2 µM, 2,3 µM, 4,7 µM e 9,3 µM; 6-benziladenina, BA, 2,2 µM, 4,4 µM e 8,8 µM ou 2-isopenteniladenina, 2-iP, 2,5 µM) e 7g.L<sup>-1</sup> de ágar. As variáveis testadas foram a concentração e o tipo de regulador de crescimento e a origem dos explantes. A cada 30 dias, os explantes foram avaliados pela contagem do número de explantes formando calos ou raízes e a consistência dos calos. Foram obtidos calos a com base nos dois tipos de explantes. Nos explantes foliares, 90% deles formaram calos em meios de cultura contendo BA 4,4 µM com ANA 0,54 µM e BA 8,9 µM com ANA 0,11 ou 0,54 µM. Nos explantes de raízes, a maior percentagem de explantes com calos foi de 55%, no meio de cultura com BA 2,2 µM e ANA 0,54 µM. Raízes adventícias foram obtidas partindo de calos e do limbo dos explantes foliares, em meios de cultura com CIN e ANA. Não foi observada a formação de gemas adventícias.

**Palavras-chave:** cultura *in vitro*; espécie tropical; Meliaceae; organogênese.

**ABSTRACT**

The indiscriminate exploitation of tropical trees in a search for economically valuable species leads to the risk of extinction of several species. This is the case of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in Brazil. The establishment of a method of direct or indirect bud regeneration could help to produce a great number of plantlets and could constitute an alternative to sexual propagation. The latter is limited by the fact that mahogany seeds lose their germinative power soon after harvest. In this work, two kinds of explants were used: leaf and root fragments from *in vitro* cultured plants. After disinfection, the explants were cultured in petri dishes containing modified Murashige and Skoog (1962) culture medium, with three-quarters of salt concentration, vitamins, 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose and 7 g.L<sup>-1</sup> agar. The combinations of growth substances were: naphthaleneacetic acid (ANA 0.11 µM and 0.54 µM) and one type of cytokinin, kinetin (CIN 1.2 µM, 2.3 µM, 4.7 µM and 9.3 µM), 6-benzylaminopurine (BA 2.2 µM, 4.4 µM and 8.8 µM) or 2-isopentenyladenine (2-iP 2.5 µM). The variables were the concentration and combinations of the growth regulators and the explant origin. The cultures were evaluated every 30 days, the number of explants forming calluses or roots was recorded and the callus consistency was observed. Calluses were formed in both kinds of explants. In leaf explants, 90% of explants formed callus when culture medium contained 4.4 µM BA with 0.54 µM ANA and 8.9 µM BA with 0.11 or 0.54 µM ANA. For root explants, the combination that gave the highest number of calluses was 2.2 µM BA and 0.54 µM ANA and 55% of them formed callus. Adventitious roots were regenerated from leaf calluses or directly from leaf lamina cultured in media containing CIN and ANA.

1. Bióloga, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19053, CEP 81531-990, Curitiba (PR). belugasil@bol.com.br

2. Engenheira Agrônoma, Professora adjunta, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19053, CEP 81531-990, Curitiba (PR). mquoirin@ufpr.br

However, adventitious buds were not obtained with the growth regulator combinations tested in these experiments.

**Key words:** *in vitro* tissue culture; Meliaceae; organogenesis; tropical species.

## INTRODUÇÃO

Na floresta Amazônica, a extração de madeira é a principal atividade comercial. Como a exploração é realizada de forma indiscriminada, buscando espécies de alto valor econômico, alterações drásticas dos ecossistemas dessa formação florestal têm ocorrido, colocando em perigo de extinção várias espécies como, por exemplo, o mogno.

O mogno (*Swietenia macrophylla* King), espécie pertencente à família Meliaceae, possui folhas compostas e uma altura variando entre 25 e 30 m. Está presente não só na Amazônia, mas também em outras regiões do Brasil, sendo particularmente freqüente na região sul do Pará (Lorenzi, 1996).

A regeneração natural do mogno é baixa. Em levantamentos realizados em área de corte, foi encontrado 0,25 árvores/ha de DAP (diâmetro na altura do peito) igual ou superior a 30 cm, sendo que, nessas áreas, as mudas são raras (Veríssimo *et al.*, 1995).

Técnicas de cultivo *in vitro* podem ser usadas para permitir uma multiplicação rápida, quando comparadas com as demais técnicas de propagação assexuada. Com a utilização da micropropagação, existe a possibilidade de facilitar a multiplicação do mogno e, conseqüentemente, aumentar o número de plantas. Dessa maneira, a espécie nativa poderá ser preservada no ecossistema no qual está inserida, interagindo com outras espécies, pois a exploração será reduzida. Ainda, mediante essas técnicas, genótipos novos poderão ser produzidos por regeneração de plantas após inserção de genes de interesse nas células da planta. Uma possível aplicação desse método seria a obtenção de plantas resistentes a insetos, como *Hypsipyla grandella*, cujo ataque causa grandes estragos em plantios comerciais de mogno, pois se não causar a morte da árvore, pode provocar bifurcações do ramo principal, impossibilitando seu uso madeireiro (Yamazaki *et al.*, 1992).

A calogênese é um processo importante para a obtenção indireta de plantas. Os calos podem conter células ou grupos de células que possuem centros ativos de divisão celular. Em condições adequadas, esses centros são induzidos e se capacitam para produção de órgãos; em alguns casos nos quais já são capazes, os centros são apenas estimulados. As células que são capazes de responder a determinados estímulos são denominadas competentes; nelas podem ocorrer a diferenciação celular e a formação de brotos ou raízes (George, 1996). A competência é o primeiro passo para a diferenciação celular; o segundo é a indução da determinação em células competentes. As células são determinadas quando se submetem a um caminho particular de desenvolvimento geneticamente programado e continuam sem a influência de reguladores de crescimento (George, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi estudar o processo de organogênese em explantes de folhas e raízes de mogno cultivados na presença de várias combinações de reguladores de crescimento, em especial a obtenção de gemas adventícias. Esse protocolo, uma vez obtido, poderá ser utilizado para o desenvolvimento de novos genótipos por transformação genética, ou para a micropropagação da espécie.

## REVISÃO DA LITERATURA

Na exploração do mogno, quando da retirada de árvores adultas, muitos dos indivíduos jovens são destruídos bem como os de outras espécies, já que estes ocorrem normalmente em grupos. Máquinas pesadas são utilizadas para a retirada das árvores derrubadas, ocasionando também, freqüentemente, a compactação do solo o que impede a germinação das sementes. A derrubada seletiva de um número pequeno de espécies, seguida de corte e queima da vegetação ao redor do mogno, podem destruir propágulos, brotações e bancos naturais de sementes, prejudicando futuras regenerações.

A madeira do mogno é a mais valiosa da Amazônia (Veríssimo *et al.*, 1995) e a primeira em volume explorado, com 899.105,52 toneladas exportadas no período de 1980-1992 (Brasil, 1992). Sua exploração excessiva pode ter efeitos drásticos que vão desde a redução da população natural e, conseqüentemente, da sua variabilidade genética, até a extinção da espécie, que pode iniciar uma cadeia de reações levando à extinção

até de grupos inteiros de espécies, em razão da interdependência entre elas (Frankel e Soulé, 1981).

Essa exploração intensiva da espécie se deve às características e utilidades da madeira, empregada na fabricação de móveis de luxo e em acabamentos internos em construção civil para confecção de rodapés, molduras, assoalhos e venezianas. A madeira possui a vantagem de ter alta resistência ao ataque de cupins de madeira seca (Lorenzi, 1996). No momento, sua extração está proibida pelo Decreto de Lei n. 4.593, de 13 de Fevereiro de 2003.

No que se refere ao cultivo *in vitro* do mogno, pouco se sabe a respeito da metodologia para regeneração de plantas com base em explantes foliares e raízes. Albarrán e seus colaboradores (1997) cultivaram segmentos foliares de mogno em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) (MS) contendo a metade de sua concentração de sais, obtendo a maior resposta em termos de formação de calos na presença de Tídiázuron (TDZ) (0,9  $\mu\text{M}$ ) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (22,6  $\mu\text{M}$ ).

Além do mogno, outras espécies da família Meliaceae tiveram seus tecidos cultivados *in vitro*, como folhas e raízes no caso de *Naregamia alata*, *Azadirachta excelsa* e *Azadirachta indica* ("neem"), servindo de base para a obtenção de calos e, em alguns casos, de brotos (Shaji *et al.*, 1997; Salvi *et al.*, 2001; Giagnacovo *et al.*, 2001).

A regeneração com base nos explantes pode ser direta, quando a diferenciação em gemas se dá diretamente sem a passagem pela fase de calo, ou indireta, quando se forma primeiro um calo (grupo de células com crescimento desordenado, formando um tecido indiferenciado com baixa determinação e elevada competência para formação de raízes e gemas adventícias) o qual, posteriormente, se diferencia em gemas (Torres *et al.*, 2000).

Graças à totipotência, ou capacidade das células vegetais formarem órgãos ou uma planta inteira (Torres *et al.*, 2000), protocolos para obtenção de plantas com base em tecidos vegetais têm sido obtidos. Porém, o que difere no comportamento de células vegetais com a mesma composição genética é a competência das células-alvo (Torres *et al.*, 2000). Estas possuem a capacidade para responder a estímulos específicos como, por exemplo, hormonal (Taiz e Zeiger, 2004).

Os reguladores de crescimento são fundamentais para o estabelecimento da competência e a determinação (canalização para vias particulares do desenvolvimento), condições necessárias para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (Taiz e Zeiger, 2004).

Nos tecidos vegetais utilizados como explantes, a desdiferenciação celular pode resultar na formação de calos com células ou grupos de células competentes. Quando estas são transferidas para meios indutores, tornam-se determinadas, ou seja, comprometidas a uma rota específica de desenvolvimento (Torres *et al.*, 2000).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de mogno foram obtidas de Brasnorte, Mato Grosso. Após a eliminação do seu tegumento, foram desinfestadas em Benomyl a 0,05% (m/v) por um período de 10 minutos em agitação, seguido de hipoclorito de sódio 2% (v/v) com 0,1% de Tween 20, por 10 minutos em agitação. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar *in vitro* em frascos contendo meio de cultura sólido, composto pelos sais minerais do meio MS, com a metade de sua concentração, acrescido de 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 1  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar.

Folhas e raízes de plantas de 60 a 220 dias (Tabela 1) foram cortadas em fragmentos de 36  $\text{mm}^2$  e de 6 mm de comprimento respectivamente. As bordas das folhas foram eliminadas e as nervuras mantidas. O meio básico de cultura foi o MS com três quartos da concentração de sais e concentração de vitaminas-padrão para esse meio, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 7  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar (Agar "Granulated", Becton Dickinson). O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da adição do ágar. Os meios foram autoclavados a 120°C por um período de 20 minutos. Em seguida, 20 ml de meio de cultura foram colocados em cada placa de petri.

A inoculação dos explantes foliares, nas placas de petri contendo meio de cultura, deixou a superfície abaxial dos explantes em contato direto com os meios. As culturas foram acondicionadas em câmara de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , densidade de fluxo de fótons de 40  $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16

horas para os explantes na presença de luz (Tabela 1).

TABELA 1: Idade das matrizes, meios de cultura iniciais e tratamentos luminosos aplicados nas culturas de explantes de mogno.

TABLE 1: Age of mother plant, initial culture media and light treatment applied to mahogany explants cultured *in vitro*.

Tipo de Explantes	Meios de Cultura (0 a 13, 16 e 17)*	Idade das Plantas Matrizes	Iluminação
Folhas	0 a 6	60 dias	Ausência
		150 dias	Ausência
		210 dias	Ausência
	7 a 13, 16 e 17	90 dias	Ausência
		99 dias	Ausência
		120 dias	Ausência
Raízes	0 a 6	150 dias	Presença
		220 dias	Ausência e Presença
	7 a 13, 16 e 17	107 dias	Ausência
		110 dias	Ausência
		120 dias	Ausência

\* Vide Tabela 2.

Em todos os experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As variáveis consideradas nos testes foram a concentração e o tipo de regulador de crescimento, a origem dos explantes e a presença ou ausência de luz. A unidade experimental era composta de dez fragmentos de folhas ou dez fragmentos de raízes, sendo realizadas quatro repetições por tratamento. Os tratamentos utilizaram várias combinações de citocinina [cinetina (CIN) ou 6-benzilaminopurina (BA)] e de auxina [ácido naftalenoacético (ANA)], com exceção do experimento complementar que foi realizado utilizando apenas as concentrações de 2,2 e 4,4  $\mu\text{M}$  de BA e 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA (meios 16 e 17) (Tabela 2). Os fitoreguladores foram adicionados ao meio básico de cultura. Em seguida, os explantes foram subcultivados em meios contendo combinações de BA, 2-isopenteniladenina (2-iP) ou CIN e ANA (meios 14 e 15).

TABELA 2: Concentrações (em  $\mu\text{M}$ ) dos reguladores de crescimento, cinetina (CIN), benziladenina (BA) e ácido naftalenoacético (ANA), utilizados na cultura de explantes de mogno.

TABLE 2: Concentrations (in  $\mu\text{M}$ ) of growth regulators, kinetin (CIN), benzylaminopurine (BA) and naphthalenacetic acid (ANA), used for mahogany explants culture.

Meios de Cultura	CIN	ANA	Meios de Cultura	BA	ANA
0	0	0	7	0	0
1	2,3	0,11	8	2,2	0,11
2	2,3	0,54	9	2,2	0,54
3	4,7	0,11	10	4,4	0,11
4	4,7	0,54	11	4,4	0,54
5	9,3	0,11	12	8,8	0,11
6	9,3	0,54	13	8,8	0,54
			16	2,2	0,5
			17	4,4	0,5

Os calos obtidos foram avaliados com estereomicroscópio considerando os seguintes critérios: número de calos por explante (os calos estavam espaçados permitindo a contagem), número de explantes que produziram calos e a consistência desses (friáveis ou compactos) (Figura 1). A taxa de calogênese foi calculada dividindo-se o número total de calos (N3) pelo número de explantes com calos (N1). Já a percentagem de explantes com calos foi obtida dividindo-se o número de explantes com calos (N1) pelo número total de explantes (N2). Para análise dos dados foi aplicado o teste não-paramétrico do  $\chi$ -quadrado.

### Explantes foliares

Os explantes sofreram desinfestação em etanol (96%) por 20 segundos, seguido de hipoclorito de sódio a 6% por quinze minutos e enxaguados em água estéril adicionada de  $1\text{g.L}^{-1}$  de polivinilpirrolidona (PVP) três vezes, para evitar a oxidação dos tecidos. Em todos os experimentos, utilizaram-se oito placas de petri com meio de cultura e cinco fragmentos em cada. As placas foram mantidas no escuro na câmara de crescimento. Os explantes foram colocados nos meios com CIN e ANA ou com BA e ANA cujas concentrações estão indicadas na Tabela 2. Foram realizados três experimentos com as mesmas combinações de reguladores, sendo a idade das plantas-matrizes diferente em cada experimento (Tabela 1).

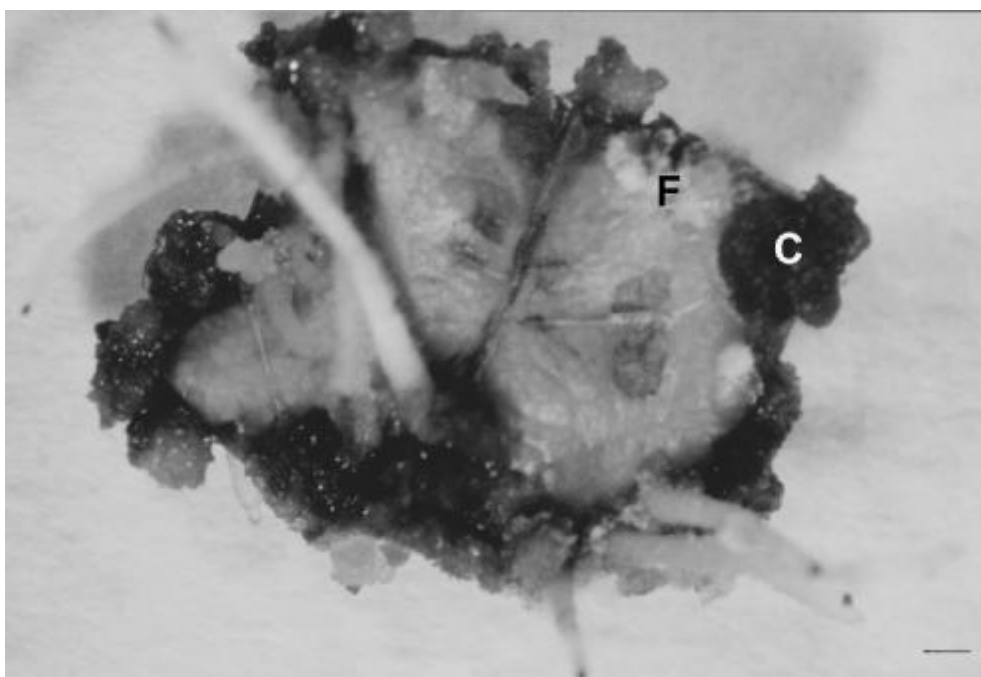


FIGURA 1: Formação de raízes e calogênese com base em explantes foliares de mogno cultivado *in vitro*: calos compactos pardos (C) e calos friáveis brancos (F), no meio de cultura com Cinetrina e Ácido naftaleno acético (Barra: 0,06 cm).

FIGURE 1: Root formation and calogenesis in leaf explants of mahogany plants grown *in vitro*: compact brown callus (C) and friable white callus (F) in medium culture with Cimetrina and Ácido naftaleno acético (Bar: 0.06 cm).

Nos três experimentos realizados com BA e ANA (meios 7 a 13, 16 e 17), os explantes foliares foram submetidos à desinfestação conforme descrito anteriormente, exceto para o tratamento com hipoclorito de sódio que foi de 0,6% por um período de oito minutos. Após 60 dias, as culturas foram avaliadas e os explantes com calos transferidos a novos meios de cultura. Os explantes retirados de plantas com 60 dias foram cultivados num meio contendo  $0,88\ \mu\text{M}$  de CIN e  $5,4\ \mu\text{M}$  de ANA. Os explantes retirados de plantas com 90 dias foram transferidos para um meio contendo  $0,88\ \mu\text{M}$  de CIN e  $2,7\ \mu\text{M}$  de ANA. Já os explantes retirados de plantas com 120 dias foram distribuídos em meio de cultura sem e com fitoreguladores ( $0,88\ \mu\text{M}$  de BA,  $2,5\ \mu\text{M}$  de 2-iP e  $1,1\ \mu\text{M}$  de ANA).

### Explantes de raízes secundárias

Os explantes foram desinfestados por 20 segundos em etanol (96%), 9 minutos em hipoclorito de sódio a 2,4% e enxaguados três vezes em água estéril com PVP ( $1\text{g.L}^{-1}$ ). O número de placas foi de quatro por meio, com dez explantes por placa. No primeiro experimento os explantes foram retirados de plantas com 150 dias e colocados em meios com CIN e ANA (meios 0 a 6) (Tabela 1) e mantidos na luz. Já no segundo, com os

mesmos meios, os explantes foram retirados de plantas com 220 dias de idade e distribuídos na presença de luz por 7 dias e posteriormente na sua ausência.

Nos outros três experimentos com BA e ANA, nos meios 7 a 13, os explantes foram retirados de plantas matrizes com 107, 110 e 120 dias respectivamente. Depois de um período de 60 dias, os calos obtidos foram repicados aos mesmos meios utilizados para os explantes foliares. No primeiro experimento, os explantes foram subcultivados no meio contendo 0,88  $\mu\text{M}$  de CIN e 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA. Já no segundo experimento, os explantes foram transferidos para o meio de cultura contendo 0,88  $\mu\text{M}$  de CIN e 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA. No experimento com explantes retirados de plantas com 120 dias, estes foram distribuídos em meio de cultura com as concentrações e os fitorreguladores citados anteriormente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Explantes foliares

#### Efeito das combinações de CIN e ANA

As concentrações de 4,7  $\mu\text{M}$  e 9,3  $\mu\text{M}$  de CIN, combinadas com 0,11 e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA, induziram à formação do maior número de calos. A maior percentagem (70%) de explantes foliares com calos foi observada na presença da combinação de 4,7  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA (Tabela 3). O teste do  $\chi$ -quadrado confirmou que essas combinações de CIN e ANA induzem a calogênese distintamente e que, nas condições citadas, o meio com 4,7  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA apresentou a maior diferença entre o observado e o esperado, devendo ser considerado o melhor para indução de calos (Tabela 3).

No experimento com explantes retirados de plantas com 210 dias, houve pouca calogênese e, somente após 60 dias no meio 2 (2,3  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA), observou-se o desenvolvimento de raízes partindo de calos (Figura 1). Já nos explantes retirados de plantas com 60 dias de idade, após um período de apenas 30 dias, houve o desenvolvimento de raízes nos explantes cultivados nos meios contendo 4,7  $\mu\text{M}$  de CIN com 0,11  $\mu\text{M}$  ou 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA e 9,3  $\mu\text{M}$  de CIN com 0,11  $\mu\text{M}$  ou 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA. O maior número de raízes foi observado em explantes retirados de plantas com 60 dias de idade, nos meios com 4,7  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,11 ou 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA. Essa variação nos resultados deve-se provavelmente à diferença de idade entre as plantas matrizes utilizadas nos experimentos.

TABELA 3: Efeito de combinações de CIN (Cinetrina) e ANA (Ácido naftaleno acético) na formação de calos em explantes foliares de plantas de mogno cultivadas *in vitro*, depois de 30 dias na ausência de luz (% de explantes com calos).

TABLE 3: Effect of combinations of CIN and ANA on callus formation in mahogany leaf explants after 30 days of culture in the dark (% of explants forming callus).

Concentração ( $\mu\text{M}$ )		Percentagem de Explantes com Calos (Idade das Matrizes Doadoras dos Explantes)		
CIN	ANA	60 dias	150 dias	210 dias
0	0	0	0	0
2,3	0,11	10	0	0
2,3	0,54	10	0	25
4,7	0,11	0	19	0
4,7	0,54	70	25	0
9,3	0,11	10	0	6
9,3	0,54	0	25	0

#### Efeito das combinações de BA e ANA

Com esses tratamentos, novamente foi observada uma intensa formação de calos. A percentagem de explantes com calos variou de 75 a 100%, exceto para a primeira combinação, testada com material de planta de 125 dias (55%) (Tabela 4). Quanto à taxa de calogênese, a maior (49%) foi obtida nesse tipo de explantes, cultivados em presença de 2,2 ou 4,4  $\mu\text{M}$  de BA e 0,11  $\mu\text{M}$  de ANA (Tabela 4). De acordo com o resultado

observado e confirmado pelo teste do  $\chi$ -quadrado, os meios induziram a formação de calos com intensidades diferentes.

Nesse segundo experimento, a idade das plantas-matrizes afetou pouco a resposta dos explantes quanto à formação de calos. Além disso, quando se compara esse experimento ao anterior, é possível notar que a porcentagem de explantes formando calos foi maior na presença de combinações de BA e ANA que na presença de combinações de CIN e ANA.

Os explantes transferidos para o meio contendo 1,2  $\mu\text{M}$  de CIN e 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA (meio 14) apresentaram raízes após 30 dias, apesar da presença de CIN no meio de cultura. As raízes tiveram origem de calos ou diretamente do limbo foliar. As maiores taxas de rizogênese, após 30 dias, foram obtidas dos explantes provenientes dos meios contendo 4,4  $\mu\text{M}$  de BA e 0,11  $\mu\text{M}$  ou 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA (Tabela 5). O número de raízes e as taxas de rizogênese aumentaram após 60 dias, em razão do efeito da auxina e da redução do efeito da citocinina.

TABELA 4: Efeito de combinações de BA (benziladenina) e ANA (ácido naftaleno acético) na formação de calos em explantes foliares de plantas de mogno cultivadas *in vitro*, depois de 30 dias na ausência de luz.

TABLE 4: Effect of combinations of benzylaminopurine (BA) and naphthalenacetic acid (ANA) on callus formation in mahogany leaf explants after 30 days of culture in the dark.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )		Porcentagem de Explantes com Calos (Idade das Matrizes dos Explantes)		
BA	ANA	90 dias	100 dias	125 dias
2,2	0,11	100	75	55
2,2	0,54	95	100	95
4,4	0,11	85	100	75
4,4	0,54	90	84	94
8,8	0,11	80	85	90
8,8	0,54	85	95	100

Concentração ( $\mu\text{M}$ )		Taxa de Calogênese (Idade das Matrizes dos Explantes)		
BA	ANA	90 dias	100 dias	125 dias
2,2	0,11	13	5,3	49
2,2	0,54	17	10	31
4,4	0,11	25	8,6	49
4,4	0,54	32	8	30
8,8	0,11	39	16	23
8,8	0,54	33	16	32

Mediante o teste do  $\chi$ -quadrado foi confirmado que os explantes cultivados em meios diferentes antes do meio de subcultura 14 não são iguais para a indução de raízes. Logo, após 30 dias nesse meio de subcultura, os explantes não produziram o mesmo número de raízes em razão do efeito dos meios anteriores. Esse fato também foi observado no meio de subcultura 15 com 1,2  $\mu\text{M}$  de CIN e 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA (Tabela 5). Porém, o número médio de raízes nesse último meio foi menor (1,87) comparado ao número médio obtido no meio 14 que continha uma menor concentração de ANA (3,62). Esses resultados mostraram que a menor concentração de ANA (2,7  $\mu\text{M}$ ) (meio 14) foi responsável pela maior indução de raízes, 188 raízes em 52 explantes de um total de 120 explantes, para a mesma concentração de CIN (1,2  $\mu\text{M}$ ), em comparação com a concentração de 5,4  $\mu\text{M}$  (meio 15), que induziu a formação de 58 raízes em 31 explantes.

Quando os explantes foliares foram transferidos dos meios com BA e ANA para o meio sem fitorreguladores e para o meio adicionado de 0,88  $\mu\text{M}$  de BA, 2,5  $\mu\text{M}$  de 2-iP e 1,1  $\mu\text{M}$  de ANA, não foi observada a formação de raízes, apenas a de calos, provavelmente pela concentração alta de citocinina e baixa

de ANA. De acordo com os resultados, não foram as concentrações de BA e ANA dos meios anteriores que induziram a formação de raízes, pois no meio de subcultivo sem reguladores estas não foram originadas.

Em todos os experimentos com folhas, os calos se originaram das bordas do limbo foliar, das nervuras central e laterais e em diferentes regiões do limbo, porém, em menor número nessa última região da folha. Quanto à consistência e coloração dos calos, houve calos compactos pardos ou incolores e outros friáveis de cor branca (Figura 1).

TABELA 5: Formação de raízes em explantes retirados dos meios de cultura 7 a 13 (com benziladenina e ácido naftaleno acético) e subcultivados nos meios 14 (CIN 1,2  $\mu\text{M}$  e ANA 2,7  $\mu\text{M}$ ) e 15 (CIN 1,2  $\mu\text{M}$  e ANA 5,4  $\mu\text{M}$ ), na ausência de luz.

TABLE 5: Formation of roots in explants cultured in the media 7 to 13 (with benzylaminopurine and naphthalenacetic acid) and subcultured in media 14 (CIN 1.2  $\mu\text{M}$  and ANA 2.7  $\mu\text{M}$ ) and 15 (CIN 1.2  $\mu\text{M}$  and ANA 5.4  $\mu\text{M}$ ) in the dark.

Concentração de Fitorreguladores no Meio Inicial ( $\mu\text{M}$ )		Taxa de Rizogênese (N. de raízes/N. de explantes com raízes)	
BA	ANA	Meio 14	Meio 15
2,2	0,11	2,7 (30/11)	1,0 (3/3)
2,2	0,54	3,1 (43/14)	1,8 (18/10)
4,4	0,11	4,4 (22/5)	1,7 (12/7)
4,4	0,54	4,3 (69/16)	3,4 (17/5)
8,9	0,11	4,0 (24/6)	1,6 (5/3)
8,9	0,54	0	1,0 (3/3)

### Explantes de raízes

#### Efeito das combinações de CIN e ANA

A única resposta dos explantes nas combinações desses reguladores foi uma calogênese reduzida no meio 2 (2,3  $\mu\text{M}$  de CIN e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA), na presença de luz.

#### Efeito das combinações de BA e ANA

A maior percentagem de explantes com calos foi observada no meio 9 (2,2  $\mu\text{M}$  de BA e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA) para os explantes retirados de plantas com 120 dias de idade e as maiores taxas de calogênese no meio contendo 8,9  $\mu\text{M}$  de BA e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA, para os explantes de 110 dias, apesar de ser um meio no qual poucos explantes formaram calos (Tabela 6).

O teste do  $\chi$ -quadrado confirmou o resultado observado de que diferentes combinações de reguladores de crescimento induzem a formação de calos (Figura 2), em intensidades diferentes, e possibilitou a identificação do meio contendo 4,4  $\mu\text{M}$  de BA e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA como sendo o melhor para calogênese de explantes de raízes.

No caso do mogno, experimentos utilizando tecidos foliares não permitiram, ainda, a formação de brotos. Albarrán *et al.* (1997) utilizaram segmentos foliares e obtiveram a maior formação de calos no meio MS com a metade da sua concentração de sais, adicionado de 0,09  $\mu\text{M}$  de TDZ e 22,6  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Outros pesquisadores (Venketeswaran *et al.*, 1988) cultivaram pedaços de folhas e do tecido cotiledonar de mogno no meio MS modificado e suplementado com 9,1  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA, e também observaram a formação de calos.

Em outros trabalhos com espécimes da família Meliaceae, como *Naregamia alata*, foram desenvolvidos brotos diretamente, sem a formação de calos, partindo de explantes foliares em meio MS com 4,9  $\mu\text{M}$  de BA e 5,8  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub> (Shaji *et al.*, 1997). Em explantes foliares e de raízes de *Azadirachta indica* cultivados em meio MS com 8,8  $\mu\text{M}$  de BA e 0,57  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético, brotos se desenvolveram (Salvi *et al.*, 2001). Esses resultados indicam variações entre as espécies dessa mesma família. No presente trabalho, avaliando-se meios com concentrações parecidas de BA (8,8  $\mu\text{M}$ ) e ANA (0,54  $\mu\text{M}$ ) e o mesmo tipo de



explante, a produção de brotos não foi obtida. Já na espécie *Azadirachta excelsa*, os calos se desenvolveram no meio MS adicionado de 19,6  $\mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (AIB) e 4,4  $\mu\text{M}$  de BA e, para indução de brotos, a concentração de BA foi aumentada para 8,9  $\mu\text{M}$  (Giagnacovo *et al.*, 2001).

TABELA 6: Efeito de combinações de benziladenina e ácido naftaleno acético na formação de calos em explantes de raízes de mogno cultivados por 30 dias na ausência de luz.

TABLE 6: Effect of combinations of benzylaminopurine and naphthalenacetic acid on the formation of callus in mahogany root explants after 30 days of culture in the dark.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )		Porcentagem de Explantes com Calos (Idade das Plantas-matrizes)		
BA	ANA	107 dias	110 dias	120 dias
2,2	0,11	0	12,5	10
2,2	0,54	5	10	55
4,4	0,11	2	5	18
4,4	0,54	2	20	28
8,9	0,11	2	10	2
8,9	0,54	0	5	0

Concentração ( $\mu\text{M}$ )		Taxas de Calogênese (Idade das Plantas-matrizes)		
BA	ANA	107 dias	110 dias	120 dias
2,2	0,11	0	1,3	1,8
2,2	0,54	1	1,5	1,5
4,4	0,11	1	1	1,6
4,4	0,54	2	5	1,6
8,9	0,11	1	1,3	1
8,9	0,54	0	13,5	0

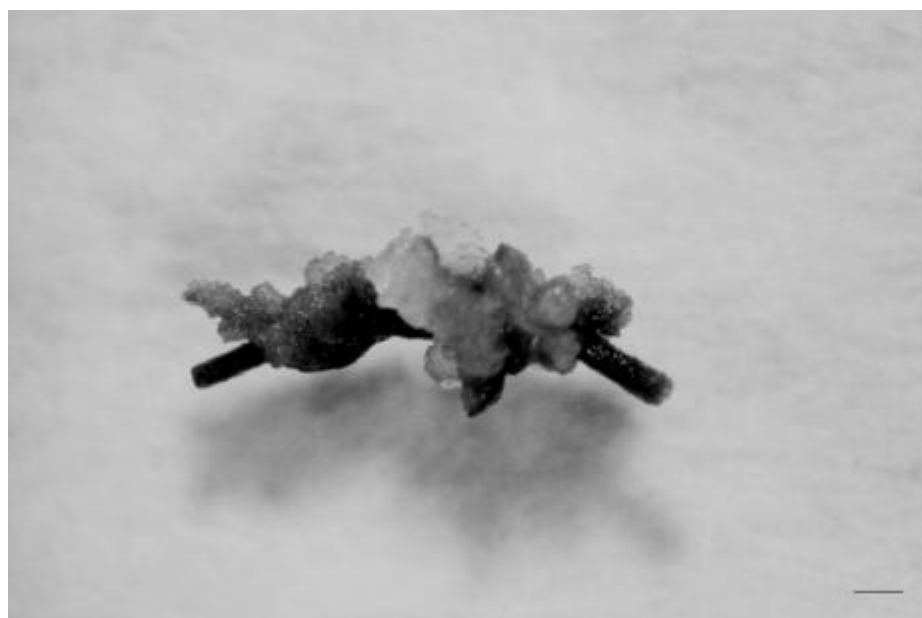


FIGURA 2: Calogênese partindo de raízes de plantas de mogno crescidas *in vitro*, com 110 dias de idade, em meio de cultura contendo benziladenina e ácido naftaleno acético (Barra: 0,08 cm).

FIGURE 2: Calogenesis in root of 120 days old mahogany plants grown *in vitro* on culture medium containing benzylaminopurine and naphthalenacetic acid (Bar: 0.08 cm).

Kumar *et al.* (1991), utilizando apenas BA nas concentrações de 2,2 a 8,8  $\mu\text{M}$ , puderam observar a diferenciação de brotos em *Dalbergia sissoo*. Esses brotos foram obtidos com base em calos de células de origem cambial. Isso indica que as concentrações de BA, que induziram a formação de brotos nessa espécie, não foram capazes de provocar a diferenciação em calos de mogno. Provavelmente, a indução de brotos não foi obtida no caso do mogno por se tratar de outro tipo de explante ou em razão da presença de auxina junto com a citocinina.

Em explantes nodais e foliares de *Eucalyptus dunnii*, cultivados em meio MS com 1/6 da concentração de cálcio e os reguladores BA e ANA em um balanço de 5:1, foram obtidas gemas (Jobin e Termignoni, 1989). No presente trabalho, o balanço mais próximo de 5:1 foi o de 4:1 (meio 9) e foi observada somente a calogênese. A produção de gemas nos explantes foliares de *Eucalyptus dunnii* provavelmente foi em consequência da diminuição da concentração de cálcio e ou ao balanço de 5:1 de BA e ANA.

No caso da macieira (Malavasi e Predieri, 1990), foram obtidos brotos partindo de explantes foliares cultivados em meio de cultura MS com adição de 2,2 ou 4,4  $\mu\text{M}$  de BA e 0,5  $\mu\text{M}$  de AIB, assim como no meio de cultura N6 (Chu *et al.*, 1975) contendo as mesmas concentrações de BA e AIB. No presente trabalho, um experimento complementar foi realizado para testar as concentrações dos reguladores de crescimento (meio 16) em explantes foliares e de raízes de plantas cultivadas *in vitro*. Nesse caso, o resultado foi apenas a formação de calos. Por outro lado, não foram obtidos brotos apesar de terem sido testadas concentrações de BA (2,2 e 4,4  $\mu\text{M}$ ) idênticas às testadas no experimento de Malavasi e Predieri (1990) com explantes foliares de macieira. Tais pesquisadores obtiveram brotos e destacaram a importância das citocininas na calogênese. Em nosso trabalho, a ausência de gemas adventícias pode ser por causa da utilização de ANA em vez de AIB (0,5  $\mu\text{M}$ ), ou ao fato da macieira ser uma espécie muito diferente do mogno cujas células requerem outras combinações de fitorreguladores para se tornarem competentes.

## CONCLUSÕES

A formação de calo é abundante nos explantes de folhas e raízes de mogno cultivados *in vitro*. Nos explantes foliares, os maiores números de calos foram obtidos na presença das combinações de citocinina e auxina a seguir: BA (4,4  $\mu\text{M}$ ) com ANA (0,11  $\mu\text{M}$ ) e BA (8,9  $\mu\text{M}$ ) com ANA (0,11  $\mu\text{M}$  ou 0,54  $\mu\text{M}$ ). Certos calos se diferenciaram em raízes, o maior número sendo obtido nos explantes cultivados em meio de culturas contendo 1,2  $\mu\text{M}$  de CIN combinada com 2,7 ou 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA, com uma média de quatro raízes por explante.

Nos explantes radiculares, houve apenas a formação de calos, em pequeno número, quando a cinetina foi combinada com ANA, enquanto que na presença de 2,2  $\mu\text{M}$  de BA e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA, foi induzido um dos maiores números de calos.

O balanço hormonal propício ao desenvolvimento de gemas adventícias não foi, entretanto, encontrado. Para atingir tal objetivo, outras combinações ou outros tipos de fitorreguladores precisam ser testados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa-Floresta e Embrapa-CPATU pelo fornecimento das sementes de mogno. SCR agradece a UFPR pela bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRÁN, J. G.; VIELMA, M.; CONTRERAS, I. G. Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King.: estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Revista Forestal Venezolana**, v. 41, n. 2, p. 111-118, 1997.
- BRASIL. Decreto-lei 7951 de 23 de janeiro de 1992. Relaciona oficialmente a flora brasileira ameaçada de extinção. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, jan. 1992. Seção 1, p. 870-872.
- CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BIN, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experimentation on nitrogen sources. **Scientia Sinica**, v. 18, p.

659-668, 1975.

FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M. E. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1981. p. 327.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2th ed. England: Exegetics Limited, 1996. 2v.

GIAGNACOVO, G.; PASQUA, G.; MONACELLI, B.; VAN, S. A.; MACCIONI, O.; VITALI, F. Organogenesis and embryogenesis from callus cultures of *Azadirachta excelsa*. **Plant-biosystems**, v.135, n. 1, p.13-18, 2001.

JOBIN, C.; TERMIGNONI, R. **Propagação vegetativa em *Eucalyptus dunnii***: micropropagação e organogênese. Porto Alegre, 1989. IV Semana do Instituto de Biociências.

KUMAR, A.; TANDON, P.; SHARMA, A. Morphogenetic responses of cultured cells of cambial origin of a mature tree *Dalbergia sissoo* Roxb. **Plant Cell Report**, v. 9, p. 703-706, 1991.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa. SP: Ed. Plantarum, 1996. v.1.

MALAVASI, F. F. F.; PREDIERI, S. Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. **Acta Horticulturae**, v. 280, p. 61-65, 1990.

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

SALVI, D. N.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S.; EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 65, n. 2, p.159-162, 2001.

SHAJI, J.; SONIYA, E. V.; VALSALA, K.; NAIR, G. M. In vitro adventitious shoot formation from mature leaves and leaf derived calli of *Naregamia alata* W & A. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 11, p.1249-1251, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

VENKETESWARAN, S.; DIAS, M.; SULTANBAWA, F.; WEYERS, U. V. Tissue culture studies on mahogany tree, *Swietenia*. London: Kluwer Academic Publishers. **Somatic Cell Genetics of Woody Plants**, p. 147- 153, 1988.

VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; TARIFA, R.; UHL, C. Extraction of a high-value natural resource in Amazonia: the case of mahogany. **Forest Ecology and Management**, Amsterdã, v. 72, n. 1, p. 39-60, 1995.

YAMAZAKI, S.; IKEDA, T.; TAKETANI, A.; PACHECO, C. V.; SATO, T. Attack by the mahogany shoot borer *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), on the meliaceous trees in the Peruvian Amazon. **Applied Entomology Zoology**, v. 27, p. 31-38, 1992.