



NOTA CIENTÍFICA

Santiago Linorio Ferreyra Ramos¹
Maria Teresa Gomes Lopes^{1*}
Paulo de Tarso Barbosa Sampaio²
Edvan Alves Chagas³
Moacir Pasqual⁴
Perla Pimentel da Silva⁵

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM,
Faculdade de Ciências Agrárias, Departamento de
Produção Animal e Vegetal, 69077-000,
Manaus, AM, Brasil

²Instituto Nacional de Pesquisas da
Amazônia – INPA, Departamento de Silvicultura
Tropical, Estação Experimental de Silvicultura
Tropical, 69011-970, Manaus, AM, Brasil

³Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária – EMBRAPA, Embrapa Roraima,
69301-970, Boa Vista, RR, Brasil

⁴Universidade Federal de Lavras – UFLA,
Departamento de Agricultura, 37200-000,
Lavras, MG, Brasil

⁵Centro de Energia Nuclear na Agricultura –CENA,
13416-000, Piracicaba, SP, Brasil

Autor Correspondente:

*E-mail: mtglopes@ufam.edu.br

PALAVRAS-CHAVE

Cultura de tecidos de plantas
Propagação vegetativa
Contaminação
Casca-preciosa

KEYWORDS

Plant tissue culture
Vegetative propagation
Contamination
Precious bark

Tipo de explante e diferentes concentrações de sais em meio de cultura MS no estabelecimento *in vitro* de *Aniba canelilla*

Explant type and different concentrations of salts in MS medium in vitro establishment of Aniba canelilla

RESUMO: A casca-preciosa (*Aniba canelilla*) é uma espécie vegetal, nativa da região amazônica, com potencial econômico, em termos silviculturais, na produção de perfumes e cosméticos. Porém, uma das limitações para a domesticação da espécie é a ausência de métodos de propagação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tipo de explante e de diferentes concentrações de sais do meio de cultura MS no seu estabelecimento *in vitro*. Foram utilizados ápices caulinares (1,5 cm) e segmentos nodais com duas gemas, isolados de mudas de casca-preciosa mantidas em casa de vegetação. Os tratamentos analisados foram constituídos de dois tipos de explantes e seis concentrações de sais no meio de cultura MS, acrescidos de 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose e de desinfestantes. Verificou-se que o segmento nodal foi menos sensível aos tratamentos de desinfestação realizados e proporcionaram maior sucesso na descontaminação, na sobrevivência e no estabelecimento *in vitro* de casca-preciosa.

ABSTRACT: *Aniba canelilla* is a native species from the Amazon region with economic potential in forestry, perfume, and cosmetics production. However, one of the limitations to its domestication is the absence of multiplication methods. In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of explant type and MS culture medium on its establishment *in vitro*. Apical (1.5 cm) and nodal segments with two buds, isolated from seedlings kept in a greenhouse, were used for *in vitro* culture. Treatments consisted of two types of explant and six concentrations of culture medium MS salts, supplemented with combinations of 15 or 30 g L⁻¹ of sucrose and disinfectants. Nodal segments were less sensitive to the disinfection treatments applied and provided the most successful disinfection, survival, and *in vitro* establishment of *Aniba canelilla*.

1 Introdução

A casca-preciosa (*Aniba canelilla* Kunth) da família Lauraceae é uma espécie vegetal, nativa da região amazônica, com potencial econômico, em termos silviculturais, na produção de perfumes e cosméticos pelo alto teor de 2-nitrofeniletano (68,5%), presente no óleo extraído do lenho. A espécie ainda não foi domesticada e sua exploração ocorre nas populações naturais (MITRA, 2010).

A espécie apresenta riscos de erosão genética pelo fato de sua exploração ocorrer de forma extrativista, numa abundância que varia de 0,0123 a 0,5 árvore por hectare; adicionalmente, ocorre uma limitação quanto à dificuldade de propagação sexuada pelo ataque de insetos e roedores, o que dificulta a realização de plantios para a exploração comercial (SAMPAIO, 2000). Chagas et al. (2012) relatam que as altas taxas de destruição dos biomas brasileiros tornam a exploração extrativista de espécies nativas arriscada, tendo em vista o risco da perda de germoplasma.

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica promissora para a preservação de fontes vegetais e a propagação comercial de plantas, obtidas em menor tempo, em grandes quantidades e com propriedades genéticas idênticas às do exemplar original (LOPES et al., 2004). A primeira etapa do cultivo *in vitro* é o estabelecimento, que vai desde a seleção dos explantes até a obtenção de uma cultura livre de contaminantes visíveis e suficientemente adaptada a essas condições (ERIG; SCHUCH, 2005). Porém, as plantas lenhosas apresentam grandes dificuldades para estabelecimento *in vitro* devido às contaminações dos tecidos por micro-organismos, que podem ser minimizadas ou evitadas com a manutenção da matriz doadora de explantes em casa de vegetação, com a aplicação prévia e a ação de fungicidas e bactericidas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para minimizar os problemas de contaminação e viabilizar o processo de estabelecimento *in vitro*, diversas substâncias têm sido testadas, sendo os compostos à base de cloro e etanol os mais utilizados no processo de desinfestação (SILVA et al., 2005), sendo que, em alguns casos, há a adição de antibióticos ao meio de cultura (FERREIRA; SANTOS; BRAGADO, 2009).

Nesse contexto, as técnicas de cultura de tecidos são especialmente úteis para espécies de plantas nativas pelo fato de possibilitar sua utilização por meio da propagação massal de mudas, bem como de representar uma alternativa na conservação da diversidade genética do germoplasma de espécies de diferentes origens (CHAGAS et al., 2012). A cultura de tecidos também está relacionada entre as técnicas indispensáveis para dar suporte aos programas de melhoramento genético de espécies florestais, com os propósitos de acelerar e gerar resultados de alta confiabilidade (GOLLE et al., 2009).

O cultivo *in vitro* de *A. canelilla* permitirá conservar, propagar e reproduzir genótipos superiores, livres de contaminação, além de evitar uma possível erosão genética. Atualmente, não há registro de protocolos de propagação *in vitro* para essa espécie.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tipo de explante e de diferentes concentrações de sais de meio de cultura MS, no estabelecimento *in vitro* de casca-preciosa.

2 Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Manaus-AM. Foram utilizados ápices caulinares (1,5 cm) e segmentos nodais com duas gemas sem folhas, isolados de mudas de casca-preciosa mantidas em casa de vegetação. Antes da retirada dos explantes, iniciou-se o tratamento preventivo das mudas com aplicações de antibiótico ampicilina (1.000 mg L⁻¹), três vezes por semana, durante quatro semanas. Na segunda semana, acrescentou-se às pulverizações o fungicida Benomyl [Metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato], na concentração de 12 g L⁻¹. Ao final do tratamento preventivo e um dia anterior à coleta, algodões saturados com álcool 70% foram friccionados nos ápices caulinares e nos segmentos nodais das mudas, visando a quebrar a tensão superficial ocasionada pela cera natural das folhas e diminuir a contaminação *in vitro* (PASQUAL, 2001). No dia seguinte, os explantes foram retirados e acondicionados em frascos com água destilada. No laboratório, foram lavados por 30 minutos com sabão líquido e água corrente, e imersos em solução de Benomyl (6 g L⁻¹), por 24 h. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram desinfestados com álcool a 70%, acrescido de Tween-20 (1 gota em 100 mL) por 90 segundos e imersos em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 15 min, sendo, por último, lavados três vezes com água destilada e autoclavada.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e os tratamentos foram distribuídos num arranjo fatorial (2 × 6), sendo dois tipos de explantes e seis meios de cultura, com 20 repetições e um explante por parcela. O meio de cultura básico utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e os tratamentos consistiram da combinação de dois tipos de explantes (ápices caulinares e segmentos nodais) e seis concentrações de sais do meio MS: MS1 - 100% da concentração original do MS + 30 g L⁻¹ de sacarose; MS2 - 50% da concentração original do MS + 30 g L⁻¹ de sacarose; MS3 - 100% da concentração original do MS + 15 g L⁻¹ de sacarose; MS4 - 50% da concentração original do MS + 15 g L⁻¹ de sacarose; MS5 - 50% da concentração original do MS + 30 g L⁻¹ de sacarose + 1.000 mg L⁻¹ de ampicilina + 6 g L⁻¹ de Benomyl, e MS6 - 50% da concentração original do MS + 30 g L⁻¹ de sacarose + 0,2 mL L⁻¹ de ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g L⁻¹ de ágar e, posteriormente, os meios foram autoclavados a 121 °C e 1,2 atm, durante 15 min.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 × 150 mm) contendo 10 mL do meio de cultura e, em seguida, mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 50 μmol m⁻² s⁻¹.

Aos 30 dias após a instalação do experimento, foi avaliada a porcentagem de contaminação. Após 90 dias, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência do explante. Os explantes de cor verde foram considerados como vivos e o estabelecimento foi verificado pela presença de organogênese nos explantes cultivados. Os resultados foram expressos em porcentagens.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, e as médias, ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados de porcentagem foram transformados em raiz quadrada de $x + 1$.

3 Resultados e Discussão

Verificou-se, pela análise de variância, que houve interação significativa entre os fatores testados tanto para a contaminação quanto para a sobrevivência de explantes. Para contaminação, as menores porcentagens de ápices caulinares contaminados foram obtidas nos meios MS2 (60%) e MS4 (80%), diferindo estatisticamente dos demais, que apresentaram 100% de contaminação. Resultado semelhante foi observado para segmentos nodais, nos quais foram obtidos 50 e 40% de contaminação, respectivamente, para os meios MS2 e MS4 (Tabela 1); estes diferiram dos tratamentos MS1, MS5 e MS6. Esses resultados provavelmente foram devidos à menor

concentração do meio de cultura, pois apenas utilizou-se 50% da concentração original dos macro e micronutrientes do meio MS nos tratamentos MS2 e MS4. A redução dos sais, bem como de vitaminas e outros componentes do meio de cultura, é uma estratégia adotada nos trabalhos iniciais, visando ao estabelecimento *in vitro*, principalmente pelo maior controle na liberação de compostos antioxidantes. Teixeira (2001) observou que a redução em 50% da concentração original dos macronutrientes NH_4NO_3 e KNO_3 , e de sacarose e ágar do meio MS foi eficiente no estabelecimento e na proliferação de brotações em explantes de pupunha.

A interação dos fatores estudados revelou que a menor porcentagem de contaminação foi verificada no meio MS4, cultivado com segmentos nodais, como pode ser visualizado na Figura 1. O meio MS4, além de ter sido constituído pela concentração de 50% do meio MS, foi combinado com a menor concentração de sacarose (15 g L^{-1}). A sacarose é um dos principais substratos para a proliferação e a manutenção

Tabela 1. Porcentagem de contaminação e sobrevivência de ápices caulinares e segmentos nodais de casca-preciosa cultivados em diferentes concentrações do meio de cultura MS com e sem adição de reguladores, fungicidas e antibióticos.

Tratamentos	Contaminação (%)				Sobrevivência (%)			
	Ápice		Segmento nodal		Ápice		Segmento nodal	
Meio MS 1	100	Ba	100	Ba	0	Ba	0	Ba
Meio MS 2	60	Aa	50	Aa	40	Aa	50	Aa
Meio MS 3	100	Ba	80	ABa	0	Ba	20	ABa
Meio MS 4	80	ABb	40	Aa	20	ABb	60	Aa
Meio MS 5	100	Ba	100	Ba	0	Ba	0	Ba
Meio MS 6	100	Ba	100	Ba	0	Ba	0	Ba
CV (%)	9,22				11,70			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. MS1 = MS 100% de concentração, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose; MS2 = MS 50% de concentração, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose; MS3 = MS 100% concentração; MS4 = meio de cultura MS 50% concentração; MS5 = MS 50% concentração acrescido de 1000 mg L^{-1} de ampicilina mais 6 g L^{-1} de benomyl; MS6 = MS 50% concentração acrescido de $0,2\text{ ml L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina.

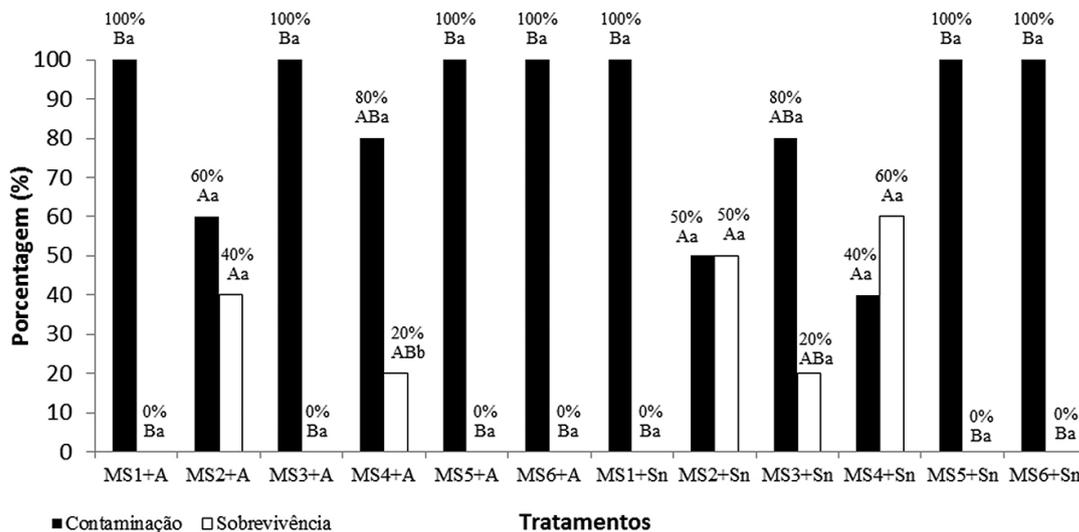


Figura 1. Representação gráfica da porcentagem de contaminação e sobrevivência de ápices caulinares (A) e segmentos nodais (S) de casca-preciosa cultivados em diferentes concentrações do meio de cultura MS com e sem adição de reguladores, fungicidas e antibióticos. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. MS1 = MS 100% de concentração, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose; MS2 = MS 50% de concentração, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose; MS3 = MS 100% concentração; MS4 = meio de cultura MS 50% concentração; MS5 = MS 50% concentração acrescido de 1000 mg L^{-1} de ampicilina mais 6 g L^{-1} de benomyl; MS6 = MS 50% concentração acrescido de $0,2\text{ ml L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina.

de micro-organismos no meio de cultura, especialmente de fungos. Dessa forma, em virtude da maior dificuldade de desinfestar explantes oriundos de espécies nativas da Amazônia, uma das estratégias é utilizar meios mais pobres em macro, micronutrientes e sacarose, para desfavorecer o grande número de micro-organismos beneficiados pelas condições climáticas amazônicas. Essa estratégia tem sido utilizada com sucesso na descontaminação e no estabelecimento *in vitro* de espécies nativas lenhosas (CHAGAS et al., 2012).

Em relação à porcentagem de sobrevivência, verificou-se que os melhores resultados também foram obtidos quando os explantes foram cultivados nos meios MS2 e MS4, com taxas de sobrevivência de 40 e 20%, para ápice caulinar, e 50 e 60%, para segmentos nodais, respectivamente. Segundo Ferrari, Grossi e Wendling (2004), em geral os explantes das espécies florestais apresentam melhor desenvolvimento em meios de cultura com menores níveis de salinidade. Tal constatação também foi evidenciada pelos resultados obtidos no presente trabalho. Chagas et al. (2012) indicam que, durante a fase de multiplicação de brotações *in vitro*, a composição do meio de cultura varia com a espécie utilizada ou mesmo conforme o tipo de tecido ou órgão utilizado como explante.

No presente trabalho, verificou-se, ainda, que houve uma redução de 50% na contaminação e um aumento em 60% da sobrevivência quando os segmentos nodais foram cultivados no meio MS4, quando comparado com a utilização de ápice caulinar cultivado no mesmo meio de cultura.

4 Conclusões

O segmento nodal é menos sensível aos tratamentos de desinfestação; conseqüentemente, proporciona maior sucesso na descontaminação, na sobrevivência e no estabelecimento *in vitro* de casca-preciosa.

O uso meio de cultura MS com redução de 50% da concentração dos sais e sacarose proporciona melhor condição para o estabelecimento *in vitro* de casca-preciosa.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

Referências

CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A. Tissue culture techniques for native Amazonian fruit trees. In: LEVA, A.; RINALDIP, M. R. (Eds.). *Recent advances in plant in vitro culture*. Croatia: InTech Prepress, 2012. p. 151-164.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria*, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Curitiba: Embrapa Centro Nacional de Pesquisas Florestas, 2004. 22 p.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. *Saber Científico*, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2009.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. *Ciência Rural*, v. 39, n. 5, p. 1606-1613, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000500050>

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas*. Brasília: Embrapa Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças, 1998. p. 183-260.

LOPES, K. P.; CARVALHO, J. M. F. C.; ALMEIDA, F. A. C.; ROCHA, M. Regeneração de gemas de algodoneiro (*Gossypium hirsutum* L.) cv. BRS 2001. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras*, v. 8, n. 1, p. 771-778, 2004.

MITRA, S. K. Important Myrtaceae Fruit Crops. *Acta Horticulturae*, v. 849, n. 6, p. 33-38, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

PASQUAL, M. *Introdução: fundamentos básicos*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 97 p.

SAMPAIO, P. T. B. Preciosa Aniba canelilla. In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. (Eds.). *Biodiversidade Amazônica: Exemplos e estratégias de utilização*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2000. p. 298-305.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; BISOGNIN, D. A.; DORNELLES, E. B.; WALTER, J. M. Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 11, n. 3, p. 369-371, 2005.

TEIXEIRA, J. B. *Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas*. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. Disponível em: <<http://www.redbio.org>>. Acesso em: 26 nov. 2011.