

ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE MICROESTACAS E MICROPROPAGAÇÃO DE GEMAS AXILARES DE SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.)

IN VITRO ROOTING OF MICROCUTTINGS AND MICROPROPAGATION OF AXILARY BUDS OF SARANDI (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.)

Cícero Deschamps¹ José Eduardo Brasil Pereira Pinto²

RESUMO

A indução da rizogênese *in vitro* foi testada em meios de cultura Murashige & Skoog (MS) e Wood Plant Medium (WPM), líquido e sólido, suplementados ou não com ácido indolbutírico (AIB). Na multiplicação de gemas axilares, avaliou-se o efeito da benzilaminopurina (BAP) em meios de cultura MS e WPM, utilizando um explante com uma gema por tubo de ensaio. O mesmo tipo de explante foi inoculado em número de 10 por frasco de 200ml com meio MS, suplementado com BAP e ácido naftalenoacético (ANA). O último experimento envolveu os reguladores de crescimento BAP e ácido giberelico (GA₃), juntamente com carvão ativado. As maiores porcentagens de explantes enraizados e número de raízes foram obtidos em meio WPM, suplementado com 4,9µM de AIB, independentemente da presença de ágar. Os melhores resultados na multiplicação de gemas axilares ocorreram na presença de GA₃ onde observou-se efeito linear até 1,4µM no número de explantes alongados, comprimento da parte aérea e número de gemas. O BAP influenciou essas características apenas quando o carvão ativado estava ausente no meio, nesse caso 1,1µM foi a melhor concentração.

Palavras-chave: micropropagação, regulador de crescimento, cultura de tecidos, *Sebastiania schottiana*.

SUMMARY

In vitro rooting was carried out on Murashige & Skoog (MS) and Wood Plant Medium (WPM) liquid and solid, supplemented with indolbutiric acid (IBA). Multiple-shoot induction was tested with benzylaminopurine (BAP) on MS and WPM medium, with one explant in each tube. The explant was inoculated in container (200ml) on MS medium supplemented with BAP and NAA. The last experiment was made with BAP, GA₃ and activated charcoal. In the present work, the results show better rooting percentage and number of roots on WPM medium with 4.9µM IBA. The multiplication of shoots was obtained with GA₃ at 1.4µM that resulted in better length of shoots and number of buds. BAP was effective for all characteristics at 1.1µM only without activated charcoal.

Key words: micropropagation, growth regulator, tissue culture, *Sebastiania schottiana*.

¹Engenheiro Agrônomo, Mestre, Curso de Pós-graduação em Agronomia, DBI, ESAL.

²Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Titular, Departamento de Agricultura, ESAL, Caixa Postal 37, 37200-000 - LAVRAS, MG. Autor para correspondência.

INTRODUÇÃO

O Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.) é uma espécie florestal de mata de galeria que, segundo SMITH et al. (1988), apresenta adaptações para resistir às correntezas durante o período de enchentes.

A propagação do Sarandi apresenta problemas quanto à viabilidade de sementes produzidas em função dos diferentes estádios de maturação verificados em cada planta, em condições de campo.

A micropropagação *in vitro* representa uma alternativa à produção de mudas possibilitando a multiplicação em grande escala dessa espécie, independente da época do ano.

O meio de cultura, bem como o ajuste de seus componentes, varia conforme a espécie e estágio da micropropagação *in vitro*. THORPE et al. (1991) afirmam que meios de cultura como Wood Plant Medium (WPM) e Creishoff & Doy (CD), que apresentam baixa concentração de sais, aumentam a porcentagem de enraizamento *in vitro*. Em espécies lenhosas, o meio líquido tem sido empregado em detrimento do meio sólido conforme RATHORE et al. (1991) e LININGTON (1991).

A atuação das auxinas corresponde também a um fator de grande importância. BANKO & STEFANI (1989) obtiveram o enraizamento de *Oxydendron arborium* em meio WPM contendo ácido indol butírico (AIB). HAMMATT & RIDOUT (1992) multiplicaram *Fraxinus excelsior* a partir de gemas axilares em meio suplementado com benzilaminopurina (BAP). No entanto, JOHNSON et al. (1991) verificaram que esse regulador de crescimento em altas concentrações, embora tenham proporcionado maior número de brotações em *Quereus lobata*, proporcionou formação de entrenós mais curtos e com maior número de folhas. Combinações de BAP e ácido naftaleno acético (ANA) são citados, por exemplo, na multiplicação de espécies florestais como *Populus tremula* (WANN et al., 1988), *Pinus ponderosa* (LIN et al., 1991) e *Pinus virginiana* (CHANG et al., 1991). Embora com menos frequência, as giberelinas (GA) são utilizadas devido ao efeito no alongamento de partes aéreas. OFFORD et al. (1992) suplementaram o meio com BAP e GA₃ na multiplicação de *Telopea speciosissima*.

Além de reguladores de crescimento, o meio de multiplicação poderá conter carvão ativado, com a função de adsorver fenóis liberado pelo explante ao meio de cultura, conforme mencionado em *Pinus canriensis* (PULIDO et al., 1991), *Pinus strobus* (KAUL, 1990), *Depterocarpus alatus* e *D. intricatus* (LININGTON, 1991) e *Quereus robur* (VOLKAERT et al., 1990).

Portanto, nesse trabalho procurou-se definir as condições ideais quanto aos meios de cultura e reguladores de crescimento para a micropropagação de Sarandi nas etapas de enraizamento dos explantes e multiplicação de gemas axilares.

MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes utilizados para o enraizamento de microestacas e para multiplicação *in vitro*, foram obtidos de brotações provenientes de mudas mantidas em casa de vegetação. As brotações depois de coletadas permaneceram em água corrente durante período de 12 horas.

Em todos os experimentos, a inoculação dos explantes ocorreu em fluxo laminar, após assepsia com imersão em álcool 70% por 20 segundos, água sanitária 20%, durante 10 minutos e, finalmente, em água autoclavada por quatro vezes.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e a esterilização foi realizada em autoclave de vapor úmido por 121°C e uma atmosfera de pressão por 20 minutos.

No enraizamento *in vitro*, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 5 com quatro repetições por tratamento (quatro tubos/repetição), com os seguintes fatores: meios de cultura (MS - Murashige & Skoog e WPM - Wood Plant Medium), meios líquido e sólido (0,6% ágar) com 0; 0,5; 2,5; 4,9 e 9,8µM de ácido indolbutírico, respectivamente.

Na multiplicação *in vitro* utilizou-se explantes com apenas uma gema lateral. As concentrações de BAP nos meios MS e WPM foram 0; 2,22; 4,44 e 8,88µM, correspondendo 8 tratamentos com 5 repetições (seis tubos/repetição), fatorial 2 x 4.

Em um outro experimento estudou-se a interação entre ácido naftalenoacético (0; 0,1; 0,5; e 5,4µM) e benzilaminopurina (0; 0,04; 0,4 e 4,4µM) na multiplicação dos explantes em frascos (200ml) contendo meio MS. Foram inoculados 10 explantes, também com uma gema lateral, por frasco, sendo cada tratamento composto por quatro repetições (dez explantes/repetição). Por último, avaliou-se a influência do carvão ativado (0,1%) no meio MS e a interação da benzilaminopurina e ácido giberélico, ambos nas concentrações 0; 1,1 e 2,2µM e 0; 1,3 e 2,7µM, respectivamente. Os explantes nesse experimento apresentavam de três a quatro gemas laterais, sendo utilizados tubos de ensaio (150 x 20mm) contendo 10ml de meio de cultura, constituindo-se portanto esquema fatorial 2 x 3 x 3.

As avaliações foram efetuadas após 30 dias de cultivo em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 26 ± 1°C e irradiância aproximada de 40mmol.cm⁻².s⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enraizamento de Microestacas *in vitro*

A interação entre concentrações de ácido indolbutírico e meio de cultura afetou significativamente a porcentagem de explantes enraizados *in vitro*, bem como o número de raízes formadas. No meio MS não houve formação de raízes. Porém, quando o meio WPM, acrescido de 4,9 μ M de AIB foi utilizado, 37,8% do total de explantes enraizaram e 54,2% sobreviveram (Figura 1). Em contraste, a presença de AIB (4,9 μ M) no meio de cultura reduziu a sobrevivência dos explantes de 93,33% (testemunha) para 69,75%. THORPE et al. (1991) trabalhando com espécies lenhosas mostrou que o meio de cultura com baixa concentração de sais proporcionou melhor enraizamento.

Verificou-se que a porcentagem de explantes sobreviventes em meio MS líquido com ou sem AIB, proporcionou as melhores médias de sobrevivência, do que no meio sólido, diferindo entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Enquanto, que no meio WPM não houve diferença significativa entre o meio sólido e líquido (dados não mostrados).

Multiplicação *in vitro*

Efeito do BAP nos meios MS e WPM

O desenvolvimento da parte aérea ocorreu principalmente mediante a formação de folhas, de acordo com a interação entre meio de cultura e concentrações de BAP. DUSTAN et al. (1992) afirma que a adição de BAP ao meio nem sempre proporciona adequado alongamento.

Em média, 49,61% dos explantes desenvolveram parte aérea em meio MS contendo 4,4 μ M de BAP, enquanto que em meio WPM, maior percentual (45,71%) foi alcançado na ausência desse regulador de crescimento (Figura 2). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por HAMMATT & RIDOUT (1992) que verificaram maior desenvolvimento de brotações em meio WPM com baixas concentrações de BAP, constatando portanto, um efeito tóxico dessa citocinina no desenvolvimento das brotações em meio WPM. A redução do alongamento dos explantes sob a concentração de 8,9 μ M de BAP foi também registrada por SINHA & MALLICK (1993), que verificaram além da inibição no alongamento, maior formação de calos sob essa concentração. O comprimento das brotações obtidas neste trabalho foram reduzidas, devido o encurtamento dos internódios, talvez em função da toxidez do BAP sob concentrações elevadas.

Efeito da interação ANA e BAP

Na multiplicação de gemas axilares em frascos apenas o ANA influenciou o desenvolvimento da parte aérea, tendo efeito significativo. De acordo com a Figura 3, observa-se que a ausência de ANA proporcionou em média 62,30% de explantes com mais de cinco folhas, sendo que

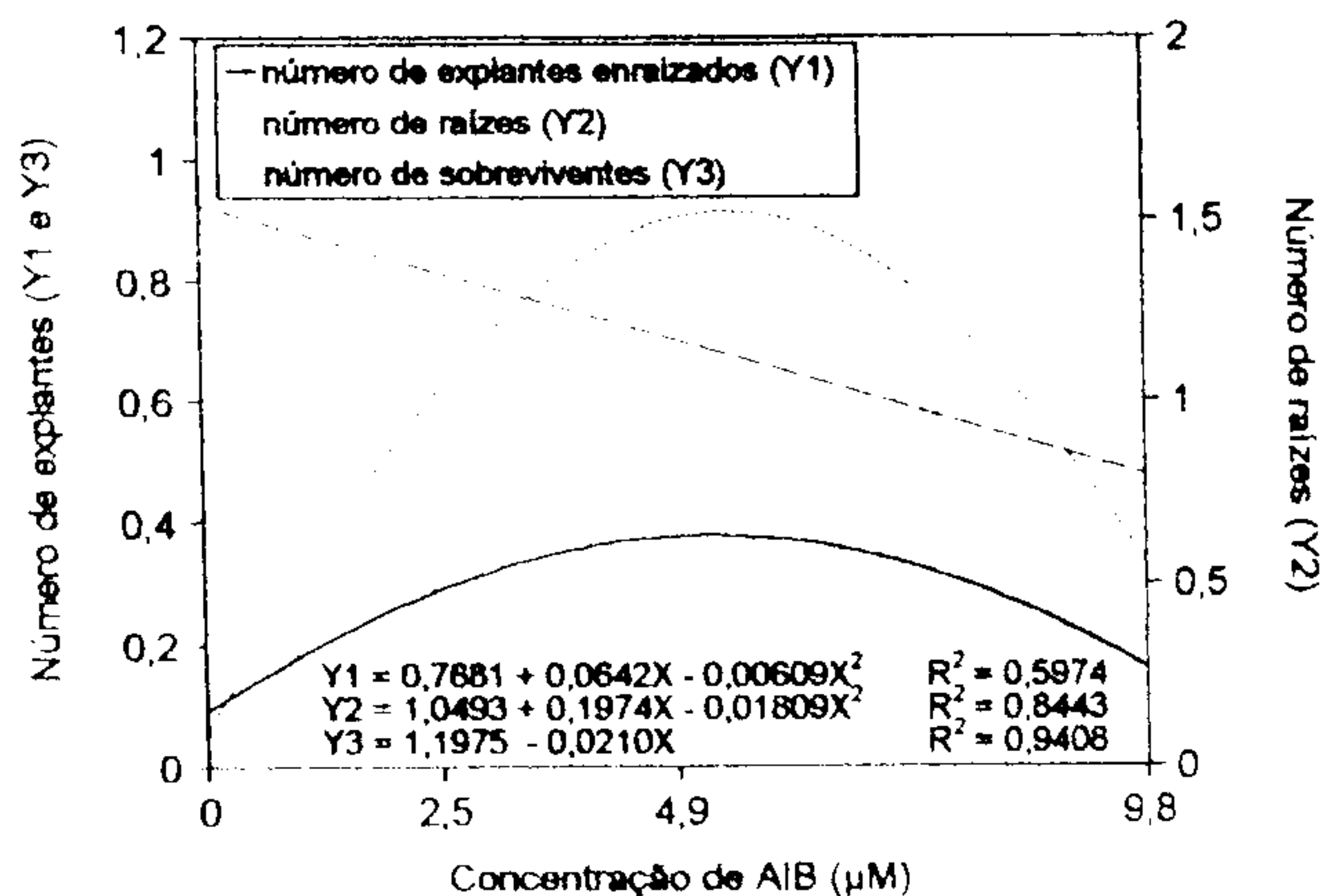


Figura 1. Número médio de explantes de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) enraizados em meio WPM contendo diferentes concentrações de AIB.

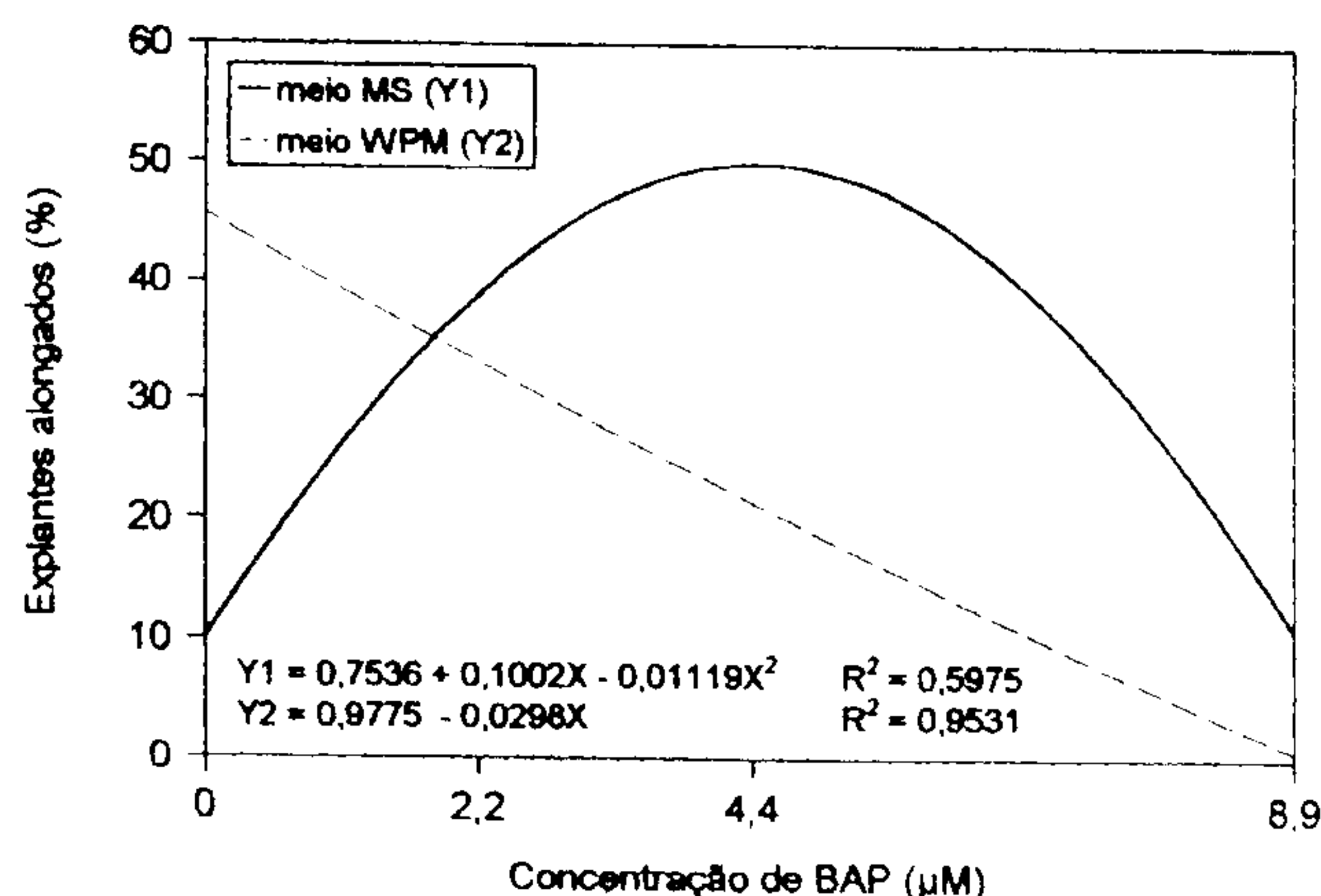


Figura 2. Porcentagem de explantes com gemas axilares alongadas em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) a partir de meios contendo diferentes concentrações de BAP.

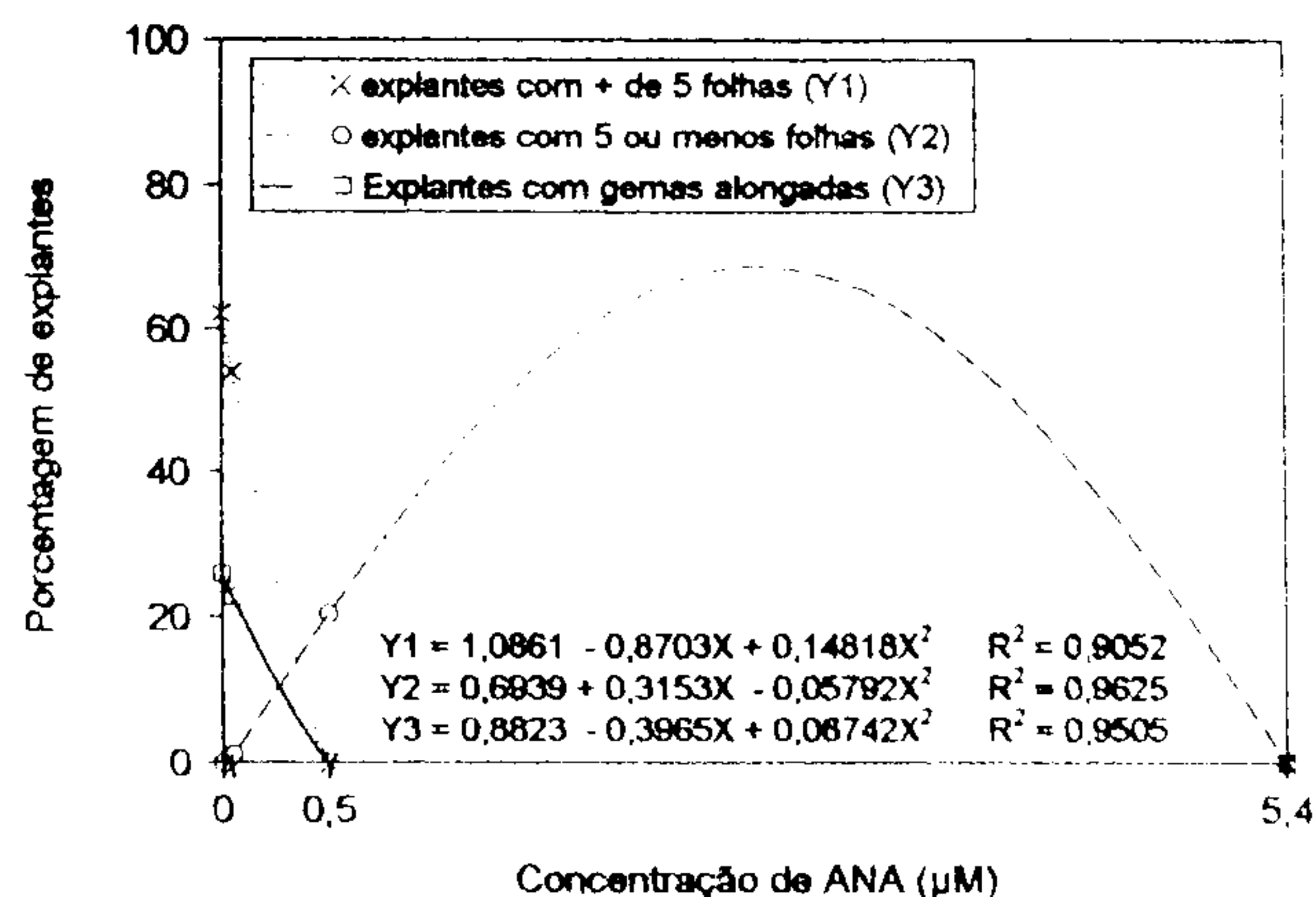


Figura 3. Porcentagem de explantes com mais de cinco e com cinco ou menos folhas e de explantes com gemas alongadas em Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) em meio MS contendo NAA.

na concentração de 0,1 μ M, 20,48% dos explantes apresentaram menos de cinco folhas.

No alongamento das gemas axilares foi maior também em meio isento dessa auxina, demonstrando o efeito tóxico do ANA. FIGUEIREDO & ESQUIBEL (1991) relatam o desenvolvimento e o crescimento de gemas axilares a partir de segmentos nodais de *Datura insignis* em baixa concentração de ANA. LIN (1991) e ISLAM et al. (1993) verificaram em seus trabalhos que o ANA proporcionou um aumento na formação de calos e menor formação de brotos. Outros trabalhos citam o aumento do número (RHAMAN, et al. 1993) e comprimento das brotações (WYSSOKINSKA, 1993) a partir da interação entre citocininas e auxinas.

Efeito da interação BAP e GA₃ e do carvão ativado

Na Figura 4 é apresentado o efeito do GA₃ sobre o número médio de gemas alongadas, comprimento médio das brotações, bem como número médio de gemas por brotação. Na concentração de 2,7 μ M de GA₃, 43,49% dos explantes apresentaram alongamento das brotações cujos comprimentos (em mm) e número de gemas foram 5,3 e 1,9, respectivamente.

A interação entre BAP e GA₃ verificada por OFFORD et al. (1992) na multiplicação de *Telopea speciosissima* não foi verificada no presente experimento, onde apenas o GA₃ induziu uma resposta positiva.

Por outro lado, observou-se uma interação significativa negativa entre o BAP e o carvão ativado. O melhor resultado foi obtido na ausência de carvão ativado no meio contendo 1,1 μ M de BAP. Nessa condição, 53,29% dos explantes apresentaram em média brotações com 7,4mm de comprimento e 3,1 gemas (Figuras 5 e 6). Portanto, apesar do efeito benéfico do carvão ativado na remoção de substâncias inibidoras produzidas pela autoclavagem do meio ou pelo próprio tecido vegetal, ele também atua na adsorção de citocininas e auxinas, reduzindo ou eliminando seus efeitos. EBERT et al. (1993), verificaram que aos 10 dias após o preparo do meio, os níveis de BAP disponíveis (não adsorvido) foram aproximadamente 0,3 a 0,4% em meio líquido e 0,8 a 1,0% em meio sólido (6 g.L⁻¹).

Um aspecto importante observado diz respeito a influência do tamanho do explante, aonde melhores resultados foram obtidos quando utilizaram-se explantes contendo de 3 a 4 gemas. LAUZER et al. (1992) verificaram a necessidade de uma tamanho mínimo na micropropagação de *Dioscorea abyssinica* Hoch. O melhor crescimento e desenvolvimento das brotações em explantes contendo de três a quatro gemas axilares pode ser devido a um maior nível de reservas.

Outros estudos envolvendo ajuste dos nutrientes no meio de cultura, buscando níveis adequados de sacarose

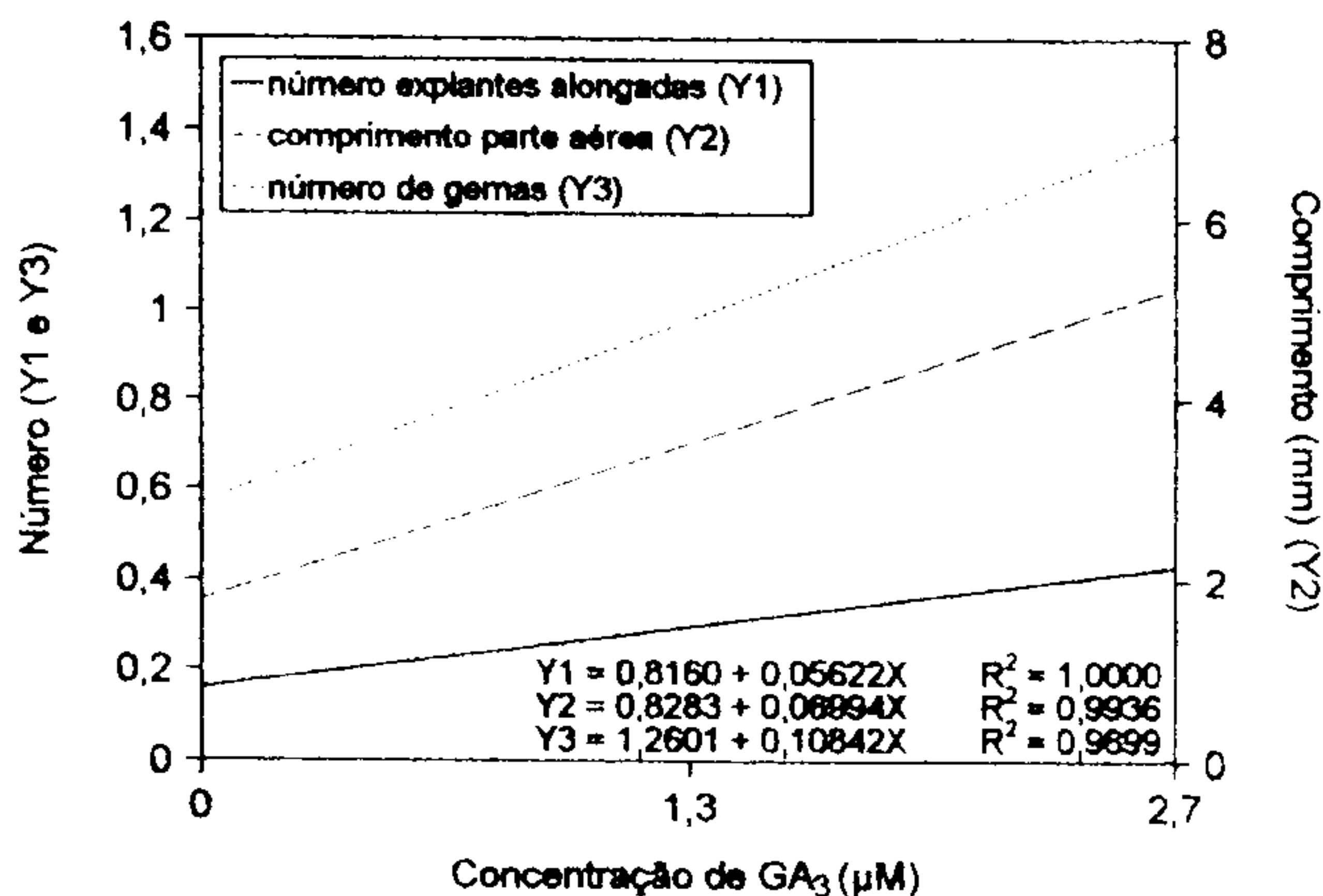


Figura 4. Efeito da adição de GA₃ no desenvolvimento da parte aérea de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) em meio contendo GA₃.

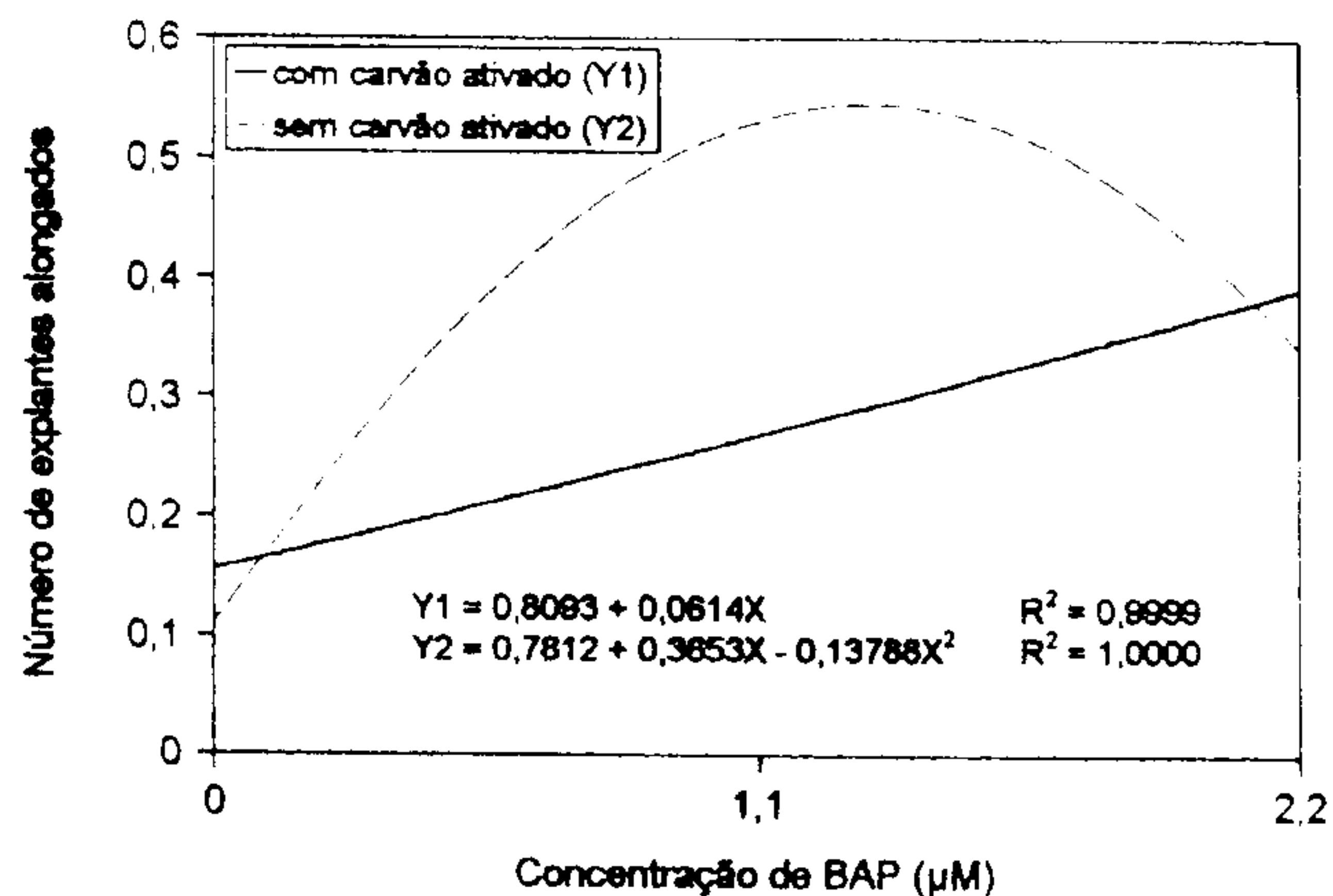


Figura 5. Número médio de explantes alongados em meio contendo carvão ativado (0,1%) e BAP na multiplicação *in vitro* de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana).

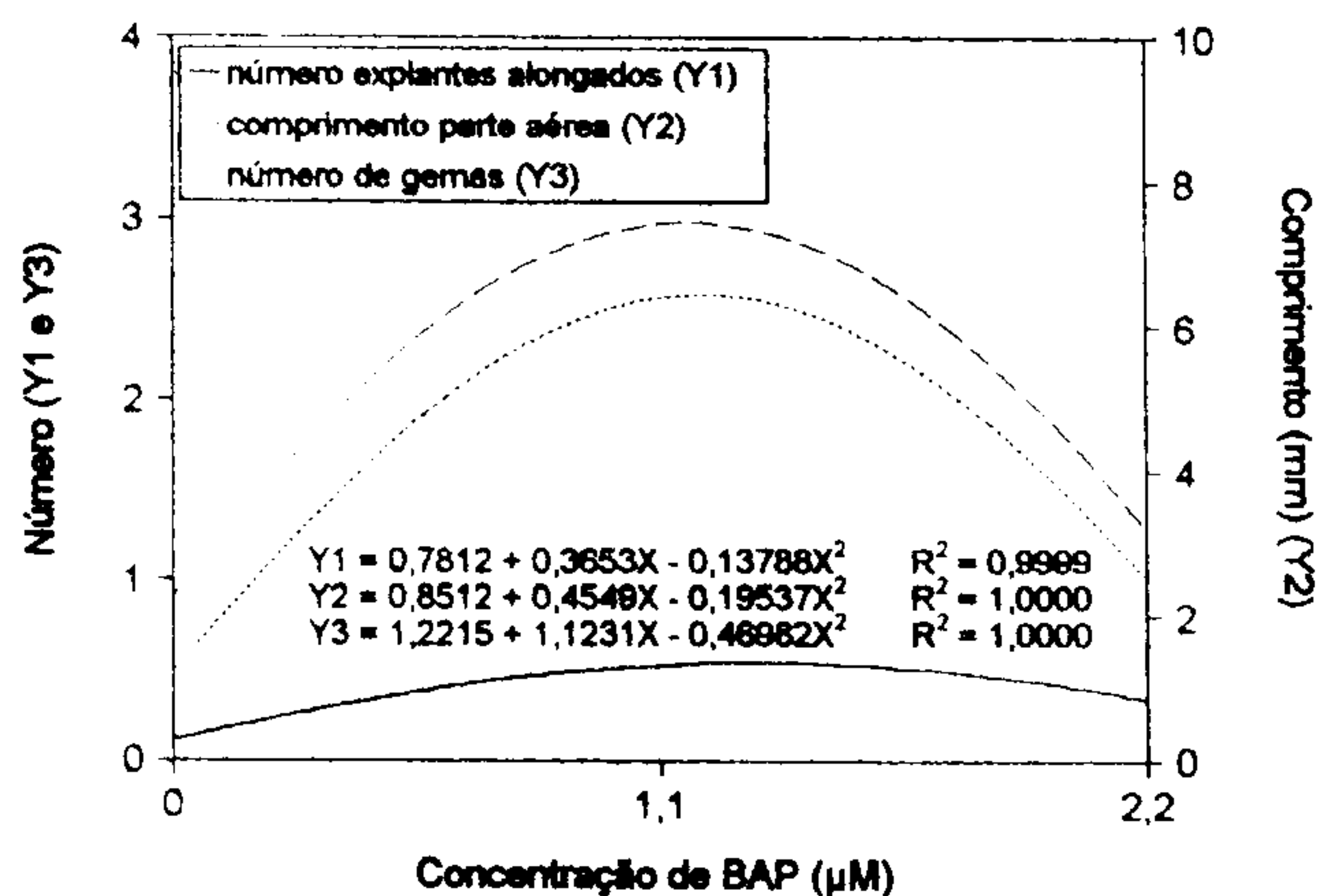


Figura 6. Número médio de explantes alongados, número de gemas e comprimento no alongamento de gemas axilares de explantes de Sarandi (*Sebastiania Schottiana* MUELL. ARG., var. Schottiana) em meio contendo BAP sem carvão ativado.

(ZHANG & STOLTZ, 1989 e DUSTAN et al., 1992) e da relação nitrato/amônio (SELBY et al., 1990), podem ser realizados buscando melhores resultados na multiplicação *in vitro* de Sarandi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKO, T.J., STEFANI, M.A. *In vitro* propagation of *Oxydendrum arboreum* from mature trees. *Hort Science*, Alexandria, v. 24, n. 4, p. 683-685, 1989.
- CHANG, S., SEN, S., MCKINLEY, C.R., et al. Clonal propagation of Virginia pine (*Pinus virginiana* MILL.) by organogenesis. *Plant Cell Reports*, New York, v. 10, n. 3, p. 131-134, 1991.
- DUSTAN, D.I., LASHTA, D.P., KIKCIO, S.I., et al. Factors affecting recurrent shoot multiplication *in vitro* cultures of 17 to 20 year-old douglas fir trees. *In vitro Cell Development Biology*, Columbia, v. 28, p. 33-38, 1992.
- EBERT, A., TAYLOR, F., BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 33, p. 157-162, 1993.
- FIGUEIREDO, S.F.L., ESQUIBEL, M.A. Callogenesis, organogenesis and micropropagation of *Datura insignis* BARB. RODR. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v. 3, n. 2, p. 63-68, 1991.
- HAMMATT, N., RIDOUT, M.S. Micropropagation of common ash (*Fraxinus excelsior*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 13, p. 67-74, 1992.
- ISLAM, R., ZAMAN, A., JOARDER, O.I., et al. *In vitro* propagation as an aid for cloning of *Morus laevigata* WALL. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 33, p. 339-342, 1993.
- JOHNSON, K.R., WALKER, R.F. Micropropagation of valley oak shoots from seedlings explantes. *New Forests*, v. 4, n. 4, p. 271-279, 1991.
- KAUL, K. Factors influencing *in vitro* micropropagation of *Pinus strobus* L. *Biologia Plantarum*, The Hague, v. 32, n. 4, p. 266-272, 1990.
- LAUZER, D., LAUBLIN, G., VINCENT, G., et al. *In vitro* propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* HOCH. and *D. mangenotiana* MIÉGE. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 2B, p. 215-223, 1992.
- LININGTON, I.M. *In vitro* propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 27, p. 81-88, 1991.
- LIN, Y., WAGNER, M.R., HEIDMANN, L.J. *In vitro* formation of axillary buds by immature shoots of *Ponderosa pine*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 26, p. 161-166, 1991.
- OFFORD, C.A., CAMPBELL, L.C., MULLINS, M.G. Micropropagation of *Telopea speciosissima* R. Br. (Proteaceae) 1: Explant establishment and proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 29, p. 215-221, 1992.
- PULIDO, M., HARRY, L.S., THORPE, T.A. *In vitro* regeneration of plantlets of Canary Island pine. *Acta Horticulturae*, La Plata, v. 289, p. 131-132, 1991.
- RAHMAN, S.M., HOSSAIN, M., BISWAS, B.K., et al. Micropropagation of *Caesalpinia pulcherrima* through nodal bud culture of mature tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 32, p. 363-365, 1993.
- RATHORE, T.S., SINGH, R.P., SHEKAWAT, N.S. Clonal propagation of desert teak (*Tecomella undulata*) through tissue culture. *Plant Science*, Limerick, v. 79, n. 2, p. 217-222, 1991.
- SELBY, C., HARVEY, B.M.R. The influence of composition of the basal medium on the growth and morphogenesis of cultured sitka spruce (*Picea sitchensis*) tissues. *Annals of Botany*, Belfast, v. 65, n. 4, p. 395-407, 1990.
- SINHA, K.R., MALLICK, R. Regeneration and multiplication of shoot in *Albizia falcata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 32, p. 259-261, 1993.
- SMITH, L.B., DOWNS, R.J., KLEIN, R.M. Euforbiáceas. In: REITZ, R. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí, EMPASC/Department of Botany (USA), 408 p., 1988.
- THORPE, T.A., HARRY, I.S., KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 311-336, 1991.
- VOLKAERT, H., SCHOOF, J., PIETERS, A., et al. Influence of explant source on *in vitro* axillary shoot formation in oak seedlings. *Tree Physiology*, v. 6, n. 1, p. 87-93, 1990.
- WANN, S.R., WYCKOFF, G.W., WYCKOFF, J.L. A tissue culture solution to a forestry problem - the propagation of a tetraploid european aspen. *Tree Planter's Note*, Washington, v. 39, n. 3, p. 28-30, 1988.
- WYSSOKINSKA, H. Micropropagation of *Penstemon serrulatus* and iridoid formation in regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v. 33, p. 171-180, 1993.
- ZHANG, B., STOLTZ, L.P. Shoot proliferation of *Euphorbia fulgens in vitro* affected by medium components. *Hort Science*, Mont Vernon, v. 24, n. 3, p. 503-504, 1989.