

RIZOGÊNESE *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (Bignoniaceae)

Rodrigo Miranda Moraes¹
Fernanda Carlota Nery²
Jade Del Nero Oliveira³
Sandro Barbosa⁴

Recursos Naturais

RESUMO

Tabebuia roseoalba (Bignoniaceae), é uma espécie arbórea que possui potencial medicinal e grande valor ornamental sendo muito utilizada na arborização urbana. Objetivou-se estabelecer um protocolo para rizogênese *in vitro* e aclimatização de *T. roseoalba* via organogênese direta. Para rizogênese, foram utilizadas brotações excisadas aos 30 dias de cultivo *in vitro*, e avaliado o efeito de diferentes auxinas, agentes geleificantes e meios de cultura. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o percentual de enraizamento e o comprimento da raiz principal. Em seguida foi testada a aclimatização de brotações com e sem raízes, em substrato comercial ou vermiculita. Para rizogênese *in vitro* recomenda-se o uso de meio de cultura MS, suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIB e geleificado com ágar. Para aclimatização, recomenda-se o enraizamento prévio das brotações e a utilização de substrato comercial para obtenção de 65% de sobrevivência das plântulas.

Palavras-chave: Conservação; Propagação Vegetativa; Ipê-branco; Cerrado.

INTRODUÇÃO

Popularmente conhecido como Ipê-branco, *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith é uma árvore decídua, que apresenta floração branca exuberante e nativa do Cerrado, comumente explorada na medicina popular e bastante requisitada em programas de reflorestamento (FERRAZ-FILHA et al., 2016). Em espécies florestais nativas do Cerrado é comum a ocorrência de sementes com baixa longevidade natural, o que dificulta sua utilização fora da sua época de produção (CARVALHO, SILVA, DAVIDE, 2006; SOUZA et al., 2015).

A cultura de tecidos vegetais compreende técnicas especialmente utilizadas para conservação e propagação vegetativa em larga escala, em particular para espécies de importância econômica, ornamental e medicinal, e pode ser aplicada para preservação de espécies florestais nativas do Cerrado (PINHAL et al., 2011; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013; SOUZA et al., 2017). Diante do exposto, objetivou-se estabelecer um protocolo para rizogênese *in vitro* e aclimatização de *T. roseoalba*, via organogênese direta, a fim de contribuir com a sua propagação em larga escala.

¹ Doutorando do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal - UFLA-MG. moraes3p@gmail.com.

² Prof. Dra. do Departamento de Engenharia de Biosistemas da UFSJ-MG. fernandacarlot@ufsj.edu.br

³ Graduanda em Biotecnologia da UNIFAL-MG – Campus Alfenas. jade.delnero@hotmail.com

⁴ Prof. Dr. do PPG em Ciências Ambientais UNIFAL-MG – Campus Alfenas. sandrobiogen@gmail.com

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *T. roseoalba* (Ridl.) Sandwith foram fornecidas pelo Viveiro de Mudas Nordeste LTDA, Arcos – MG. Após estabelecimento *in vitro* das plantas matrizes foi efetuada a indução de brotações em segmentos nodais utilizando meio de cultura MS, suplementado com a combinação das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP Sigma[®]) e cinetina (KIN Sigma[®]) nas concentrações de 2,0 e 0,5 mg.L⁻¹, respectivamente, à temperatura de 25 °C.

Para rizogênese *in vitro*, brotações foram excisadas aos 30 dias de cultivo *in vitro*, e inoculadas em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS, geleificado com 0,7% de ágar (Sigma[®]) ou 0,25% de phytigel (Sigma[®]), e suplementado com diferentes auxinas: ácido indol-3-acético (AIA - Sigma[®]), ácido indolil-3-butírico (AIB - Sigma[®]), α -naftalenoacético (ANA - Sigma[®]), ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D - Sigma[®]) e ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico (Dicamba - Sigma[®]), em diferentes concentrações (1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹). Como controles foram utilizados os mesmos meios de cultura sem a adição dos reguladores de crescimento. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o percentual de enraizamento e o comprimento da raiz principal, em esquema fatorial triplo (agente geleificante x auxinas x concentração), sendo 15 explantes por tratamento, em DIC.

Posteriormente, visando otimizar o protocolo de enraizamento de brotações, o mesmo tipo de explante foi inoculado em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS ou MS^{1/2} (metade da concentração de sais), acrescido de 3% de sacarose, 0,25% de phytigel (Sigma[®]), e suplementado com diferentes concentrações de carvão ativado (1,0 ou 2,0 mg.L⁻¹) e AIB (1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) (Sigma[®]). Como controles foram utilizados os mesmos meios de cultura sem a adição de carvão ativado e de reguladores de crescimento. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o percentual de enraizamento e o comprimento da raiz principal, em esquema fatorial triplo (meio de cultura x carvão ativado x AIB), sendo 15 explantes por tratamento, em DIC.

Para aclimatização foram selecionadas brotações sem passar pela etapa de enraizamento *in vitro*, e brotações enraizadas *in vitro* durante 30 dias. As brotações (com e sem raízes) foram transplantadas simultaneamente para tubetes (250 cm³), contendo substrato comercial ou vermiculita, e mantidos em casa de vegetação sob sombrite 30%. Decorridos 30 dias do início da aclimatização, foi avaliado o percentual de sobrevivência, sendo 25 brotações por tratamento, em esquema fatorial duplo (tipo de brotação x substrato), em DIC.

A fim de verificar as características que permitiram a sobrevivência das plantas ao processo de aclimatização, foi avaliada a diferença de densidade estomática entre as plantas cultivadas *in vitro* e as plantas ao final do processo de aclimatização. Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), por meio do *software* estatístico R Core Team (2011), versão 3.4.0, via pacote ExpDes.pt.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que a formação de raízes adventícias é frequentemente apontada como fator limitante para propagação *in vitro* de espécies lenhosas, é necessário a adequação de meios de cultura específicos para esta etapa, e a utilização de auxinas geralmente se faz necessário para alcançar melhores resultados (CURTI e REINIGER, 2014). Para rizogênese, as auxinas AIA e AIB apresentaram resultados significativamente ($p < 0,05$) melhores que 2,4-D, ANA e Dicamba (Figura 1A e 1B).

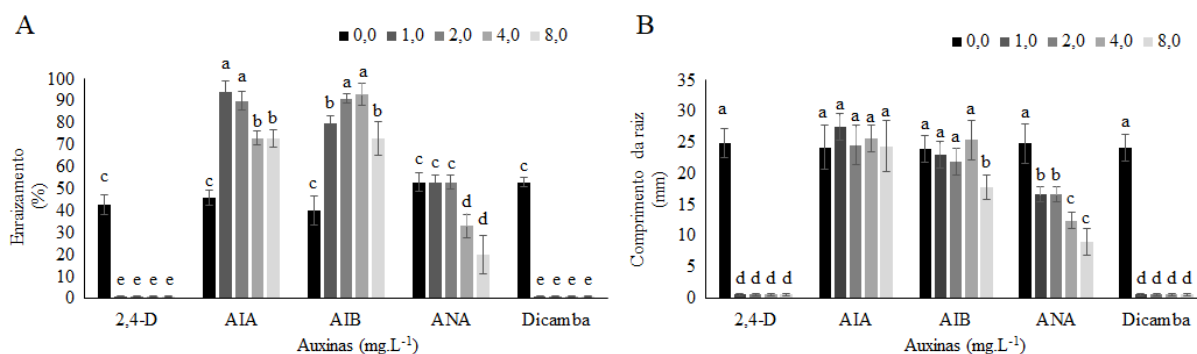


Figura 1 - Percentual de enraizamento (A) e comprimento de raiz principal (B) em brotações de *T. rosealba* submetida a diferentes concentrações de auxinas (mg.L⁻¹). Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras: erro padrão da média.

Além da determinação do balanço ideal de reguladores de crescimento, o tipo de agentes geleificantes, e a composição do meio de cultura também influenciam o crescimento de raízes e o desenvolvimento de culturas *in vitro* (CHAPLA et al., 2009; XAVIER, WENDLING, SILVA, 2013). No presente estudo, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o percentual de enraizamento e o comprimento das raízes quanto ao agente solidificante ágar ou phytigel.

Na tentativa de otimizar o protocolo de indução de raízes, não foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre meio de cultura MS e o meio de cultura MS^{1/2}, que apresentaram em média 51,5% e 54,5% de enraizamento, respectivamente. Também não houve diferença

significativa ($p < 0,05$) para as diferentes concentrações de carvão ativado, com 57,5%, 51,5% e 60,0%, para o tratamento controle e com 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de carvão ativado, respectivamente. Por outro lado, quando avaliado isoladamente dos fatores meio de cultura e carvão ativado, o tratamento com 4,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB exibiu novamente as maiores médias de percentual de enraizamento de brotações, com 83,3% e 77,7% de enraizamento, respectivamente.

A concentração elevada de sais do meio de cultura MS também pode prejudicar o enraizamento de brotos em algumas espécies, o que tem levado alguns pesquisadores a trabalhar com formulações mais diluídas deste meio (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009; DUARTE, SANSBERRO, LUNA, 2016). Além disso, o uso de carvão ativado no meio de cultura pode trazer benefícios para o enraizamento *in vitro* de espécies florestais nativas do Cerrado (LEITZKE, DAMIANI, SCHUCH, 2009). Entretanto, neste estudo, não houve diferença significativa para as diferentes concentrações de carvão ativado, e entre meio de cultura MS e o meio de cultura MS½.

A taxa de mortalidade das plantas transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro* é frequentemente elevada devido ao dessecamento (HARTMANN et al., 2011). Desta forma, a escolha do tipo de substrato mais adequado pode influenciar diretamente no sucesso da aclimatização, reduzindo a taxa de mortalidade de plantas (SCHUCH, 2005). No processo de aclimatização, as brotações previamente enraizadas *in vitro* tiveram um percentual de sobrevivência significativamente ($p < 0,05$) maior que as brotações sem raízes (enraizadas diretamente no substrato). Além disso, o tipo de substrato de cultivo também apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), de modo que brotações com raízes, em substrato comercial apresentaram 92% de sobrevivência, em relação ao substrato vermiculita com apenas 56% de sobrevivência (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de sobrevivência (%) de plântulas de *T. roseoalba* com e sem enraizamento prévio (*in vitro*), transplantadas em dois substratos diferentes, durante o processo de aclimatização.

	Sobrevivência de plântulas (%)	
	Substrato comercial	Vermiculita
Com raiz		
Sim	92 a	56 b
Não	38 c	8 d

* Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Quanto às análises morfoanatômicas de folhas, verificou-se redução significativa ($p < 0,05$) na densidade estomática na face abaxial das folhas de brotações cultivadas *in vitro*, em relação as folhas das plantas ao final do processo de aclimatização, apresentando em média 196 e 176 estômatos por 1 mm^2 , respectivamente. Abbade et al. (2009) também verificaram uma menor densidade estomática e maior número de tricomas em folhas de plantas adultas de *T. roseoalba* cultivadas *ex vitro* quando comparadas com plantas cultivadas *in vitro*. Por outro lado, Dousseau et al. (2008) não observaram diferença estatística para densidade estomática quando compararam folhas de plantas de *H. serratifolius* propagadas *in vivo*, *in vitro* e durante a aclimatização.

CONCLUSÕES

Para rizogênese *in vitro* de brotações de *T. roseoalba* recomenda-se o uso de meio de cultura MS½, suplementado com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indolil-3-butírico (AIB) e geleificado com ágar, sem a necessidade de carvão ativado, ou de etapas adicionais para alongamento das brotações. Para aclimatização, recomenda-se o enraizamento prévio das brotações de *T. roseoalba* e a utilização de substrato comercial.

REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C. et al. Anatomia foliar de Ipê-branco (*Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sand.) Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.
- AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 473-476, 2006.
- BATAGIN, K. D. et al. Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiros cv. IAC Gomo-de-mel micropropagados e aclimatizados em diferentes condições de luminosidade. **Acta Botânica Brasílica**, v. 23, n. 1, p. 85-92, 2009.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.
- CHAPLA, P. I. et al. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.
- DOUSSEAU, S. et al. Leaf anatomy of *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagated *in vitro*, *in vivo* and during the acclimatization. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, 2008.
- FERRAZ-FILHA, Z. S. et al. *Tabebuia roseoalba*: *In vivo* hypouricemic and anti-inflammatory effects of its ethanolic extract and constituents. **Planta Medica**, v. 82, n. 16, p. 1395-1402, 2016.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

SCHUCH, A. C. E. M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

SOUZA, A. C. et al. Cryopreservation and optimization of *in vitro* germination of *Handroanthus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1083, p. 481-483, 2015.

SOUZA, A. C. et al. *In vitro* organogenesis in *Handroantus serratifolius*. **Acta Horticulturae**, v. 1, p. 177-184, 2017.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p