

Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.)

LÉDO, A.S.¹; BLANK, A.F.²; BARBOZA, S.B.S.C.³; RANGEL, M.S.A.⁴; LÉDO, C.A.S.⁵

¹Embrapa Tabuleiros Costeiros, Caixa Postal 44, 49025-040 - Aracaju/SE, *analedo@cpatc.embrapa.br; ²Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão/SE, afblank@ufs.br; ³Emdagro/Embrapa Tabuleiros Costeiros, sarah@cpatc.embrapa.br; ⁴EPEAL/Embrapa Tabuleiros Costeiros, salete@cpatc.embrapa.br; ⁵Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Caixa Postal 007, 44380-000 - Cruz das Almas-BA ledo@cnpmf.embrapa.br

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo estudar o potencial de germinação *in vitro* de nim indiano. Embriões zigóticos maduros foram cultivados em meio MS suplementado com 0,6% de ágar, 0,25% de carvão ativado, 3% de sacarose e com a combinação de diferentes concentrações de ácido naftalenoacético-ANA (1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e de 6-benzilaminopurina-BAP (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) mais uma testemunha (sem reguladores de crescimento), totalizando 13 tratamentos com quatro repetições. Sementes foram cultivadas em dois substratos ágar e vermiculita, na ausência e presença de ½ MS e MS, totalizando seis tratamentos. O aumento das concentrações de ANA e BAP induziu maior porcentagem de plântulas anormais. A combinação de 1,0 mg L⁻¹ de ANA com 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹ de BAP promoveu 100 e 81,25% de conversão de embriões zigóticos em plântulas normais, respectivamente. A vermiculita, na ausência de meio de cultura MS, induziu 100% de germinação. Esses resultados indicam que o nim indiano apresenta alto potencial para a propagação *in vitro*.

Palavras-chave: Meliaceae, planta medicinal, propagação, cultura de embriões

ABSTRACT: *In vitro* germination of zygotic embryos and seeds of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). This paper aimed at studying *in vitro* germination potential of neem. Mature zygotic embryos were cultivated in MS culture medium supplemented with 0.6% agar, 0.25% activated charcoal, 3% sucrose, and the combination of different concentrations of 1-naphthaleneacetic acid (NAA; 1.0, 2.0, and 3.0 mg L⁻¹) and 6-benzylaminopurine (BAP; 1.0, 2.0, 3.0, and 4.0 mg L⁻¹), besides a control without plant growth regulators, totalizing 13 treatments with four replicates. Seeds were cultivated in two substrates: agar and vermiculite, in the absence or presence of ½ MS and MS, totalizing six treatments. Higher concentrations of NAA and BAP induced greater percentage of abnormal seedlings. The combination of 1.0 mg L⁻¹ NAA with 1.0 or 2.0 mg L⁻¹ BAP led to 100 and 81.25% conversion, respectively, of zygotic embryos into normal seedlings. Vermiculite without MS culture medium induced 100% germination. These results indicate that neem presents high potential for *in vitro* propagation.

Key words: Meliaceae, medicinal plant, propagation, embryo culture

INTRODUÇÃO

O nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.) é uma espécie arbórea da família *Meliaceae*, de origem asiática natural de Burma e das regiões áridas do subcontinente indiano. As propriedades terapêuticas da planta são conhecidas pelos indianos há cerca de cinco mil anos. Os primeiros registros médicos referem-se aos benefícios dos frutos, das sementes, do óleo, das folhas, das raízes e da casca da árvore,

usados na medicina ayurvédica como anti-sépticos, antimicrobianos, nos distúrbios urinários, diarreias e doenças do couro cabeludo. O óleo e seus isolados inibem o desenvolvimento de fungos sobre o homem e animais. A ação antimalárica é atribuída, ao gedunine, um limonóide. Tabletes e injeções contendo em suas formulações extratos de nim são usados no tratamento de malária crônica (Neves & Nogueira, 1996).

A Embrapa vem trabalhando para aumentar a variabilidade genética de *Azadirachta indica* A. Juss. no Brasil por meio da introdução de germoplasma de várias procedências. A propagação *in vitro* de plantas lenhosas tem-se apresentado como técnica alternativa aos métodos tradicionais de propagação assexuada, por facilitar a produção de mudas de material elite em escala comercial e produzir plantas livres de patógenos, além de acelerar programas de melhoramento.

A cultura *in vitro* de embriões apresenta-se como uma ferramenta para o controle da embriogênese, o resgate de embriões interespecíficos, quando apresentam alguma incompatibilidade, a produção de haplóides, a quebra de dormência e a produção de plântulas assépticas, além de elucidar alguns problemas como nutrição do embrião no óvulo entre outras aplicações (Collins & Grosser, 1984; Hu & Ferreira, 1998). Alguns estudos de organogênese e embriogênese somática de nim indiano são relatados por Parveen et al. (1995) e Wewetzer (1998), entretanto informações acerca do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e sementes são escassos.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o potencial de germinação de nim indiano em diferentes condições de cultura *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODO

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros utilizando-se embriões zigóticos e sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.), coletados em janeiro de 2004 de plantas matrizes da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju, SE. Exsicata da espécie encontra-se depositada no herbário Sérgio Tavares da UFRPE, número de registro 12184.

Para a cultura de embriões zigóticos, frutos maduros foram lavados em água corrente e submetidos ao despulpamento. As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico a 70% por dois minutos e, em seguida, em solução de NaClO a 2% por 20 minutos sob agitação e, posteriormente, foram lavadas quatro vezes em água destilada e autoclavada. Os embriões zigóticos, excisados de sementes assépticas em câmara de fluxo laminar, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 0,6% de ágar, 0,25% de carvão ativado e 3% de sacarose, suplementado com diferentes combinações de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e, em seguida, os tubos de ensaio contendo meio de cultura foram submetidos à esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 4 + 1, três concentrações de ANA (1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), quatro concentrações de BAP (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), mais uma testemunha (meio MS sem adição de ANA e BAP), totalizando 13 tratamentos com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaio, contendo um explante cada.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria sob 52 μmol m⁻² s⁻¹ de irradiância/oito horas de escuro.

Aos 14 dias após a inoculação avaliou-se a porcentagem de germinação de embriões zigóticos (% CEZ) e, aos 30 dias, a porcentagem de plântulas normais (% PN). Como plântulas anormais, foram consideradas aquelas que apresentavam ausência ou crescimento atrofiado da parte aérea e/ou do sistema radicular.

As variáveis % CEZ e % PN foram transformadas para $\sqrt{x+1,0}$, visando atendimento das pressuposições da análise de variância. Foi aplicado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade para a comparação da média dos tratamentos em relação à média da testemunha. Para a comparação das médias de ANA e BAP foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2000).

Para a avaliação da germinação *in vitro* de sementes de nim indiano, frutos maduros foram lavados em água corrente, despulpados e as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, conforme metodologia descrita anteriormente. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo os seguintes tratamentos: T1- 0,6% de ágar; T2- vermiculita + água esterilizada e autoclavada; T3- 0,6% de ágar + meio ½ MS; T4- vermiculita + meio ½ MS, T5- 0,6% de ágar + meio MS; T6- vermiculita + meio MS.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 dois substratos (ágar e vermiculita) e três concentrações de sais do meio MS (0, ½ e 1), com cinco repetições, sendo que cada unidade experimental foi constituída de oito frascos, contendo uma semente cada. As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

Aos 10 dias após a inoculação avaliou-se a porcentagem de germinação (% GER) e, aos 21 dias, a porcentagem de plântulas normais (% PN). As médias da variável % GER foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5%

de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2000).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os tratamentos constituídos de 1,0 mg L⁻¹ de ANA combinados com 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹ de BAP foram significativamente superiores (P = 0,05) à testemunha com relação à porcentagem de plântulas normais (Tabela 1).

TABELA 1. Diferença entre a média dos tratamentos e a testemunha para as variáveis porcentagens de germinação de embriões zigóticos (% GEZ) e de plântulas normais (% PN) de *Azadirachta indica* A. Juss., em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e de BAP.

Comparações	% GEZ	% PN
ANA 1,0; BAP 1,0	0,00	100,00**
ANA 1,0; BAP 2,0	-18,75	100,00**
ANA 1,0; BAP 3,0	0,00	50,00
ANA 1,0; BAP 4,0	0,00	50,00
ANA 2,0; BAP 1,0	0,00	50,00
ANA 2,0; BAP 2,0	-50,00**	50,00
ANA 2,0; BAP 3,0	0,00	50,00
ANA 2,0; BAP 4,0	0,00	25,00
ANA 3,0; BAP 1,0	-62,50**	25,00
ANA 3,0; BAP 2,0	0,00	50,00
ANA 3,0; BAP 3,0	0,00	0,00
ANA 3,0; BAP 4,0	0,00	0,00

** significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

A análise de variância detectou efeitos significativos do BAP e da interação "ANA x BAP" para porcentagem de germinação de embriões (p = 0,01) e do ANA para a porcentagem de plântulas normais (p = 0,01). Não houve efeito da interação "ANA x BAP" e do BAP na porcentagem de plântulas normais (p > 0,05).

Observa-se na Tabela 2, que, em média, os tratamentos apresentaram uma boa conversão de embriões zigóticos em plântulas.

Os tratamentos constituídos de 1,0 mg L⁻¹ de ANA combinados com 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹ de BAP apresentaram 100 e 81,25% de conversão de embriões zigóticos em plântulas normais (Tabela 2). A combinação de ANA e BAP no meio de cultura MS também foi favorável para a conversão de embriões zigóticos maduros de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), conforme relatado por Ledo et al. (2001).

Resultados semelhantes também foram observados por Mello (2000) em guaribeira (*Syagros oleracea* (Mart) Becc) cultivada em meio MS suplementado com BAP e por Santa-Catarina et al. (2001) em embriões zigóticos imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez) na presença de 4,4 µM de BAP. Entretanto, Nogueira et al. (2004) observaram que o BAP induziu processos morfogênicos não desejáveis como a formação de calos, na germinação *in vitro* de embriões de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.).

A presença de 1 mg L⁻¹ de ANA no meio de cultura promoveu, em média, a formação de 75% de plântulas normais, sendo superior a concentração de 3 mg L⁻¹ de ANA. Apesar do efeito da interação entre os reguladores de crescimento não ter sido significativo, o aumento da concentração de ANA e BAP influenciou negativamente o desenvolvimento das plântulas, sendo que nas combinações de 3,0 mg L⁻¹ de ANA com 3,0 ou 4,0 mg L⁻¹ de BAP 100% das plântulas apresentaram-se anormais, com ausência ou crescimento atrofiado da parte aérea e/ou do sistema radicular (Figura 1B). Mello (2000) observou uma redução gradativa no desenvolvimento de plântulas de guaribeira com o aumento da concentração do BAP.

Embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este são quase autotróficos, em geral, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação de fonte de energia e os reguladores de crescimento tornam-se dispensáveis (Hu & Ferreira, 1998). Entretanto, ficou evidenciada a necessidade de enriquecimento do meio com reguladores de crescimento considerando que, na ausência destes, apesar de se obter 100% de germinação dos embriões, não houve a formação de plântulas normais, provavelmente porque os mesmos não haviam acumulado reservas suficientes para continuar seu completo desenvolvimento *in vitro*. Além da espécie e do estágio de desenvolvimento dos embriões, o nível endógeno de fitormônios nos embriões e o balanço entre os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura devem ser considerados.

Aos sete dias da inoculação observou-se o início da germinação com o lançamento da radícula e aos 21 dias a emissão do primeiro par de folhas (Figura 1A).

De acordo com a análise de variância, houve efeito significativo da interação "substrato x meio de cultura" para a porcentagem de germinação aos 10 dias de cultura (Tabela 3). Em média a vermiculita e o ágar, na ausência de meio de cultura, promoveram as maiores porcentagens de germinação (97,5 e 77,5%, respectivamente). A ausência de sais do meio de cultura provavelmente diminuiu o potencial osmótico promovendo uma maior disponibilidade de

TABELA 2. Valores médios para porcentagens de conversão de embriões (% CEZ) e de plântulas normais (% PN) de *Azadirachta indica* A. Juss., em meio MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e BAP.

BAP (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)			Média
	1,0	2,0	3,0	
% CEZ				
1,0	100,00 aA	100,00 aA	37,50 bB	79,17 b
2,0	81,25 aA	50,00 bB	100,00 aA	77,08 b
3,0	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 a
4,0	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA	100,00 a
Média	95,31 A	87,50 AB	84,38 B	
Testemunha	100,00		CV (%)	8,44
% PN				
1,0	100,00	50,00	25,00	58,33
2,0	100,00	50,00	50,00	66,67
3,0	50,00	50,00	0,00	33,33
4,0	50,00	25,00	0,00	25,00
Média	75,00 A	43,75 AB	18,75 B	
Testemunha	0,00		CV (%)	80,24

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



FIGURA 1. A- fases da germinação *in vitro* de nim indiano; B- plântulas anormais e normais.

água para o processo de germinação. Entretanto, elevadas taxas de germinação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) foram obtidas em meio MS líquido e MS gelificado quando comparado com água de coco e água destilada (Pinheiro et al., 2001).

TABELA 3. Valores médios para porcentagem de germinação (% GER) de *Azadirachta indica* A. Juss., em diferentes condições de cultura *in vitro*.

	% GER		
	Ausência de MS	½ MS	MS
Ágar 0,6 %	77,5 Ab	0,0 Bb	15,0 Bb
Vermiculita	97,5 Aa	75,0 Ba	65,0 Ba
		CV (%)	19,24

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (George, 1993). Considerando que os cotilédones têm a função de armazenar substâncias de reservas até a plântula tornar-se autotrófica, a presença de solução nutritiva no meio externo torna-se dispensável para o crescimento inicial de plântulas de nim indiano cultivadas *in vitro*.

Aos 21 dias da inoculação os tratamentos constituídos do substrato vermiculita na ausência e presença de meio ½ MS e MS promoveram a formação de 100, 90 e 52% de plântulas normais, com o primeiro par de folhas, respectivamente. Para o ágar na ausência de meio MS, foi observado que apenas 31% das plântulas apresentaram desenvolvimento normal e, na presença de ½ MS e MS, 100% de plântulas foram anormais (Figura 1B).

Resultados semelhantes foram observados por Ledo et al. (2003) em cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum). Este fato pode ser explicado pelo maior grau de aeração da vermiculita umedecida, favorecendo a formação de raízes e, conseqüentemente, a obtenção de plantas completas e normais. Nas condições em que os experimentos foram conduzidos pode-se concluir que a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de ANA combinada com 1,0 mg L⁻¹ de BAP promove a conversão de 100% de embriões zigóticos maduros em plântulas normais e a vermiculita induz 97,5% de germinação de sementes de *Azadirachta indica* A. Juss. com formação de plântulas normais.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- COLLINS, G.B.; GROSSER, J.W. Culture of embryos. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1984. v.1, p.241-57.
- GEORGE, E.F. The components of culture media. In: _____. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture - Part 1: the technology**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1. p.371-93.
- LEDO, A.S. et al. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p.468-72, 2001.
- LEDO, A.S. et al. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista de Ciências Agrárias**, n.40, p.73-80, 2003.
- MELLO, B. **Cultivo de embriões *in vitro* da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart) Becc.]**. 2000. 117p. Tese (Doutorado-Área de Concentração em Fitotecnia) - Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-97, 1962.
- NEVES, B.P.; NOGUEIRA, J.C.M. **Cultivo e utilização de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.)**. Goiânia: CNPAF, 1996. Disponível em: < http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/circularartecnica/ct_28/index.htm>. Acesso: 31 jan. 2006.
- NOGUEIRA, R.C. et al. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.5, p.1053-9, 2004.
- PARVEEN, R.K.; KAKANI, C.S.; TOMAR, U.K. Tissue culture studies on neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **News letter of International Neem Network**, v.2, n.3, p.15-7, 1995.
- PINHEIRO, C.S.R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.413-6, 2001.
- SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S.C.; PEDROTTI, E.L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.4, suppl., p.501-10, 2001.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT User's Guide**: version 8.0. Cary NC: SAS Institute Inc., 2000. v.1.
- WEWETZER, A. Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin. **Phytoparasitica**, v.36, n.1, p.47-52, 1998.