

**INFLUÊNCIA DA CINETINA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Handroanthus*
impetiginosus Mattos**

WESLEY PIRES FLAUSINO MÁXIMO¹, BRENO RÉGIS SANTOS², JOÃO PAULO RODRIGUES MARTINS³, SANDRO BARBOSA⁴, LUIZ ALBERTO BEIJO⁵, LUCIANO VILELA PAIVA⁶

RESUMO

O Ipê-roxo é uma espécie muito utilizada na paisagística e como fonte de compostos com propriedades farmacológicas. Com isso, tem intensificado sua exploração, ameaçando a espécie de extinção. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da cinetina durante a multiplicação *in vitro* de Ipê-roxo visando obter mudas com qualidade fitossanitária para utilização em futuros programas de revegetação. Segmentos nodais de 1 cm foram extraídos de plantas matrizes previamente estabelecidas *in vitro* após 60 dias de cultivo e utilizados como explantes. Esses foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM suplementado com 10mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 20g.L⁻¹ de sacarose e diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µmol.L⁻¹) de cinetina, sendo o tratamento controle a ausência deste regulador. O meio foi solidificado com 6g.L⁻¹ de ágar e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Após inoculação em câmara de fluxo laminar, o material foi mantido em sala de crescimento a 25±2°C, irradiância de 35 µmol m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação, analisando o número médio de brotos, gemas e folhas por explante e comprimento médio do maior broto. O delineamento experimental empregado foi em blocos casualizados (dias) composto de 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 6 tubos de ensaio. Verificou-se que a cinetina exerce influência na multiplicação *in vitro* de Ipê-roxo, sendo que a concentração de 8,0 µmol.L⁻¹ apresentou melhores resultados.

Palavras-chaves: Ipê-roxo, cerrado, revegetação, citocinina

INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é caracterizado por apresentar grande biodiversidade vegetal, sendo muitas espécies endêmicas o que o torna uma das savanas mais ricas do mundo (MYERS et al., 2000). Entretanto, esse elevado grau de endemismo está ameaçado de extinção (*Hot Spots*) (MITTERMEIER et al., 2005). Atualmente cerca de metade dos 2 milhões de km² originais desse bioma foram ocupados por pastagens cultivadas, culturas anuais e outros tipos de uso antrópico (KLINK & MACHADO, 2005).

Dentre essas espécies ameaçadas destacam-se as do gênero *Handroanthus* por apresentarem propriedades medicinais e ampla utilização como planta ornamental (MACHADO et al, 2002). As espécies de *Handroanthus* spp produzem metabólitos secundários com propriedades farmacológicas com ação antiinflamatória, analgésica, antibiótica e anti-neoplásica (ARAÚJO et al, 2002). A viabilidade de suas sementes é reduzida com o decorrer do tempo, o que dificulta o estabelecimento de técnicas de cultivo, visando à produção de mudas (CABRAL et al, 2003).

O cultivo *in vitro*, por meio da micropropagação, é um método viável para multiplicação de diversas espécies nativas, proporcionando a formação de populações de plantas homogêneas, possibilitando a produção de mudas com alta sanidade e vigor (SOUZA et al, 2007). Essa técnica oferece várias vantagens, dentre elas a multiplicação de clones, propagação de espécies de interesse econômico, além de poder atuar na preservação de florestas e recuperação de áreas degradadas

¹ Graduando de Biotecnologia, ICN/Unifal-MG, wesleypfm@hotmail.com

² Professor Adjunto, ICN/Unifal-MG, brenors@yahoo.com.br

³ Mestrando em Agricultura Tropical; DCAB/UFES, jprmartins@yahoo.com.br

⁴ Professor Adjunto, ICN/Unifal-MG, sandro@unifal-mg.edu.br

⁵ Professor Adjunto, ICE/Unifal-MG, luizbeijo@yahoo.com.br

⁶ Professor Adjunto, DQI/UFLA, Luciano@dqi.ufla.br

(NEHRA et al, 2005) que consiste em uma ação de grande importância ambiental e socioeconômica tornando-se necessária em consequência do mau uso dos recursos naturais (SOUZA & ALVES, 2003).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da cinetina durante a fase de multiplicação *in vitro* de Ipê-roxo para a obtenção de um maior número de plantas viáveis e de boa qualidade em um menor intervalo de tempo, para que as mudas possam ser utilizadas em futuros programas de revegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi executado no Laboratório de Biotecnologia e Genética Vegetal da Universidade Federal de Alfenas. Para o estabelecimento *in vitro* utilizou-se como explantes embriões extraídos de sementes de Ipê-roxo coletadas no município de Alfenas-MG. A assepsia dos embriões foi realizada utilizando hipoclorito de sódio 1% (v/v) de cloro ativo por 10 minutos e lavados com água destilada autoclavada por três vezes para remoção do excesso da solução desinfestante. Após a desinfestação, os explantes foram inoculados em frascos de 600 ml contendo 30 ml de meio de cultura *Woody Plant Medium* (WPM), (LLOYD & MCCOWN, 1981) com 50% da concentração original e suplementado com 15g.L⁻¹ de sacarose, 6g.L⁻¹ de ágar e 1g.L⁻¹ de carvão ativado. O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar e o material vegetal mantido em sala de crescimento a 25±2°C, irradiância de 35 µmol m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas, até a execução do procedimento experimental.

Segmentos nodais de 1 cm foram extraídos dessas plantas matrizes previamente estabelecidas *in vitro* após 60 dias de cultivo e utilizados como explantes. Esses foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM suplementado com 10mg.L⁻¹ de ácido cítrico, 20g.L⁻¹ de sacarose e diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µmol.L⁻¹) do regulador de crescimento cinetina (KIN), sendo o tratamento controle a ausência do regulador, totalizando 6 tratamentos. O meio foi solidificado com 6g.L⁻¹ de ágar e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Após inoculação em câmara de fluxo laminar, o material foi mantido em sala de crescimento a 25±2°C, irradiância de 35 µmol m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 12 horas.

Análise Estatística

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação e as variáveis analisadas foram: número médio de brotos, gemas e folhas por explante e comprimento médio do maior broto. O delineamento experimental empregado foi em blocos casualizados (dias) composto de 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 6 tubos de ensaio, totalizando 24 explantes por tratamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas com auxílio do programa Sisvar (FERREIRA, 1999) utilizando regressão linear e o teste de Scott-knott.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se por meio dos resultados que as diferentes concentrações de cinetina influenciaram significativamente (p<0,05) apenas para o número médio de brotos e gemas, sendo o comprimento médio do maior broto e número médio de folhas estatisticamente iguais. De acordo com Brondani et al. (2009) os principais fatores que influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro* estão relacionados ao tipo de citocinina e a concentração empregada auxiliando na indução de brotações e proliferação de gemas axilares (RADMANN et al, 2009; VILLA et al, 2006).

Dentre as concentrações de cinetina utilizadas, observou-se que a de 8,0 µmol.L⁻¹ apresentou melhor resposta para aumento no número médio de brotos em explantes de Ipê-roxo. Entretanto, por meio da derivação da curva (Figura 1), pode-se observar que a concentração de 6,5 µmol.L⁻¹ seria a mais indicada para a produção de um maior número médio de brotações (4,73).

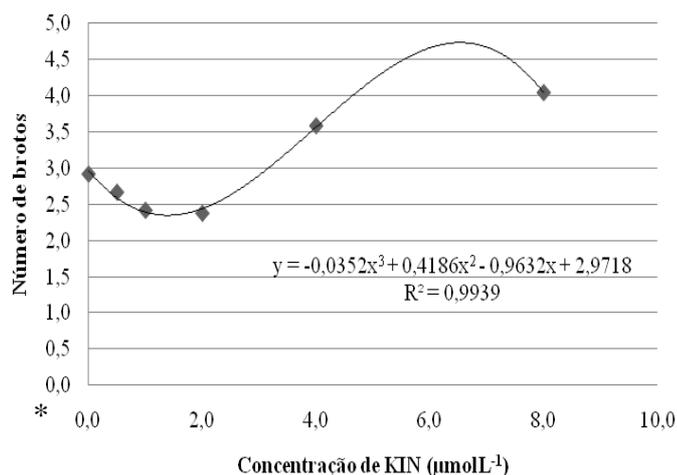


Figura 1 - Número de brotos em função da concentração de cinetina. UNIFAL-MG, Alfenas, 2010.
 *Tratamento controle.

O número de brotos pode estar atribuído ao estímulo à divisão celular causada pelo seccionamento de regiões meristemáticas que possuem alta capacidade mitótica, contribuindo assim com o desenvolvimento de gemas adventícias (FRÁGUAS et al, 2009). Chagas et al. (2004) afirmam que a indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por uma concentração adequada e balanceada de reguladores de crescimento adicionada ao meio.

O maior número médio de gemas também foi verificado quando foi utilizado 8,0 µmol.L⁻¹ de cinetina no meio de cultura, o qual obteve média de 10,83 gemas por explante. As outras concentrações apresentaram resultados inferiores a 9,87 gemas (Tabela 1).

Tabela 1 - Número médio de gemas em função da concentração de cinetina suplementada no meio de cultivo. Alfenas, UNIFAL-MG, 2010.

Concentração de KIN (µmol.L ⁻¹)	Número de gemas*
controle	8.374 b
0,5	9.875 a
1,0	7.333 b
2,0	7.583 b
4,0	8.791 b
8,0	10.833 a

*Teste de Scott-Knott com significância de 5%, médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

De acordo com Pérez-Tornero et al. (2000) a utilização de uma fonte de citocinina no meio de multiplicação é indispensável para promover a superação da dominância apical do explante e induzir à proliferação de gemas axilares. Erig & Schuch (2005) afirmaram que a partir do número de gemas por broto pode-se determinar a taxa de multiplicação, e assim obter maior número de mudas em tempo reduzido.

Observou-se que o comprimento médio da maior brotação e número médio de folhas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos empregados. As maiores médias obtidas para ambas as variáveis foram averiguadas quando o meio de cultivo foi suplementado com 0,5 µmol.L⁻¹ de cinetina e as menores com 1,0 µmol.L⁻¹ do mesmo fitorregulador (Tabela 2).

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

Tabela 2 - Comprimento do maior broto e número de folhas a partir de diferentes concentrações de cinetina. UNIFAL-MG, Alfenas, 2010.

Concentração de cinetina (μmolL^{-1})	Comprimento do maior broto (cm)*	Número de folhas*
controle	3,46a	6,77a
0,5	3,98a	8,17a
1,0	2,69a	5,25a
2,0	3,10a	5,67a
4,0	3,22a	6,00a
8,0	3,72a	7,67a

*Significância de 5%, médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si.

As citocininas estimulam o crescimento pela expansão celular mais do que pelo alongamento, induzindo o desenvolvimento de partes aéreas pelo aumento na produção de gemas e folhas. Entretanto, de acordo com a literatura (STOYNOVA et al, 2004; TORRES et al, 1998) concentrações mais elevadas que a considerada ótima deste regulador podem atuar inibindo esses efeitos, o que prejudica a multiplicação e o crescimento da espécie.

Foi observada em todos os tratamentos a formação de calos na base dos explantes. Para Bassan et al. (2006) a formação de calos na base do explante é muito comum em espécies lenhosas, sendo considerada desfavorável na micropropagação. Erig & Schuch (2005) também relataram que a formação de calo na zona de enraizamento é indesejável, pois ela pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular com a planta. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a rizogênese das brotações não foi prejudicada com a ocorrência de calos, pois foi verificada a indução direta de raízes na base das brotações de alguns explantes.

CONCLUSÃO

A concentração $8,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cinetina promoveu a indução de um maior número médio de brotações e gemas por explante de Ipê-roxo, o que pode ser útil para a multiplicação dessa espécie e utilização de mudas em programas de recuperação de áreas degradadas do Cerrado.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Recife, 2002.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de Canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Vol. 16, No. 4, pp. 381-390, 2006.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.33, n.1, p.11-19, 2009.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 609-617, 2003.

CHAGAS, E. A.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, E. F. da; PASQUAL, M; MENDONÇA, V. Multiplicação *in vitro* de crisântemo cv. white polaris. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 123-126, jan-mar, 2004.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

ERIG, A. C. & SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de Framboesira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum' **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 3, p. 488-490, Dezembro 2005.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.

FRÁGUAS, C. B.; DORNELLES, C. M. V.; LIMA, G. P. P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1682-1687, set, 2009.

KLINK, C.; MACHADO, R. B. A Conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v.1, n.1, Julho, 2005.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v.30, p.421-327, 1981.

MACHADO, C. F.; OLIVEIRA, J. A.; DAVIDE, A. C.; GUIMARÃES, R. M. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson). **Cerne**, v.8, n.2, p.18 - 27, 2002.

MITTERMEIER, R. A.; ROBLES, P.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J. & FONSECA, G. B. Hotspots Revisited: **Earth's Biologically Richest And Most Endangered Ecoregions**. Conservação Internacional/CI, Agrupación Sierra Madre, 392 p, 2005.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G.A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NEHRA, N. S. *et al.*, Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.41, p.701 - 717, 2005.

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 133-141, 2000.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P.; FACHINELO, J. C Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p. 656-663, Setembro 2009.

SOUZA, J. A.; DONINI, L. P.; SILVA, L. C.; CORRÊA, M. G. S.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira -M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agraria**, v.8, n.2, p.161-164, 2007.

SOUZA, Z. M. & ALVES, M. C. Movimento de água e resistência à penetração em um Latosso Vermelho distrófico de cerrado, sob diferentes usos e manejos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n 1. p. 18-23, 2003.

STOYNOVA, B. E.; KARANOV, E.; PETROV, P. & HALL, M.A. Cell division and cell expansion in cotyledons of Arabidopsis seedlings. **New Physiologist**, v.162, p.471, 2004.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Volume I. Embrapa/Brasília.509p. 1998.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G. S.; MIYATA, L. Y. Multiplicação *in vitro* de Amoreira-preta 'Cherokee': Efeito de meios de cultura, Cinetina e GA₃. **Revista Ceres**, Viçosa-MG, 53 (307): 357-362, 2006.