

## **Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul-Occidental**

FERMINO JUNIOR, Paulo Cesar Poeta<sup>\*</sup>; RAPOSO, Andrea<sup>\*\*</sup>; NAGAO, Eduardo Ossamu<sup>\*\*\*</sup>; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson<sup>\*\*\*\*</sup>

### Resumo

A cultura de tecidos representa uma das formas mais viáveis de multiplicação de matrizes selecionadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas de diferentes tipos de citocininas e composições de meio de cultura na multiplicação *in vitro* de microbrotos, bem como a eficiência do sistema dupla-fase de cultivo na micropropagação de *Tectona grandis* L.f. estabelecidos na Amazônia Sul-Occidental. Segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro* foram utilizados como fontes de explantes. Foram avaliados, no sistema de cultivo semissólido, o efeito dos meios de cultura MS e WPM, e diferentes concentrações de BAP, CIN e TDZ (2,2; 4,4; 8,8; 17,7 µM). Para o sistema dupla-fase, os segmentos nodais foram cultivados por 30 dias em meio de cultura semissólido MS, com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar-ágar e suplementados com 2,2; 4,4; 8,8 µM de BAP e 0,53 µM de ANA. Após 30 dias em cultivo sólido, os mesmos tratamentos receberam a adição de 10 mL de meio de cultura líquido MS. Em sistema de cultura em meio semissólido, o meio de cultura WPM é mais eficiente na multiplicação *in vitro* de brotos de *T. grandis* L. O uso de BAP ou TDZ é mais eficiente

<sup>\*</sup> Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas; Professor Adjunto da Universidade Federal do Acre; Biólogo; Campus Universitário, BR-364, Km 04, Distrito Industrial, 69920-900, Rio Branco, AC; paulofermino@ufac.br

<sup>\*\*</sup> Doutora em Agronomia pela Universidade de São Paulo; Pesquisadora da Embrapa do Acre; Bióloga; andrea.raposo@embrapa.br

<sup>\*\*\*</sup> Doutor em Agronomia pela Universidade Federal do Ceará; Professor Associado da Universidade Federal do Amazonas; Biólogo; eonagao@ufam.edu.br

<sup>\*\*\*\*</sup> Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas; Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia de Brasília, DF; Engenheiro Agrônomo; jonny.pereira@embrapa.br

na multiplicação *in vitro* do que as citocininas CIN. O uso do sistema de cultivo dupla-fase apresenta eficiência semelhante ao sistema convencional (meio semissólido).

Palavras-chave: *Tectona grandis*. Reguladores de crescimento vegetal. Multiplicação *in vitro*. Sistema de cultivo dupla-fase.

***Effect of different cytokinins and double-phase system culture in micropropagation of Teak (Tectona grandis L.f.) established in Southwestern Amazonia***

*Abstract*

*Tissue culture is one of the most viable ways of selected plants multiplication. The objective of this study was to evaluate the physiological responses of different cytokinin types and compositions of culture environment in vitro multiplication of microshoots, and assess the efficiency of the cultivation double-phase system in micropropagation of Tectona grandis L. established in Southwestern Amazon. Nodal segments of in vitro germinated seedlings were used as sources of explants. The effect of culture media WPM and MS were evaluated in the semi-solid system cultivation and different concentrations of BAP, TDZ and KIN (2,2; 4,4; 8,8; 17,7  $\mu\text{M}$ ). For the double phase system, nodal segments were cultured for 30 days in the semi-solid MS with 30  $\text{g L}^{-1}$  sucrose, 6  $\text{g L}^{-1}$  agar and supplemented with 2,2; 4,4; 8,8  $\mu\text{M}$  BAP and 0,53  $\mu\text{M}$  NAA. After a 30-day cultivation on semi-solid environment, the same treatments received an addition of mL of MS liquid culture environment. In culture system in semi-solid environment, the WPM is more efficient in vitro multiplication of shoots T. grandis L.f. The use of BAP or TDZ is more efficient in vitro multiplication of the cytokinin KIN. Double-phase system is similar in efficiency compared to conventional system (semi-solid environment).*

*Keywords: Tectona grandis. Plant growth regulators. In vitro multiplication. Double-phase culture system.*

## 1 INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica é o maior reservatório de diversidade vegetal do planeta (PEREIRA; PINTO SOBRINHO; COSTA NETO, 2011). Entretanto, o tipo de ocupação que atualmente se desenvolve na Amazônia não indica um futuro promissor em termos de conservação da biodiversidade. O reflorestamento com espécies exóticas de alto valor econômico e bem estabelecidas com o clima, como a Teca (*Tectona grandis* L.) possibilita a extração de madeiras para a comercialização dentro de uma proposta de manejo.

Na região Norte do Brasil, os plantios com Teca (*T. grandis*) tiveram início em 1994, com a finalidade de cumprir a reposição florestal, obrigatória, em atendimento à legislação ambiental vigente (FIGUEIREDO; OLIVEIRA; BARBOSA, 2005). Teca é uma espécie arbórea com ocorrência natural no subcontinente índico e no sudeste asiático, especialmente na Índia, Burma, Tailândia, Laos, Camboja, Vietnã e Java. Produz uma das madeiras mais belas e melhores que existem, com excelente qualidade em todos os aspectos, podendo ser utilizada para as mais diversas finalidades (QUIALA et al., 2012).

A propagação de espécies florestais, normalmente, ocorre por sementes, com exceção de algumas espécies que podem ser multiplicadas por estaquia de material juvenil. O cultivo de Teca por estaquia e por sementes é amplamente difundido nos trópicos do mundo inteiro (YASODHA; SUMATHI; GURUMURTHI, 2004). Entretanto, a produção de mudas a partir de sementes é pouco eficiente (KOZGAR; SHAHZAD, 2012), pois a quantidade de sementes produzidas por árvore é reduzida e as taxas de germinação são baixas, podendo apresentar índices de apenas 25% em certos genótipos comerciais (MONTEUUIS; MAITRE, 2007).

A cultura de tecidos representa uma das formas mais viáveis de multiplicação de matrizes selecionadas de espécies florestais (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). A fase de proliferação *in vitro* tem como objetivo obter o maior número de plantas em menor tempo possível (XAVIER; OTONI; PENCHER, 2007). Para isso, faz-se necessário uma metodologia eficiente, que produza partes aéreas homogêneas e de boa qualidade (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os estudos de divulgação científica de micropropagação de Teca no Brasil ainda são incipientes (FERMINO JÚNIOR; NAGAO; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009). Alguns protocolos com meio de cultura semissólido já foram desenvolvidos para a micropropagação de Teca (GUPTA et al., 1980; KHATRI; KUKDIA; SINGH, 2001; TIWARI; TIWARI; SIRIL, 2002; SHIRIN; RANA; MANDAL, 2005; GYVES; ROYANI; RUGINI, 2007; AKRAM; AFTAB, 2008; FERMINO JÚNIOR; NAGAO; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009; KOZGAR; SHAHZAD, 2012). Estudos específicos de etapas da micropropagação de Teca foram elaborados sobre o enraizamento *in vitro* com o uso de AIB (NOR AINI et al., 2009), o enraizamento *ex vitro* e aclimatização (FERMINO JÚNIOR; RAPOSO; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011). Recentemente, o uso de sistema de imersão temporária em *T. grandis* foi utilizado com eficiência (QUIALA et al., 2012).

De acordo com George et al. (2008), 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. O sistema de cultivo *in vitro* dupla-fase (meio semissólido e líquido juntos) aparece como alternativa, apesar de poucos trabalhos fazerem uso desse sistema em espécies arbóreas. Alguns estudos com espécies arbóreas ou arbustivas, como com pereira japonesa “Hosui” (KADOTA; IMIZU; HIRANO, 2001), com porta-enxerto de pereira (MORAES et al., 2004) e com porta-enxerto de macieira (MACHADO; CARVALHO; BIASI, 2004) demonstraram maiores taxas de multiplicação *in vitro* em meio-dupla fase do que em meio semissólido. O uso do sistema de cultura dupla-fase também foi mais eficiente na micropropagação de abacaxizeiro (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012). O efeito de diferentes citocininas a partir de indivíduos de Teca estabelecidos na Amazônia Sul-Occidental e as respostas fisiológicas no sistema de cultivo dupla-fase ainda não foram estudados.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas de diferentes tipos de citocininas e composições de meio de cultura na multiplicação *in vitro* de microbrotos, bem como avaliar a eficiência do sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de *T. grandis* L.f.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas sementes de plantas matrizes (20 plantas) de Teca (*T. grandis* L.) na área experimental da Embrapa/Acre, localizada no Km 12 da BR 364, no Município de Rio Branco, AC, desinfetadas e germinadas *in vitro* conforme metodologia descrita por Fermino Júnior, Nagao e Scherwinski-Pereira (2009).

Para avaliar o efeito da composição de diferentes meios de cultura na multiplicação de brotos, foram utilizados segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro* com 2 cm de comprimento. Os segmentos nodais foram seccionados e inoculados em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 30 mL dos sais do meio de cultura *Wood Plant Medium* (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1981) ou MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementados com 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,0; 2,2; 4,4; 8,8; 17,7  $\mu\text{M}$  combinados com 0,53  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenoacético (ANA), com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar-ágar. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 *versus* 5 (tipos de meio *versus* concentrações de regulador).

Para avaliar o efeito de diferentes citocininas na multiplicação de brotos foram utilizados segmentos nodais (2 cm) excisados de plântulas germinadas *in vitro* e inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) com a adição de 6-benzilaminopurina (BAP), ou 6-furfurilaminopurina (CIN), ou thidiazuron (TDZ), nas concentrações de 0,0; 2,2; 4,4; 8,8; 17,7  $\mu\text{M}$  combinados com 0,53  $\mu\text{M}$  de ANA, e suplementados com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar-ágar. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 *versus* 5 (tipos de citocininas *versus* concentrações).

Os experimentos de multiplicação de brotos em sistema dupla-fase (líquido-geleificado) foram realizados com segmentos nodais (2 cm) a partir de plantas já estabelecidas *in vitro*. Inicialmente, segmentos nodais foram cultivados por 30 dias em meio de cultura semissólido com formulação salina de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar-ágar e suplementado com 0,0; 2,2; 4,4; 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,53  $\mu\text{M}$  de ANA. Após 30 dias em cultivo semissólido, os mesmos tratamentos receberam a adição de 10 mL de meio de cultura líquido MS com as concentrações de reguladores, isento de ágar-ágar. O tratamento/controle foi organizado com o uso de meio de cultura MS em meio semissólido, com 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar e suplementado com 0,0; 2,2; 4,4; 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,53  $\mu\text{M}$  de ANA.

Os brotos multiplicados em todos os experimentos foram transferidos para meio de enraizamento *in vitro* após 60 dias. O meio de enraizamento utilizado foi o WPM/2 (50% da concentração salina), suplementado com 15  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose, 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar-ágar, 1,5  $\text{g.L}^{-1}$  de carvão ativado e 0,49  $\mu\text{M}$  de AIB. Após o enraizamento, as plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente e plantadas em câmaras plásticas contendo vermiculita e solução de meio MS durante 30 dias. Em seguida, as plantas foram transplantadas para sacos plásticos com solo do tipo argissolo amarelo e mantidas em casa de vegetação da Embrapa/Acre.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de  $23 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 horas de luz, densidade de fótons de  $38 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e umidade de 70%. Para cada experimento foram utilizadas seis repetições por tratamento, em que cada unidade experimental foi constituída por um frasco contendo cinco segmentos nodais. Para o número de brotos e de nós/broto, os dados foram transformados em  $(x+0,5)^{0,5}$ . As médias foram submetidas à Análise de Variância (Anova), com a separação de médias pelo teste de Scott-Knott com  $p < 0,05$  (SOKAL; ROHLF, 1995), utilizando-se o programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2003).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os maiores números de brotos regenerados foram observados nos explantes cultivados em meio WPM (Tabela 1). A utilização de concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) superiores a  $8,8 \mu\text{M}$  no meio de cultura WPM induziu a formação de calos na base dos explantes, apesar do maior número de brotações e taxas de multiplicação.

Tabela 1 – Multiplicação *in vitro* de brotos de *Tectona grandis* L. sob efeito de 6-Benzilaminopurina (BAP) em diferentes meios de cultura (WPM e MS). CR= Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ ) +  $0,53 \mu\text{M}$  de ANA. Rio Branco, AC

CR	Número de brotos		Número de nós/ broto		Taxa de multiplicação		Comprimento da parte aérea	
	WPM	MS	WPM	MS	WPM	MS	WPM	MS
0	1,3 dA	1,4 aA	2,3 bA	2,2 bA	2,9 eA	3,1 bA	2,8 aA	2,7 aA
2,2	1,6 cA	1,7 bA	2,4 bB	3,9 aA	3,8 dB	6,6 aA	2,4 bB	3,0 aA
4,4	1,7 cA	1,1 cB	2,4 bA	2,6 bA	4,1 cA	2,9 bB	2,2 bA	1,5 cB
8,8	2,5 bA	1,0 cB	2,2 bA	2,7 bA	5,5 bA	2,7 bB	1,8 cA	1,8 cA
17,7	3,6 aA	1,1 cB	2,2 bA	2,5 bA	7,9 aA	2,7 bB	0,9 dA	1,1 dA
Média	2,16	1,28	2,31	2,78	4,84	3,60	2,01	2,03
CV %	20,8		13,2		16,6		19,3	

Fonte: os autores.

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

Em relação ao número de nós/broto, o cultivo em meio MS com o uso de  $2,2 \mu\text{M}$  de BAP promoveu os maiores valores. A utilização de diferentes concentrações de BAP em meio de cultura WPM não alterou o número de nós/broto regenerados. As maiores taxas de multiplicação ocorreram nos sistemas com o uso de meio WPM. No meio de cultura WPM, à medida que se aumentou a concentração de BAP aumentou a taxa de multiplicação, apesar da calogênese indesejável na base dos explantes com concentrações acima de  $8,8 \mu\text{M}$ . Entretanto, nos cultivos em meio MS, a taxa de multiplicação mais elevada ocorreu com o uso de  $2,2 \mu\text{M}$  de BAP, e nas demais concentrações os valores foram inferiores e iguais estatisticamente. Para os comprimentos da parte aérea dos brotos regenerados,

tanto em meio de cultura WPM quanto em MS, os maiores comprimentos foram observados nas menores concentrações de BAP, e os menores comprimentos nas maiores concentrações.

De acordo com Almeida et al. (2012), a composição do meio de cultura e os fatores ambientais (GEORGE et al., 2008) podem resultar na intensificação das respostas morfogênicas, bem como em maior número de explantes responsivos. O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) mostrou-se mais eficiente para a micropropagação de *Ocotea porosa* (PELEGRINI et al., 2011), *Schizolobium parayba* var. *amazonicum* (REIS et al., 2009) e *Eugenia involucrata* DC. (GOLLE et al., 2012). O meio nutritivo WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato, tendo sido amplamente utilizado para a micropropagação de espécies lenhosas (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Considerando o conjunto de parâmetros investigados neste estudo com *T. grandis*, o meio de cultura WPM é mais eficiente para a utilização em protocolos de micropropagação dessa espécie. Resultados semelhantes com espécies arbóreas foram observados no cultivo *in vitro* de *Luehea divaricata* em que o meio de cultura WPM favorece o maior número de brotações (FLÔRES et al., 2011), e em *Helianthemum marminorense* (SERRANO-MARTÍNEZ; CANO-CASTILHO; CASAS, 2012). Os estudos com louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell.) também evidenciaram maior número de brotações com o uso do meio WPM em comparação ao meio MS (MANTOVANI et al., 1999), bem como os melhores resultados para o meio WPM foram verificados nos estudos de micropropagação de *Prunus* sp. (RADMANN; GONÇALVES; FORTES, 2003). Entretanto, resultados registrando o mesmo número de brotos regenerados em ambos os meios de cultura (MS e WPM) na multiplicação de brotos foram observados por Mao et al. (2000) na propagação *in vitro* de *Litsea cubeba*, por Dzazio, Biasi e Zanette (2002) na micropropagação de videira (*Vitis* sp.), e por Ribeiro et al. (2002) na multiplicação de cafeeiro (*Coffea arabica* L.).

Tabela 2 – Multiplicação *in vitro* de brotos de *Tectona grandis* L. sob efeito de diferentes concentrações das citocininas BAP, CIN e TDZ. Rio Branco, AC

Número de brotos regenerados/explante				
Concentração de citocinina ( $\mu\text{M}$ ) + 0,53 $\mu\text{M}$ de ANA	BAP	CIN	TDZ	
0	1,33 dA	1,33 cA	1,33 cA	
2,2	1,63 cA	1,42 cB	1,67 bA	
4,4	1,75 cA	1,38 cB	1,79 bA	
8,8	2,46 bA	2,04 bB	2,71 aA	
17,7	3,63 aA	2,42 aB	2,38 aB	
Média	2,16	1,81	2,13	
CV (%)			25,5	
Número de nós/broto regenerado				
	BAP	CIN	TDZ	
0	2,29 aA	2,29 aA	2,29 aA	
2,2	2,42 aA	2,42 aA	2,29 aA	
4,4	2,42 aA	2,46 aA	2,25 aA	
8,8	2,25 aA	2,30 aA	2,33 aA	
17,7	2,21 aA	1,50 bB	2,17 aA	
Média	2,31	2,17	2,26	
CV			23,5	
Taxa de multiplicação				
	BAP	CIN	TDZ	
0	3,0 dA	3,0 bA	3,0 cA	
2,2	3,9 cA	3,4 bB	3,8 bA	
4,4	4,2 cA	3,4 bB	4,0 bA	
8,8	5,5 bA	4,7 aB	6,3 aA	
17,7	8,0 aA	3,6 aC	5,1 aB	
Média	4,92	3,02	3,84	
CV (%)			23,8	
Comprimento da parte aérea (cm)				
	BAP	CIN	TDZ	
0	2,79 aA	2,79 aA	2,79 aA	
2,2	2,40 bA	1,52 bC	1,85 bB	
4,4	2,21 bA	1,46 bC	1,94 bB	
8,8	1,77 cA	1,08 cA	1,77 bA	
17,7	0,88 dA	1,04 cA	1,40 cA	
Média	2,01	1,27	1,74	
CV			26,9	

Fonte: os autores.

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

Os maiores números de brotos regenerados, em BAP, CIN e TDZ foram a partir do uso de 8,8  $\mu\text{M}$  (Tabela 2). O maior número de brotos e a maior taxa de multiplicação foram observados com o uso de 17,7  $\mu\text{M}$  de BAP, apesar da intensa calogênese na base dos explantes. De modo geral, o uso da citocinina BAP apresentou os melhores resultados em relação aos parâmetros investigados

(número de brotos, número de nós/broto, taxa de multiplicação, comprimento da parte aérea dos brotos regenerados).

O número de nós/broto regenerado apresentou os mesmos valores com o uso das citocininas BAP, CIN e TDZ, exceto com o uso de 17,7  $\mu\text{M}$  de CIN. Entretanto, em relação ao comprimento da parte aérea dos brotos regenerados, os maiores valores foram registrados para o uso do meio de cultura com BAP e os menores valores com o uso de CIN. Em todas as citocininas utilizadas, quanto maior a concentração do regulador (BAP, CIN, TDZ), menor o comprimento da parte aérea dos brotos regenerados. Considerando o conjunto de parâmetros investigados (número de brotos, número de nós/broto, taxa de multiplicação, comprimento da parte aérea dos brotos regenerados) e as citocininas testadas, os resultados mais eficientes são aqueles com uso de BAP e TDZ. Entretanto, considerando cada citocinina isoladamente, o uso de 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP em meio de cultura WPM apresentou a concentração mais adequada para a micropropagação. Com o uso de TDZ, a concentração de 8,8  $\mu\text{M}$  foi a mais adequada, uma vez que apresenta brotos com maior comprimento da parte aérea. Em relação à citocinina CIN, o tratamento mais adequado foi aquele com o uso de 17,7  $\mu\text{M}$ .

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada com a utilização e a avaliação das respostas fisiológicas na presença de vários tipos de citocininas exógenas. Os protocolos mais comuns de micropropagação utilizam o 6-benzilaminopurina (BAP), porém, o uso de cinetina (CIN) e thidiazuron (TDZ) também apresentam eficientes resultados (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). O efeito de BAP na multiplicação de brotos de *T. grandis* tem sido reportado por diversos autores (DEVI; MUKHERJEE; GUPTA, 1994; SHARMA; RANA; MANDAL, 2000; QUIALA et al., 2012). Nos estudos com espécies florestais como sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*), o uso de BAP evidenciou elevadas taxas de multiplicação de brotos (MOURA et al., 2012). A utilização de TDZ aumentou a multiplicação *in vitro* de brotos de *T. grandis* de acordo com Akram e Aftab (2008), e mostrou-se mais eficiente no protocolo proposto por Kozgar e Shahzad (2012), seguido por CIN e BA. Entretanto, nos resultados obtidos neste estudo, com genótipos da Amazônia Sul-Occidental, o uso de TDZ apresentou eficiência semelhante ao BAP.

A variação no número de receptores e sua distribuição, durante o desenvolvimento, podem alterar a sensibilidade das células aos hormônios ou outros sinais (BARENDSE; PEETERS, 1995). Portanto, as diferenças registradas no uso de diferentes citocininas (BAP, CIN, TDZ) na multiplicação *in vitro* de *T. grandis* devem estar relacionadas à sensibilidade das células ao tipo de regulador, existindo mais receptores específicos para BAP e TDZ.

Em relação ao número de brotos, ao número de nós/broto, ao comprimento da parte aérea dos brotos regenerados e às diferentes concentrações de BAP, nos sistemas de cultivo semissólido e dupla-fase, possibilitou a existência de diferenças estatisticamente significativas (Tabela 3).



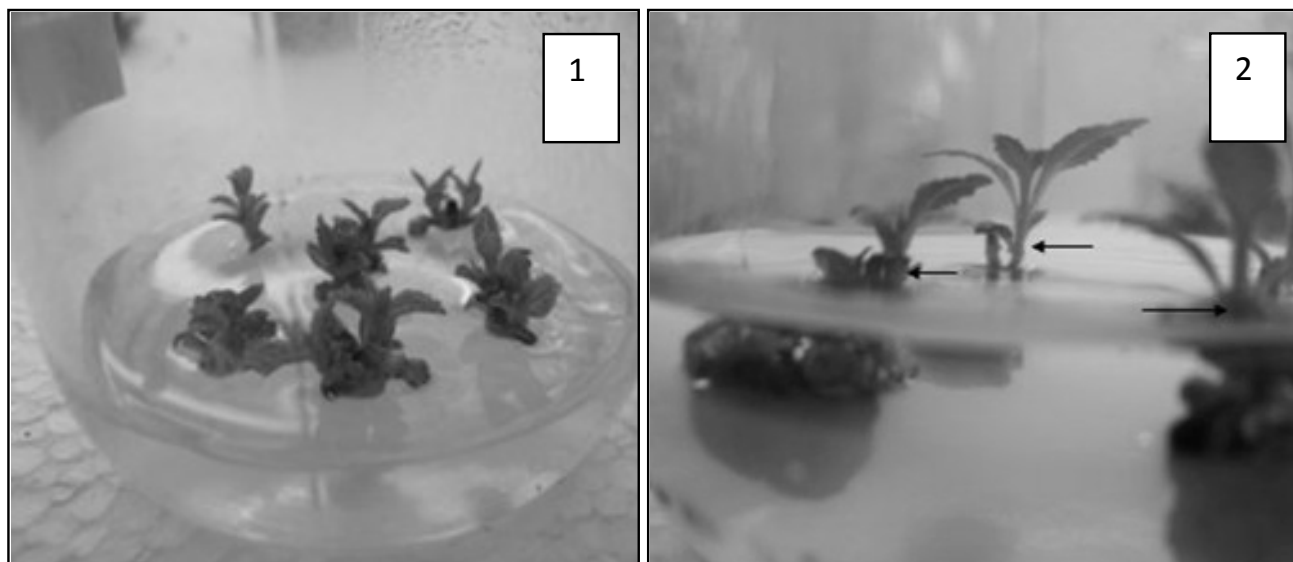
Tabela 3 – Multiplicação *in vitro* de brotos de *T. grandis* L. em sistema de meio semissólido e dupla-fase. CR = Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ ) + 0,53  $\mu\text{M}$  ANA; SS = sistema semissólido; DF = sistema dupla-fase. Rio Branco, AC

CR	Número de brotos		Número de nós/broto		Taxa de multiplicação		Comprimento da parte aérea (cm)	
	SS	DF	SS	DF	SS	DF	SS	DF
0	1,5 bA	1,4 bA	2,2 dA	2,4 cA	3,3 bA	3,3 cA	4,4 aA	4,9 aA
2,2	1,7 aA	1,8 aA	3,6 aA	3,8 aA	6,1 aA	6,8 aA	3,7 bA	3,9 dA
4,4	1,3 cA	1,4 bA	2,5 cA	2,9 bA	3,2 bB	4,0 bA	4,1 aA	4,5 bA
8,8	1,2 cA	1,4 bA	2,7 bA	2,7 bA	3,2 bB	3,7 bA	4,0 bA	4,2 cA
Média	1,42	1,50	2,77	2,95	3,95	4,45	4,07	4,37
CV %		22,5		16,3		18,1		24,7

Fonte: os autores.

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

A análise das taxas de multiplicação, parâmetro que indica maior produção de mudas, revelou que existe semelhança entre os dois sistemas de cultivo avaliados. A concentração com as maiores taxas de multiplicação (6,8 e 6,1) foi observada com o uso de 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP, em ambos os sistemas (Fotografias 1 e 2). Nas concentrações de BAP de 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$  o sistema dupla-fase foi mais eficiente na taxa de multiplicação. O comprimento da parte aérea dos brotos regenerados apresentou o mesmo crescimento no sistema de cultivo semissólido e no sistema dupla-fase, para as respectivas concentrações de BAP.

Fotografias 1-2 – Propagação *in vitro* de *T. grandis* L. a partir de genótipos estabelecidos na Amazônia Sul-Occidental

Fonte: os autores.

Nota: 1. Sistema de cultivo semissólido; 2. Sistema de cultivo dupla-fase.

De acordo com Kozomara et al. (2008), a utilização do sistema dupla-fase de cultivo *in vitro* consiste em uma das estratégias para o aumento das taxas de multiplicação de brotos para espécies lenhosas, entretanto, para *T. grandis* o sistema dupla-fase apresenta a mesma eficiência que o sistema semissólido na máxima taxa de multiplicação (2,2  $\mu$ M) com o uso de 6-benzilaminopurina (BAP). Resultados semelhantes foram descritos por Serrano-Martínez, Cano-Castilho e Casas (2012), uma vez que o uso do sistema dupla-fase promoveu o maior crescimento da parte aérea dos brotos regenerados. Alguns trabalhos destacam o aumento da multiplicação de brotos em sistema dupla-fase para espécies lenhosas arbustivas. Os estudos realizados por Moraes et al. (2004) com porta-enxerto de pereira (*Pyrus calleryana*) em sistema de cultivo dupla-fase demonstraram incremento nas taxas de proliferação de gemas axilares, permitindo aumento na quantidade e na qualidade das brotações *in vitro*. Nesse sentido, as investigações realizadas por Kadota, Imizu e Hirano (2001) em *Pyrus pyrifolia* com o sistema dupla-fase demonstraram, ainda, aumento na fitomassa em relação ao sistema convencional. O uso do sistema dupla-fase também se mostrou mais eficiente na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus prunifolia*), com aumento no número de brotações, no comprimento delas e na massa fresca (MACHADO; CARVALHO; BIASI, 2004). Resultados favoráveis ao aumento da taxa de multiplicação *in vitro* de brotações em sistema dupla-fase também foram relatados por Kozomara et al. (2008) estudando *Chimonantus praecox* L., espécie lenhosa arbustiva. Recentemente, com o propósito de aumentar a taxa de multiplicação, o uso de meio líquido em sistema de imersão temporária foi utilizado com sucesso para as espécies arbóreas *Jacaranda decurrens* (MALOSSO et al., 2012) e *Tectona grandis* L. (QUIALA et al., 2012).

#### 4 CONCLUSÃO

Em sistema de cultura em meio semissólido, o meio de cultura WPM é mais eficiente na multiplicação *in vitro* de brotos de *T. grandis* L. O uso de BAP ou TDZ é mais eficiente na multiplicação *in vitro* do que a citocinina CIN. O uso do sistema de cultivo dupla-fase apresenta eficiência semelhante ao sistema convencional (meio semissólido).

#### REFERÊNCIAS

- 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.
- ALMEIDA, M. et al. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, New York, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.

- 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.
- 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*, Dehli, v. 32, p. 668-671, 1994.
- DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira "420-A". **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.
- FERMINO JÚNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* establishment, germination and multiplication of teak (*Tectona grandis* L.f) from genotypes of South-Western Amazon. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.
- FERMINO JÚNIOR, P. C. P.; RAPOSO, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis* L. **Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 79-86, 2011.
- FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar.exe**: sistema de análise de variância. Lavras, 2003.
- 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.
- FLÔRES, A. V. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht, 2008.
- GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa, v. 1, p.99-169, 1998.
- GUPTA, P. K. et al. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (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.
- KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, Quebec, v. 89, p. 207-215, 2001.
- KHATRI, J. H.; KUKDIA, M. U.; SINGH, R. R. Micropropagation of teak (*Tectona grandis* L.). **Indian Journal of Forestry**, Dehra Dun, v. 24, p. 368-371, 2001.

- KOZGAR, M.; SHAHZAD, A. An improved protocol for micropropagation of teak tree (*Tectona grandis* L.). **Rendiconti Lincei**, Roma, v. 23, n. 2, p. 195-202, 2012.
- KOZOMARA, B. et al. *In vitro* propagation of *Chimonanthus praecox* L., a winter flowering ornamental shrub. **In vitro cellular Development Biology-Plant**, Raleigh, v. 44, p. 142-147, 2008.
- 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.
- MACHADO, M. P.; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira “Marubakaido” em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 69-72, 2004.
- MALOSSO, M. G. et al. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Jacaranda decurrens* Cham. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nairobi, v. 6, n. 7, p. 1147-1154, 2012.
- MANTOVANI, N. C. et al. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.
- MAO, A. A. et al. *In vitro* propagation of *Litsea cubeba* (Lours.) Pers., a multipurpose tree. **Plant Cell Reports**, Brussels, v. 19, p. 263-267, 2000.
- MELO, N. F. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.
- MONTEUUIS, O.; MAITRE, H. F. Advances in teak cloning. **ITTO Tropical Forest update**, v. 17, n. 3, p. 13-15, 2007.
- MORAES, L. K. A. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura “dupla-fase”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 403-405, 2004.
- MOURA, L. C. et al. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 12, p. 1691-1698, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NORAINI, A. S.; GOH, B. L.; RIDZUAN, R. The effects of different indole-3-butyric acid (IBA) concentrations, two light regimes of *in vitro* rooting and acclimatization of *in vitro* teak (*Tectona grandis* L.f) plantlets. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 8, n. 32, p. 6158-6161, 2009.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

- PELEGRINI, L. L. et al. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p. 1527-1523, 2011.
- PEREIRA, L. A.; PINTO SOBRINHO, F. A.; COSTA NETO, S. V. Florística e estrutura de uma mata de terra firme na reserva de desenvolvimento sustentável Rio Iratapuru, Amapá, Amazônia Oriental, Brasil. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 113-122, 2011.
- QUIALA, E. et al. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 1, p. 223-234, 2012.
- RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro no enraizamento in vitro de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 124-126, 2003.
- REIS, I. N. R. S. et al. Cultivo *in vitro* de eixos embrionários de paricá. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 60-66, 2009.
- RIBEIRO, L. S. et al. Multiplicação in vitro de brotações de várias cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 949-954, 2002.
- SERRANO-MARTÍNEZ, F.; CANO-CASTILLO, M.; CASAS, J. L. In vitro propagation of *Helianthemum marminorense*. **Journal of Plant Biochemical and Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 300-304, 2012.
- SHARMA, S. et al. 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.; 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.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. San Francisco: Freeman and Company, 1995.
- 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.
- XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e Enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Bioteecnologia Florestal**. Viçosa: Ed. UFV, 2007.
- 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 06 de março de 2014  
Aceito em 09 de abril de 2014

