

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE GEMAS AXILARES DE ACÁCIA-NEGRA (*Acacia mearnsii* De Wild.)¹

Norton Borges Júnior², Rita de Cássia Sobrosa³, Maisa Pimentel Martins-Coder⁴

RESUMO – A acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) é uma espécie de difícil micropropagação devido à pequena capacidade de multiplicação e desenvolvimento de gemas. O presente estudo visou determinar a influência de diferentes citocininas na proliferação de gemas axilares em segmentos nodais de *A. mearnsii*. Plântulas germinadas *in vitro* forneceram explantes que foram inoculadas em meio básico B5 (GAMBORG et al., 1968). Testaram-se as citocininas: BAP (6-benzilaminopurina), BA (6-benziladenosina), 2iP (γ,γ -isopenteniladenina) e cinetina (6-furfuralamino-purina). Diferentes concentrações desses reguladores de crescimento foram empregadas: 1 mgL⁻¹, 2 mgL⁻¹ e 3 mgL⁻¹. Utilizou-se o delineamento de blocos casualizados, em arranjo fatorial, com seis repetições e cinco plantas por parcela. As avaliações foram feitas aos 30 dias, através da contagem de gemas alongadas e da presença de calos. A utilização de BAP a 2 mgL⁻¹ promoveu a maior taxa de multiplicação de gemas (3,5 brotos/explante).

Palavras-chave: propagação vegetativa, regeneração de plantas, cultura de tecidos.

IN VITRO MULTIPLICATION OF BLACK WATTLE (*Acacia mearnsii* De Wild.) AXILLARY BUDS

ABSTRACT – Black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild.) is difficult to micropropagate due to the low ability of multiplication and development of shoots. Thus, the present study aimed at determining the influence of various cytokinins on axillary bud proliferation in nodal segments of *A. mearnsii*. Explants from *in vitro* germinated seedlings were inoculated on B5 (GAMBORG et al., 1968) basal medium. BAP (6-benzylaminopurine), BA (6-benzyladenine), 2iP (γ,γ -dimethylallylamino-purine) and Kinetin (6-furfurylamino-purine) were tested at the concentrations 1 mgL⁻¹, 2 mgL⁻¹, and 3 mgL⁻¹. A randomized block design, in factorial arrangement with 6 replications, and 5 plants per plot was used. The assessments were made after 30 days, by counting the elongated shoots and the presence of callus. The use of BAP at 2 mgL⁻¹ promoted the highest rate of bud multiplication (3,5 shoots/explant).

Key words: vegetative propagation, plant regeneration, tissue culture.

1. INTRODUÇÃO

A acácia-negra é uma árvore produtora de tanino, plantada em diversos países, com destaque a África do Sul e Brasil (BECK et al., 1998). Pode ser usada para o controle da erosão e melhoramento das propriedades químicas do solo. Sua casca contém até 40%

de tanino, que é usado no curtimento de couro para a fabricação de sapatos, bolsas e outros produtos. Sua madeira é excelente fornecedora de carvão vegetal e pode ser transformada em polpa para fabricação de papel (HUANG et al., 1993).

Devido à sua importância econômica e ecológica

¹ Recebido para publicação em 14.9.2003 e aceito para publicação em 10.8.2004.

² Aracruz Celulose S.A. E-mail: <nbjunior@aracruz.com.br>.

³ FEPAGRO. E-mail: <ritasobrosa@yahoo.com.br>.

⁴ Departamento de Ciências Florestais/Centro de Ciências Rurais. Santa Maria. E-mail: <lbfmais@smail.ufsm.br>.

ca, o melhoramento genético aliado a métodos de propagação vegetativa são urgentemente requeridos, visto que as plantações de *Acacia mearnsii* são oriundas de sementes (DEWAN et al., 1992). Por sua vez, a alta uniformidade no tamanho e qualidade das árvores oriundas de propágulos vegetativos é uma importante vantagem para o manejo e colheita de plantações comerciais (ROCKWOOD e WARRAG, 1994). Dentre as técnicas de clonagem, destaca-se a cultura de tecidos, que apresenta como principais vantagens em relação à macropropagação uma produção de mudas livres de doenças e exige pouco espaço físico e taxa de multiplicação superior à obtida com a estaquia convencional (RIMBAWANTO et al., 1991).

Alguns estudos tiveram resultados razoáveis com a micropropagação da espécie, em que houve pequeno crescimento e baixa proliferação de gemas axilares (ASSIS et al., 1993; HUANG et al., 1993). Segundo Caldas et al. (1990), a composição e concentração hormonais no meio são fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas da cultura de tecidos. Dentre os reguladores de crescimento, as citocininas são substâncias que estão diretamente relacionadas com a divisão celular. Na cultura de ápices caulinares, esses hormônios são utilizados principalmente para a proliferação de gemas axilares, através da capacidade de modificação da dominância apical (BHOJWANI e RAZDAN, 1996).

Devido ao fato de a acácia-negra apresentar reduzida multiplicação de brotos, o objetivo do presente estudo foi determinar a influência de diversas citocininas na multiplicação de gemas axilares em segmentos nodais de *A. mearnsii* no meio B5 (GAMBORG et al., 1968).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria. Plântulas germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Utilizou-se um lote de sementes de 10 matrizes procedentes de Butiá, RS. Foram feitas a quebra de dormência e desinfestação das sementes através da autoclavagem por 20 minutos (MARTINS-CORDER e BORGES, 1999). Em seguida, essas sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio nutritivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com a composição básica diluída em 50%, semi-solidificado com ágar da

marca MERCK 0,6%, sem reguladores de crescimento e com sacarose 2%.

Essas plântulas desenvolveram-se durante 20 dias na temperatura de 25 °C (\pm 3 °C) e fotoperíodo de 16 horas. Após esse período, segmentos nodais medindo 1 cm de comprimento foram inoculados em frascos contendo 20 ml do meio B5 (GAMBORG et al., 1968), substituindo-se o produto Sequestrene 330 Fe (28,0 mgL⁻¹) por FeSO₄.7H₂O (27,8 mgL⁻¹) e Na₂EDTA.2H₂O (37,3 mgL⁻¹), com ágar e sacarose nas mesmas concentrações utilizadas no meio de germinação. Diferentes citocininas foram testadas para a multiplicação de gemas axilares de acácia-negra: BAP (6-benzilaminopurina), BA (6-benziladenosina), 2iP (γ,γ -isopenteniladenina), Cinetina (6-furfuralamino-purina). Diferentes concentrações dos reguladores de crescimento foram empregadas: 1 mgL⁻¹, 2 mgL⁻¹ e 3 mgL⁻¹. O meio básico B5 sem regulador de crescimento serviu como testemunha.

Os meios de cultura, após o ajuste de pH (5,8), foram esterilizados por 20 minutos, através da autoclavagem ajustada a 1,5 atm e 121 °C. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, em arranjo fatorial, com seis repetições e cinco plantas (explantes) por parcela. As avaliações foram feitas aos 30 dias de idade, através da presença de calo e da contagem de gemas alongadas por explante. Os resultados de novas brotações foram transformados em (x)^{1/2} e submetidos à análise de variância. Ajustaram-se equações de regressão de cada citocinina entre as doses aplicadas e as médias de gemas alongadas obtidas. Os ensaios foram instalados de janeiro a março de 2000.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, os resultados evidenciaram que os reguladores de crescimento utilizados promoveram a multiplicação dos explantes de acácia-negra. A análise de variância indicou que houve interação significativa entre as citocininas e as dosagens utilizadas, pelo teste F a 5% de probabilidade, o que comprovou a existência de resposta diferenciada de multiplicação de gemas em relação às dosagens de cada citocinina.

Dentre os reguladores testados, BAP obteve o maior índice de proliferação de gemas, embora não tenha diferido significativamente de BA, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Tabela 1). O BAP é uma das

citocininas de menor custo e têm sido muito eficaz na multiplicação de diversas espécies. A razão disso pode estar na capacidade dos tecidos vegetais em metabolizar os hormônios naturais mais rapidamente do que os sintéticos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O coeficiente de variação experimental (CV) mostrou-se adequado para os padrões de ensaio em ambiente controlado.

A análise de regressão do BAP apresentou resposta quadrática negativa, sendo 2,0 mgL⁻¹ a melhor dosagem, que resultou na taxa de 3,5 gemas axilares por explante (Figura 1). Esse índice coincidiu com aquele obtido por Correia e Graça (1995) na micropropagação da acácia-negra, utilizando-se o meio MS modificado com BA (3 mgL⁻¹) e AIB (0,05 mgL⁻¹). Huang et al. (1993), usando BAP a 2 mgL⁻¹ e AIB a 0,01 mgL⁻¹ no meio MS, obtiveram duas gemas por explante e verificaram, ainda, que essa citocinina foi mais eficiente que a utilização de cinetina, fato igualmente constatado neste experimento.

A regressão da citocinina BA também evidenciou efeito quadrático negativo, com incremento na produção de gemas até a dosagem de 1,7 mgL⁻¹, reduzindo-se a partir de então (Figura 1). Beck et al. (1998) verificaram que a utilização de 2 mgL⁻¹ de BA na suplementação do meio MS foi adequada para a multiplicação de segmentos nodais de acácia-negra. Para Dewan et al. (1992), o emprego de BA a 1,5 mgL⁻¹ foi mais promissor na proliferação de gemas em cotilédones nodais de *Acacia nilotica* subsp. *indica*.

Quadro 1 – Média de gemas axilares por explante de *Acacia mearnsii* De Wild, no meio básico B5, aos 30 dias de idade

Table 1 – Average of *Acacia mearnsii* De Wild axillary shoots per explant, B5 basal medium, 30 days old

Tipos de citocininas	Média de gemas alongadas por explante
BAP	3,1 a ¹
BA	2,5 ab
Cinetina	2,1 b
2iP	2,0 b
Média	2,4
CV (%)	8,8

¹ Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Gamborg et al. (1968).

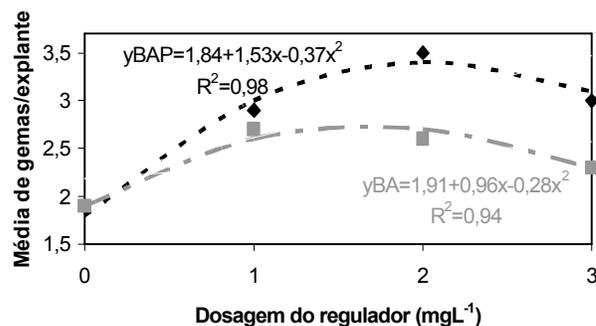


Figura 1 – Estimativa do número médio de gemas axilares por explante de *Acacia mearnsii* De Wild, cultivadas em meio B5, em função das dosagens de BAP e BA.

Figure 1 – Estimate of mean number of *Acacia mearnsii* De Wild, axillary shoots per explant grown in B5 medium, in function of BAP and BA.

A análise de regressão para cinetina apontou resposta quadrática negativa, e a aplicação de 2iP não exerceu efeito significativo sobre a multiplicação de gemas axilares de acácia-negra (Figura 2). Verificaram-se maior alongamento das brotações e formação concomitante de calo e raízes adventícias em alguns propágulos submetidos à multiplicação com esses hormônios. De acordo com Hu e Wang (1983), cinetina e 2iP permitem o desenvolvimento normal dos propágulos sem apresentar brotações múltiplas.

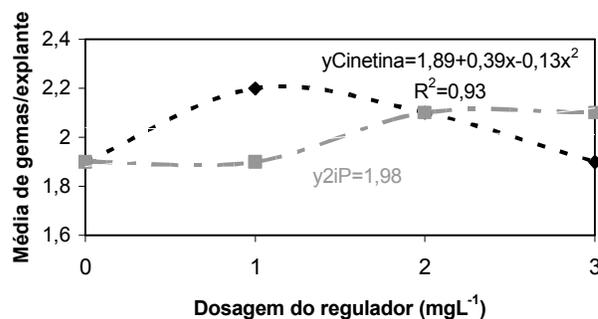


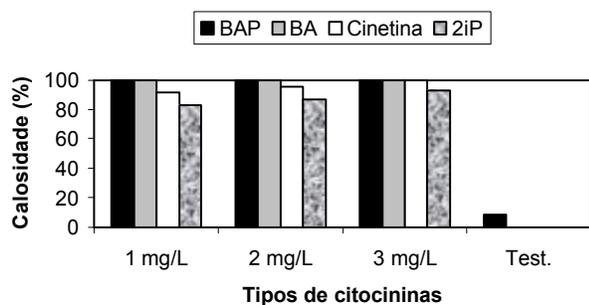
Figura 2 – Estimativa do número médio de gemas axilares por explante de *Acacia mearnsii* De Wild, cultivadas em meio B5, em função das dosagens de cinetina e 2iP.

Figure 2 – Estimate of mean number of *Acacia mearnsii* De Wild, axillary shoots per explant grown in B5 medium, in function of kinetin and 2iP.

Verificou-se que todas as citocininas utilizadas promoveram o desenvolvimento de calo na base do explante (Figura 3). As calosidades tinham maiores dimensões principalmente nos tratamentos com concentrações elevadas de citocinina. Tais resultados estão de acordo com os relatos de Tomar e Gupta (1988), que constataram que calos compactos foram formados em *Albizia* spp. com altas dosagens de BA e cinetina.

Constatou-se, ainda, que houve formação de calo em explantes que não foram submetidos à ação dos hormônios de crescimento. Jones et al. (1990) também verificaram que segmentos nodais produziram calo mesmo sem a presença dos hormônios de crescimento em *Acacia saligna*. A formação de calosidade na base do segmento nodal, devido ao acúmulo de carboidratos, não é desejável nessa fase de multiplicação em que a formação de calo pode comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A maioria dos segmentos nodais da testemunha apresentou raízes adventícias e as folhas, folíolos maiores que as folhas dos demais tratamentos, verificando-se maior alongamento das gemas axilares desses explantes. Dentre as citocininas testadas, BAP foi a que mais destacou a redução do alongamento das gemas com o aumento na concentração do hormônio. Esse fato também foi verificado na cultura de tecidos de *Acacia mimos*a quando a concentração de BAP passou de 0,5 mgL⁻¹ para 1 mgL⁻¹ (RUFFONI et al., 1992).



Fonte: (GAMBORG et al., 1968)

Figura 3 - Porcentagem de explantes de *Acacia mearnsii* De Wild. com formação de calo, no meio básico B5, aos 30 dias de idade.

Figure 3 - Percentage of *Acacia mearnsii* De Wild. explants with callus formation, B5, basal medium, 30 days old.

Cada brotação nova possuía de três a quatro folhas, e aos 30 dias de idade ocorreu necrose apical dessas gemas, em que se deu o amarelecimento das folhas. Isso pode indicar que não houve um balanço ideal na concentração dos nutrientes nas plantas. Conforme Grattapaglia e Machado (1998), uma forma de minimizar esse problema é o subcultivo das plantas, após 15 dias, em um meio de cultura novo, na tentativa de evitar que as brotações percam o vigor.

4. CONCLUSÕES

A cultura de tecidos da acácia-negra, utilizando-se segmentos nodais, pode ser desenvolvida com o uso do meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968), mas torna-se imprescindível a realização de estudos para verificar os níveis adequados de nutrientes para a espécie. A suplementação com BAP e BA mostraram-se mais eficientes na diferenciação de gemas, e o tratamento com BAP a 2 mgL⁻¹ obteve maior proliferação de gemas axilares em explantes juvenis de *Acacia mearnsii*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, T.F. et al. Propagação vegetativa da acácia-negra (*Acacia mearnsii*). In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 7; CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 1., 1993, Curitiba, **Anais...** Curitiba: SBS/SBEF, 1993. p. 150-152.
- BECK, S.L.; DUNLOP, R.; van STADEN, J. Micropropagation of *Acacia mearnsii* from *ex vitro* material. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p.143-148, 1998.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant Tissue Culture: theory and practice**, a revised edition. Usevier, 1996. 767p
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 37-70.
- CORREIA, D.; GRAÇA, M.E.C. *In Vitro* propagation of black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild.). **IPEF**, v. 48/49, p. 117-125, 1995.

DEWAN, A.; NANDA, K.; GUPTA, S.C. *In vitro* micropropagation of *Acacia nilotica* subsp. *indica* Brenan via cotyledonary nodes. **Plant Cell Reports**, v. 12 n.1, p. 18-21, 1992.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1., p. 183-260.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al., (Eds.) **Handbook of plant cell culture**. 1983. p. 177-227.

HUANG, F.H.; AL-KHAYRI, J.M.; GBUR, E.E. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. *In Vitro. Cell Development of Biology*, v. 30, p. 70-74, 1993.

JONES, T.C.; BATCHELOR, C.A.; HARRIS, P.J.C. *In Vitro* Culture and Propagation of *Acacia* Species (*A. Bivenosa*, *A. Holosericea*, *A. Salicina*, *A. Saligna*, and *A. Sclerosperma*). **The International Tree Crops Journal**, v. 6, n. 2/3, p. 183-192, 1990.

MARTINS-CORDER, M.P.; BORGES, N.J.; Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* De Wild. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 2, p 1-7, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-97, 1962.

RIMBAWANTO, A.; SLEE, M.U.; HARTNEY, V.J. Micropropagation of *Acacia mangium*. In: RWG1. **FOREST GENETICS MEETING**, 11., 1991, Coonawarra, Proceedings... Coonawarra, 1991. p. 110-113, 1991.

ROCKWOOD, D. L.; WARRAG, E.I. Field performance of micropropagated, macropropagated, and seed-derived propagules of three *Eucalyptus grandis* ortets. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 628-631, 1994.

RUFFONI, B. et al. Micropropagation of *Acacia* "mimosa". **Acta Horticultural**, n.300, janeiro, p. 95-102, 1992.

TOMAR, U.D.; GUPTA, S.C. *In vitro* plant regeneration of leguminous trees (*Albizia* spp). **Plant Cell Reports**. v. 7, p. 385-388, 1988.