

# USO DE DIFERENTES EXPLANTES E CONCENTRAÇÕES DE BENZILAMINOPURINA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE BROTO DE *KIELMEYERA CORIACEA*<sup>1</sup>

JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO<sup>2</sup>, EDUARDO FONSECA ARELLO<sup>3</sup>,  
CÉSAR AUGUSTO BRASIL PEREIRA PINTO<sup>4</sup> e MÁRCIO HENRIQUE PEREIRA BARBOSA<sup>5</sup>

**RESUMO** - Segmentos nodais e apicais de *K. coriacea* foram imersos em meio básico de M.S. (Murashige/Skoog, 1962) com seis diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP). Os segmentos nodais mostraram maior capacidade de produção de brotos (> 1,0 cm) que os apicais, sendo que a melhor percentagem de brotos foi conseguida com 0,5 mg/l BAP. Ambos os segmentos são sensíveis a níveis elevados de BAP, não sendo eficazes para o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

**Termos para indexação:** segmentos nodais, segmentos apicais, cultura de tecidos, micropropagação.

## EFFECT OF DIFFERENT EXPLANTS AND BAP CONCENTRATION ON SHOOT MULTIPLICATION OF *KIELMEYERA CORIACEA*

**ABSTRACT** - Nodal and apical segments were immersed in MS medium with six different concentrations of benzilaminopurine (BAP). The nodal segments presented greater ability for shoot production as compared to the apical segments. The percentage of shoots with 1.0 cm or higher was attained with BAP 0.5 mg/l using nodal segments. Both types of explants were very sensitive to high BAP levels and were damaged during growth and development.

**Index terms:** nodal segments, apical segments, tissue culture, micropropagation.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Kielmeyera* é próprio dos cerrados em Minas Gerais. As plantas são de pequeno porte, e os caules, de pequeno diâmetro. Apresentam grande interesse econômico para produção de madeira, carvão, celulose, e tanino para indústria de couros. Da casca extrai-se a matéria-prima para a fabricação de placas para revestimentos acústicos, térmicos e decorativos (Souza, 1947). *Kielmeyera coriacea* é também considerada como planta medicinal. Segundo Lopes et al. (1977), esta espécie possui propriedades cercaricidas e repelentes.

Com o crescente desmatamento e utilização dos cerrados, a espécie *K. coriacea*, vulgarmente conhecida como "pau-santo", vem sofrendo uma exploração predatória e está extinguindo-se em muitas regiões. Sua propagação é feita por semente, o que resulta em grande desuniformidade genética das plantas. Além disso, as plantas por serem oriundas de semente, apresentam um desenvolvimento lento.

A micropropagação é um método alternativo de propagação assexuada para *K. coriacea* e outras espécies florestais.

Assim, vale destacar alguns estudos feitos por Lee & Rao (1980) sobre a viabilidade de micropropagação de espécies florestais tropicais, bem como os de Shipton & Jackes (1986), Mhatre et al. (1985) e Venketeswaran & Gandhi (1981).

Para a micropropagação em geral, tecidos mais adequados devem ser utilizados como explantes. Dessa forma, explantes oriundos de tecidos jovens e com maior atividade metabólica são mais adequados para estimular a formação de

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 10 de janeiro de 1994

<sup>2</sup> Eng.-Agr., Ph.D., Prof.-Tit., ESAL, Dep. Agric., Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Eng.-Agr., M.Sc., Caixa Postal 170, CEP 13825 Holambra, SP.

<sup>4</sup> Eng.-Agr., Ph.D., Prof.-Adj., ESAL. Bolsista do CNPq.

<sup>5</sup> Eng.-Agr. Bolsista do CNPq.

calos, conferindo a estes maior potencialidade morfogênica, isto é, maior facilidade para emitirem brotações novas, e principalmente radiculas. Neste contexto, os tecidos meristemáticos são os mais indicados e compõem-se de numerosas células não vacuolizadas, de alta atividade metabólica, com pouca diferenciação, e praticamente isentas de poliploidia e aneuploidia, características constantes em tecidos diferenciados. Entretanto, Abbott (1978) afirma que outras partes da planta podem ser usadas como boas fontes de explantes. Citam-se os primórdios foliares, gemas, segmentos caulinares, como: os nódulos, as ápices caulinares, as raízes, as bases de folhas, os hipocótilos; e os órgãos florais, como: estames, anteras, ovários e óvulos, que podem ser escolhidos de acordo com a sua afinidade ou sua capacidade de se comportarem bem *in vitro*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes fontes de explantes e concentrações de benzilaminopurina para a multiplicação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de pau-santo (*Kielmeyera coriacea* Martius Guttiferae) foram lavadas em água corrente por 15 minutos e pré-germinadas no escuro em solução aquosa, com 20 mg de ácido giberélico/100 ml durante doze horas. Em seguida, retirou-se a casca, e uma nova lavagem foi feita, em água corrente, por 15 minutos.

A esterilização das sementes ocorreu em câmara de fluxo laminar, com álcool 70% (30 segundos em imersão) e solução 0,2% de hipoclorito de sódio com duas gotas de Tween-20 em 100 ml de água destilada (20 minutos de imersão); posteriormente, as sementes foram lavadas por cinco vezes em água destilada e autoclavada.

A imersão das sementes foi feita em tubos de ensaio (25 x 150 mm) com 10 ml de meio de cultura por tubo. Empregou-se o meio M.S. - Murashige & Skoog (1962) - com as concentrações de sais reduzidas à metade, e suplementado com 7,0 g/l de ágar, 5 mg/l de ácido giberélico e 30 g/l de sacarose.

Segmentos nodais e apicais foram usados como explantes primários e cultivados em meio M.S. suplementado com 7,0 mg/l de ágar, 30 g/l de sacarose e seis diferentes concentrações de benzilaminopurina (0,0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 e 8,0 mg/l), em todas as combinações possíveis, num esquema fatorial 2 x 6,

com três repetições. Cada parcela foi composta por três tubos de ensaio, com um explante por tubo. Os segmentos foram cultivados durante quarenta e cinco dias.

O pH do meio de cultura foi aferido para 5,8 antes do processo de autoclavagem (120°C - 1 atm - 20 minutos). As culturas foram mantidas em sala de crescimento apropriada, nas seguintes condições: fotoperíodo de 16 horas sob luz branca fria do tipo GRO-LUX (50  $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ), e temperatura de 27  $\pm$  1°C.

Para atender às pressuposições da análise de variância, foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x+0,5}$  os dados referentes às características avaliadas: a) número médio de brotações produzidas e b) percentagem média de brotações com mais de 1 cm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com referência a número médio de brotações e percentagem média de brotações com mais de 1,0 cm, observou-se efeito significativo a 1% de probabilidade quanto ao fator BAP e quanto à interação explante x BAP. Quanto ao fator explante, observou-se efeito significativo a 5% somente para número médio de brotações (Tabela 1). As Fig 1 e 2 possibilitam uma visão global sobre os resultados conseguidos neste teste experimental.

Os segmentos nodais, até 2,0 mg/l de BAP,

**TABELA 1.** Resumo da análise de variância referente ao número médio de brotações e à percentagem média de brotações com mais de 1 cm de *Kielmeyera coriacea* Martius, com o uso de diferentes explantes e concentrações de BAP.

Causas de variação	Gl	Quadrados médios	
		Nº. médio de brotações	Percentagem média de brotações (> 1 cm)
BAP	5	1,7204**	1,8086**
Explante	1	0,0884*	0,0028
BAP x Explante	5	0,4928**	0,1370**
Resíduo	24	0,0119	0,0174
Coeficiente de variação (%)		17,8	16,3

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

apresentaram melhores valores quanto à produção média de brotações. Destacaram-se as concentrações 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l, embora algumas delas tenham concorrido para a morte do explante e para a formação de brotações anormais (Fig. 2). A *K. coriacea* é bastante sensível a níveis mais

elevados de BAP, pois 4,0 e 8,0 mg/l (e até mesmo 2,0 mg/l) não foram eficazes para o crescimento e desenvolvimento dos explantes (Fig. 1 e 2). Estes resultados reforçam a afirmação de Arnold (1989) sobre o efeito adverso do BAP em determinadas situações. O tempo de exposição

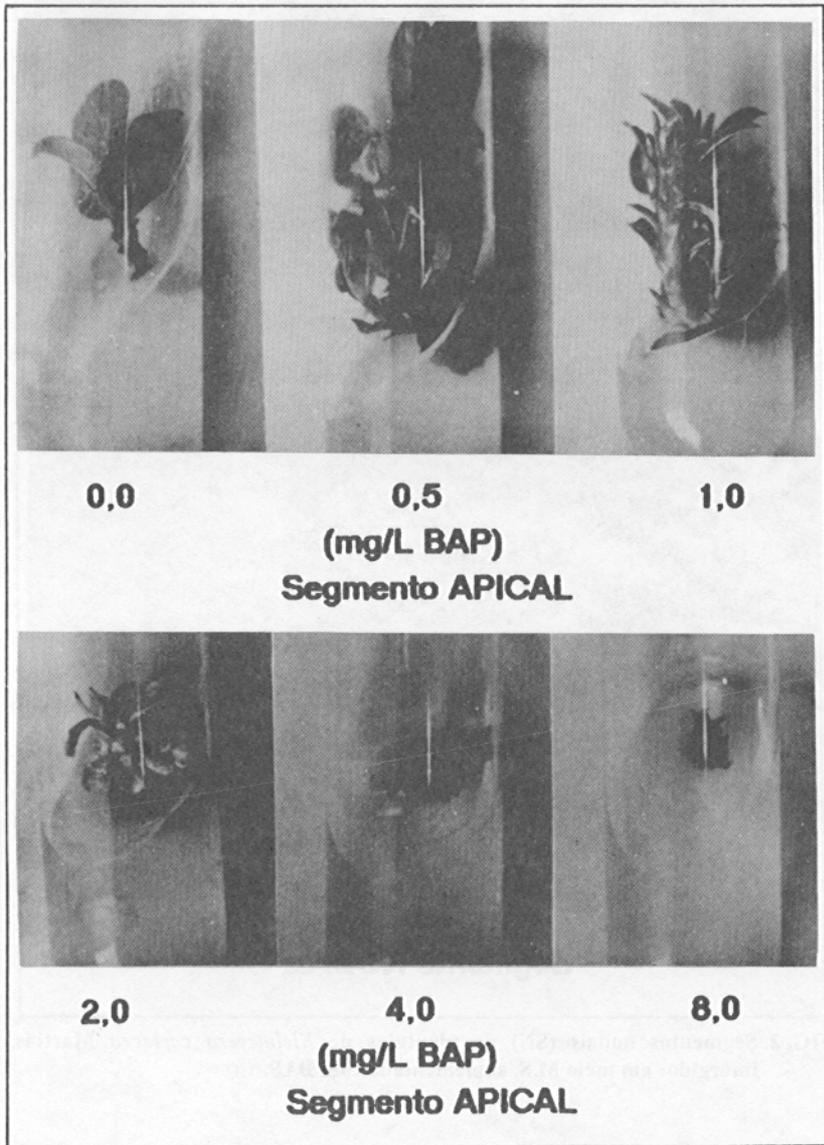


FIG. 1. Segmentos apicais (SA) de plântulas de *Kielmeyera coriacea* Martius, imergidos em meio M.S. suplementado com BAP.

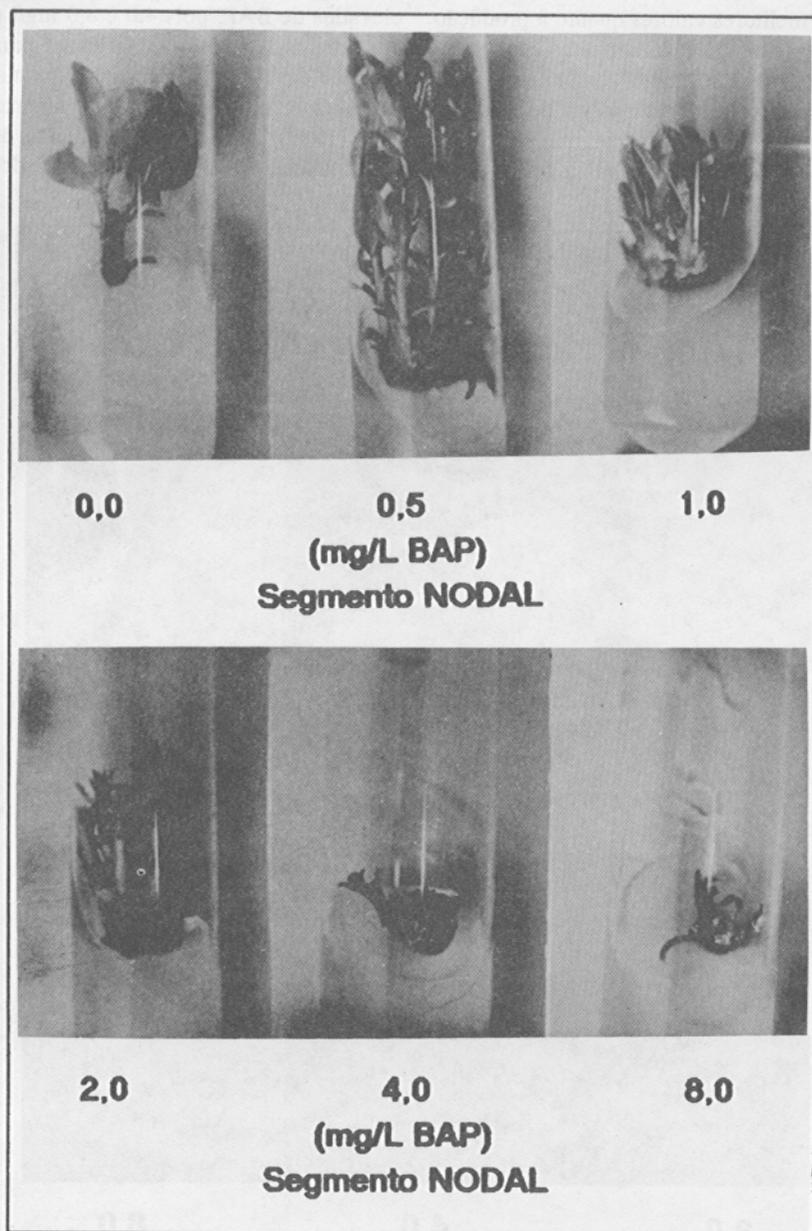


FIG. 2. Segmentos nodais (SN) de plântulas de *Kilmeyera coriacea* Martius, imersos em meio M.S. suplementado com BAP.

dos explantes aos vários níveis de BAP empregados neste experimento foi de 45 dias, e, segundo as hipóteses de Vogelmann et al. (1984) - que su-

gerem uma absorção do regulador de crescimento diretamente proporcional à sua concentração no meio, durante todo o período de cultivo -, pode-se

supor que os segmentos de *K. coriacea* cultivados em níveis mais elevados de BAP absorvessem maiores quantidades deste. Talvez fosse recomendado, como Arnold (1989) e Arnold & Grönroos (1986) sugeriram, que o tempo de exposição do material vegetativo às altas concentrações de BAP fosse reduzido.

Novamente a ausência de BAP no meio de cultura proporcionou pouca ou nenhuma emissão de rebentos (Fig. 1 e 2), e quando esta emissão ocorreu, foi provavelmente devido às citocininas inerentes ao próprio explante. Estes resultados corroboram os relatos de Arellano & Pinto (1993), embora, devido à ausência de ANA (Ácido naftenoacético), as brotações emitidas se tenham mostrado menos desenvolvidas do que no mencionado trabalho, onde o ANA estava presente. A maior proliferação de brotos foi conseguida com o uso de 0,5 mg/l de BAP, isto é, 7,3 rebentos por segmento nodal e 4,3 por segmento apical, em média (Tabela 2). Pode-se notar uma superioridade dos segmentos nodais sobre os segmentos apicais quanto à proliferação de brotos para este nível de citocinina usado (Tabela 1 e Fig. 1 e 2). Uma possível explicação para este acontecimento surge na medida em que os segmentos apicais tendem a se comportar de modo semelhante ao que aconteceria se estivessem em condições naturais, ainda na árvore, obedecendo à dominância da gema apical sobre as outras que, logo abaixo dela, se avizinham lateralmente. Esta dominância do ápice, em ambas as condições, isto é, *in vivo* e *in vitro*, torna difícil, para as gemas laterais, começarem a se desenvolver produzindo novos ra-

mos ou brotos. Em condições *in vitro*, em face de um melhor controle sobre os níveis de citocininas através de seu suprimento exógeno, a quebra da dominância torna-se mais fácil, e a emissão de novos brotos por outras gemas também fica facilitada. Mas esta emissão de novos rebentos em segmentos apicais é nitidamente inferior à emissão originada em segmentos nodais, pois estes últimos não se encontram sob a referida dominância do ápice. A mesma explicação pode ser reforçada através do fato de que sem o emprego de BAP (i.e., nível zero) os segmentos nodais mostraram-se mais aptos à proliferação de novos brotos do que os segmentos apicais (Tabela 1).

Exceto no que se refere aos níveis 4,0 e 8,0 mg/l de BAP, a qualidade das novas brotações foi muito boa, destacando-se as originadas com a ausência ou com 0,5 mg/l de BAP no meio de cultura (Fig. 1 e 2).

Os níveis mais baixos de BAP levaram predominantemente à formação de brotos com altura superior a 1,0 cm, embora algumas concentrações não tenham levado às melhores taxas de multiplicação, como, por exemplo, a ausência de BAP no meio. A Tabela 3 mostra que 93,3% e 91,6% das brotações produzidas por segmentos nodais e apicais, respectivamente, atingiram mais de 1,0 cm e foram conseguidas pela administração de 0,5 mg/l de BAP. Estes resultados foram estatisticamente iguais aos conseguidos na ausência de BAP para cada tipo de segmento. Em segmentos apicais, o uso de 1,0 mg/l de BAP foi benéfico para a formação de brotações com mais de 1,0 cm, resultado superior ao conseguido com o

**TABELA 2.** Número médio de brotações produzidas através da cultura *in vitro* de segmentos nodais e apicais de plântulas de *Kielmeyera coriacea* Martius, em meio M.S. suplementado com BAP.

Explante	BAP (mg/l)						Médias
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	
Nodal	2,0 Ca	7,3 Aa	5,3 Aba	4,3 Ba	1,0 Db	1,2 Da	3,52 a
Apical	1,0 Db	4,3 Ab	3,0 Cb	3,6 Bb	3,4 BCa	1,0 Da	2,72 b
Médias	1,5 D	5,8 A	4,15 B	3,95 B	2,2 C	1,1 D	

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula para níveis de BAP e minúscula, para explante) não diferem, estatisticamente, pelo teste Tukey a 5%.

**TABELA 3.** Percentagem média de brotações com mais de 1,0 cm, produzidas através da cultura *in vitro* de segmentos nodais e apicais de plântulas de *Kielmeyera coriacea* Martius, em meio M.S. suplementado com BAP.

Explante	BAP (mg/l)					
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Nodal	100 Aa	93,3 Aa	12,7 Bb	16,0 Ba	0,0 Ca	0,0 Ca
Apical	100 Aa	91,6 Ab	77,3 Ba	4,5 CDb	0,0 Da	0,0 Da

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula, para níveis de BAP e minúscula, para explante) não diferem estatisticamente, pelo teste Tukey a 5%.

mesmo nível administrado aos segmentos nodais, ou seja, 77,3% dos rebentos contra apenas 12,7%. Quanto à concentração de 2,0 mg/l de BAP, apesar de ter proporcionado uma boa proliferação de brotações em segmentos apicais, estes mostraram brotos com altura muito inferior à apresentada pelos brotos oriundos dos segmentos nodais. Assim, 4,5% das brotações tinham altura superior a 1,0 cm em segmentos apicais, e 16,0% dos brotos mostraram esta característica em segmentos nodais.

### CONCLUSÕES

1. Segmentos nodais mostram maior capacidade de produção de brotos em relação aos apicais.
2. A maior taxa de multiplicação foi conseguida com as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/l de BAP no explante nodal e 0,5 mg/l de BAP no explante apical.
3. Uma melhor percentagem de brotações com mais de 1,0 cm foi obtida com níveis de até 0,5 mg/l de BAP, independentemente do tipo de explante.
4. A *K. coriacea* mostrou ser sensível às altas dosagens de BAP.

### REFERÊNCIAS

ABBOTT, A.J. Practice and promise of micropropagation of woody species. *Acta Horticulturae*, Hague, v.79, p.113-127, 1978.

ARELLO, E.F.; PINTO, J.E.B.P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*: I - Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina

e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.1, p.25-31, 1993.

- ARNOLD, S. von. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. *Newsletter*, Leiden, v.5, p.2-13, 1989.
- ARNOLD, S. von; GRÖNROOS, R. Meristematic zone formation and peroxidase activity during early stages of adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Botanical Gazette*, Chicago, v.147, p.415-431, 1986.
- LEE, S.K.; RAO, A.N. Tissue culture of certain tropical trees. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFERRI, O. *Plant cell cultures: results and perspectives*. New York: Elsevier, Biomedical Press, 1980. p.305-311.
- LOPES, J.L.C.; LOPES, J.N.C.; GILBERT, B.; BONINI, S.E. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, London, v.16, n.7, p.1101, 1977.
- MHATRE, M.; BAPAT, V.A.; RAO, P.S. Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.). *Plant Cell Reports*, Berlin, v.4, n.2, p.78-80, 1985.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- SHIPTON, W.A.; JACKES, B.R. Clonal propagation of *Leptospermum* spp. by tissue culture. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.5, n.5, p.5-8, 1986.
- SOUZA, F.P. *Tecnologia de produtos florestais*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1947. 409p.

- VENKETESWARAN, S.; GANDHI, V. Mass propagation and genetic improvement of forest trees of biomass production by tissue culture. **Biomass**, London, v.2, p.5-15, 1981.
- VOGELMANN, T.C.; BORNMAN, C.H.; NISSEN, P. Uptake of benzyladenine in explants of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. **Physiologia Plantarum**, copenhagen, v.61, p.513-517, 1984.