

Enraizamento *in vitro* de brotações obtidas a partir de segmentos nodais de Moreira (*Maclura tinctoria*)

In vitro root formation in shoots obtained from nodal segments of *Maclura tinctoria*

Guilherme Augusto Canella Gomes ⁽¹⁾
Renato Paiva ⁽²⁾

Resumo. Visando a indução do enraizamento de brotações obtidas a partir de segmentos nodais, estes foram inoculados *in vitro* em meio WPM 50%, suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e acrescido das diferentes combinações entre o regulador de crescimento AIB (0; 1; 2; 4; 6 mg.L⁻¹) e o antioxidante carvão ativado (0; 0,5; 1; 2; 4; 6 g.L⁻¹). Para verificar a influência do pH sobre o enraizamento, três faixas diferentes de pH (5,4; 6,0; 7,0) foram testadas. Após terem sido inoculados em câmara de fluxo laminar, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob intensidade luminosa de 13 µmol.s⁻¹.m⁻² a uma temperatura de 24 ± 2°C durante 30 dias. O número máximo de raízes formadas (27 raízes/explante), segundo o modelo matemático utilizado, pode ser obtido utilizando-se meio WPM com pH ajustado para 7,0 e acrescido de 4,8 mg.L⁻¹ de AIB e 4,7 g.L⁻¹ de carvão ativado.

Palavras-chave: Moreira; enraizamento *in vitro*; cultura de tecidos.

⁽¹⁾ Docente do IFSP campus São Roque; Correspondência: Rod. Prof. Quintino de Lima, 2.100, São Roque, SP, CEP 18136-540; e-mail: guilhermecanella@ig.com.br

⁽²⁾ Professor Adjunto da Universidade Federal de Lavras.

Recebido em: 30 ago. 2013

Aceito em: 10 out. 2013

Publicado em: 29 jan. 2014

Abstract. With the objective to induce the formation of roots, shoots obtained from nodal segments were inoculated in 50% WPM medium supplemented with 3% sucrose, 0.65% agar and different combinations of the growth regulator IBA (0; 1.0; 2.0; 4.0, and 6.0 mg.L⁻¹) and activated charcoal (0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0, and 6.0 g.L⁻¹). In order to verify the influence of pH on rooting, three levels of pH (5.4; 6.0, and 7.0) were tested. After inoculation, the explants were maintained in a

growth room with light intensity of 13 µmol.s⁻¹.m⁻² and temperature of 24 ± 2°C during 30 days. According to the mathematical model used, maximum number of formed roots (27 roots/explant) can be obtained using 50% WPM medium with pH adjusted to 7.0, and supplemented with 4.8 mg.L⁻¹ IBA + 4.7 g.L⁻¹ activated charcoal.

Keywords: *Maclura tinctoria*; *in vitro* rooting; tissue culture.

1 Introdução

A fase final da micropropagação é a indução de formação de raízes em brotações obtidas *in vitro*.

O processo de enraizamento, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é fortemente influenciado por fatores ambientais e químicos, os quais necessitam ser otimizados para favorecer uma maior formação de raízes. O sucesso desta etapa garante a sobrevivência da plântula *in vitro*.

O objetivo deste estudo foi induzir o enraizamento de brotações obtidas *in vitro* a partir de segmentos nodais de Moreira, *Maclura tinctoria*.

2 Material e métodos

Brotações obtidas a partir de segmentos nodais, com aproximadamente 2cm de comprimento, foram transferidas para meio WPM 50%, o qual foi suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e acrescido das combinações entre o regulador de crescimento AIB (0; 1; 2; 4; 6 mg.L⁻¹) e o antioxidante carvão ativado (0; 0,5; 1; 2; 4; 6 g.L⁻¹).

O pH do meio de cultura foi ajustado antes da autoclavagem em três faixas diferentes: 5,4; 6,0 e 7,0. Após o ajuste de pH, os meios de cultura foram autoclavados por 15 minutos a 120°C.

Após sua inoculação em câmara de fluxo laminar, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob intensidade luminosa de 13 µmol.s⁻¹.m⁻² a uma temperatura de 24 ± 2°C durante 30 dias; após esse período, foi avaliado o número de raízes por brotação.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo que cada frasco continha um explante.

O número de raízes obtidas por brotação foi considerado como tendo distribuição Poisson (não normal), e assim optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares generalizados (DEMÉTRIO, 1993). A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se na qualidade do ajustamento e, se possível, na ausência de significância dos desvios de regressão. A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de "Deviance" (DEMÉTRIO, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo.

Para a disposição gráfica do modelo linear de regressão, levou-se em conta que:

$$f(x) = \exp\{\alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_2^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_2^2\}$$

Nesta expressão, $f(x)$ é o modelo de regressão ajustado, que é função de X_1 (concentração de AIB) e de X_2 (concentração de carvão ativado).

Todas as linhagens fúngicas foram isoladas de diferentes fontes naturais como solo, madeiras, cascas e folhas de árvores. Foram isoladas e testadas 30 linhagens fúngicas, pertencentes ao laboratório de Bioquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus São Roque. As linhagens fúngicas foram conservadas em tubos de ensaio com meio de ágar de batata dextrosado (PDA), inclinados a 4°C.

3 Resultados e discussão

Os resultados indicam que não foi observada a formação de raízes em explantes inoculados na ausência de carvão ativado. Moncousin (1986a) afirma que a maioria das espécies lenhosas necessita, durante seu processo de enraizamento, da atuação de compostos antioxidantes, como carvão ativado, para minimizar os efeitos maléficos dos compostos fenólicos presentes em grande quantidade.

Nos tratamentos desprovidos apenas de auxinas, também não foi observada rizogênese, contradizendo o proposto por Druart (1982), o qual afirma que apenas a ausência de luz seria suficiente para a indução do enraizamento.

A formação de raízes adventícias só foi observada em explantes inoculados em meio de cultura contendo a combinação entre auxina e carvão ativado.

De acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado, o número máximo de raízes (27 por explantes) é obtido utilizando-se $4,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB associado a $4,7 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado (Fig. 1). O mesmo pode ser observado por meio do diagrama de contornos (Fig. 2).

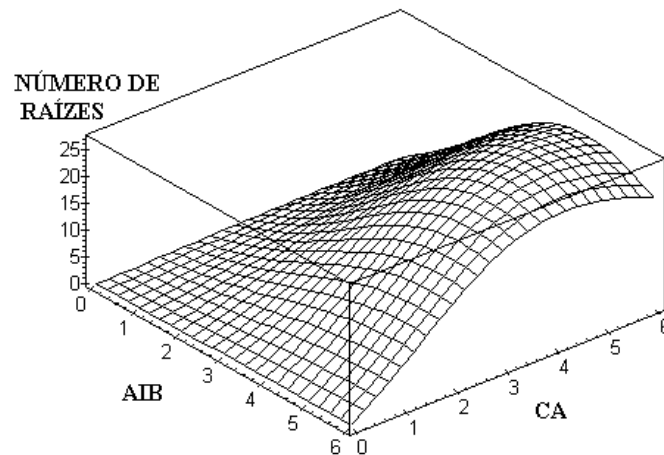


Figura 1. Análise de Superfície de resposta para número de raízes formadas *in vitro* a partir de brotações em função de diferentes concentrações de AIB (mg.L^{-1}) e Carvão Ativado (g.L^{-1}).

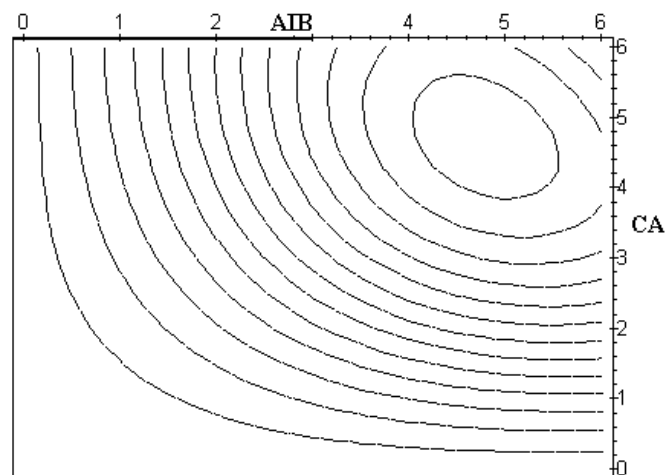


Figura 2. Diagrama de contornos correspondente à formação de raízes *in vitro* a partir de brotações de Moreira (*Maclura tinctoria*) em função de diferentes concentrações de AIB (mg.L^{-1}) e Carvão Ativado (g.L^{-1}).
Ponto de máximo: AIB = $4,80$ e CA = $4,70$.

O aspecto geral das raízes formadas a partir de brotações inoculadas em meio WPM a-crescido de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB e $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ de CA é demonstrado na Fig. 3.



Figura 3. Brotações de Moreira (*Maclura tinctoria*) enraizadas *in vitro*.

Segundo a análise de "Deviance" (Tab. 1), não foi possível encontrar um modelo de regressão múltipla com desvios não significativos. Entretanto, ficou evidente a alta qualidade do ajustamento considerando-se a magnitude relativa das "Deviances". Calculando-se uma estatística semelhante ao coeficiente de determinação, a razão da "Deviance" de regressão pela de tratamentos, obtém-se um alto valor (93,98%).

Tabela 1. Quadro de análise de "Deviance" para o número de raízes adventícias formadas.

Causas de variação	GL	"Deviance"
Tratamentos	(29)	2801,2679**
Regressão	8	2632,6681**
Desvios	21	168,5998**
Resíduo	270	681,0686

**significativo a 1% de probabilidade pelo teste de qui-quadrado.

A atividade estimulatória do carvão ativado em induzir o enraizamento de brotações também foi reportada por Dumas e Monteuis (1995), em estudos com *Pinus pinaster*. Sanchez e Vilitez (1996) também induziram o enraizamento em brotações de *Quercus robur* e *Quercus rubra* utilizando os efeitos positivos do carvão ativado em conjunto com a auxina AIB.



Figura 4. Aspecto visual de brotações de Moreira (*Maclura tinctoria*) inoculadas em meio WPM ajustado em diferentes faixas de pH. A) pH=7,0; B) pH=6,0; C) pH=5,4.

A indução de rizogênese foi altamente influenciada pelo pH do meio de cultura. A formação de raízes adventícias (Fig. 4) só foi observada em meio de cultura cujo pH foi ajustado para 7,0. Segundo McCown (1988), nesta faixa de pH não ocorre redução da atividade das peroxidases, favorecendo o enraizamento do explante.

4 Considerações finais

Foi possível induzir o enraizamento *in vitro* de brotações de Moreira (*Maclura tinctoria*) na presença de AIB e carvão ativado.

Para a obtenção do enraizamento *in vitro* de brotações de Moreira (*Maclura tinctoria*), deve-se utilizar meio WPM com pH ajustado para 7,0 antes da autoclavagem, acrescido de 4,8 mg.L⁻¹ de AIB e 4,7 g.L⁻¹ de Carvão Ativado.

Referências

- BARLASS, M.; GRANT, W. J. R.; SKENE, K. G. M. Shoot regeneration *in vitro* from native Australian fruit-bearing trees: quandong and plum bush. *Australian Journal Botanic*, v.28, p.405-411, 1980.
- BERTHON, J. Y.; BOYER, N.; GASPAR T. Sequential rooting media and rooting capacity of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. Peroxidase activity as a marker. *Plant Cell Report*, v.6, p.341-344, 1987.
- BOUILLENNE, R.; BOUILLENNE-WALRAND, M. Auxines et bouturage. *Annual Reports*. 14th Horticultural Congress Schweninger, v.1, p.231-238, 1955.
- COLLET, G. F.; LE, L. C. Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. L'Enracinement *in vitro* de *Pirus malus* L. (M25, 26, 27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. (a). *HortiScience*, v.20 (2), p.131-138, 1988.
- DEMÉTRIO, C. G. B. Modelos Lineares na Experimentação Agronômica. *Anais e Resumos*. V Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agronômica. S.I., 1993.
- DRUART, P.; KEVERS, C.; BOXUS, P.; GASPAR, T. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *Pflanzenphysiology*, v.108, p.429-436, 1982.
- DUMAS, E.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue. Organ and Culture*, v.40, p.231-235, 1995.
- FERREIRA, C. M.; HANDRO, W. Micropropagation of *Stevia rebandiana* through leaf explants from adult plants. *Planta Medicinal*, v.54, p.157-162, 1988.
- GASPAR, T.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. *A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants*. Univ. Genève: Cent Bot, 1982.

GASPAR, T.; SMITH, D.; THORPE, T. A. Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des premières de la rhizogenèse. *Comptes Rendus Academic Paris*, v.185, p.327-330, 1977.

HESS, C. E. A physiological analysis of root initiation in easy and difficult-to root cuttings. *Annual Reports*. 16th Int Hortic Congr Brussels, 4, p.375-381, 1962.

JARVIS, B. C.; ALI, A. H. N.; SHAHEED, A. I. Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings. *New Phytology*, v.95, p.509-518, 1983.

KANTHARAJ, G. R.; MAHADEVAN, S.; PADMANABAN, G. Early biochemical events during adventitious root initiation in the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, v.18, p.383-387, 1979.

KULESCHA, Z. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les végétaux. *Rev Gén Bot.*, v.59, p.92-111; 127-157; 195-208; 241-264, 1986.

LEWIS, D. H. Are there inter-relations between the metabolic role of boron, synthesis of phenolic phytoalexins and the germination of pollen? *New Phytology*, 84, 261-270, 1980.

LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience*, v.15, p.416 (abst. 321), 1980.

LOBARZEWSKI, J. Peroxidase role in lignin biotransformation. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Univ Genève: s.ed., 1986.

MASCARENHAS, A. F.; GUPTS, P. K.; KULKARNI, V. M.; MEHTA, V.; IYER, R. S.; KHUSPE, S. S. JAGANNATHAN, V. *Propagation of trees by tissue culture*. S.l.: s.ed., 1982.

MATO, M. C.; RUA, M. L.; FERRO, E. Change in levels of peroxidases and phenolics during root formation in *Vitis* cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, v.72, p.84-88, 1988.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. *The germination of seeds*. Londres: Pergamon Press, 1978.

Mc. CLELLAND, M. T.; SMITH, M. A. L. Vessel type, closure and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience*, v.25, p.797-800, 1990.

McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. M.; HAISSIG, B. H.; SANKLA, N. (Eds.). *Adventitious Formation in Cuttings*. Portland, Oregon, EUA: Discorides Press, 1988.

MONCOUSIN, C. *Biochemical events in mono-nodal stem cuttings of Vitis hybrid during in vitro adventitious rooting*. Minneapolis: IAPTC Congr., 1986a.

_____. Contribution à la caractérisation biochimique et physiologique de la phase juvénile de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) au cours de sa multiplication végétative et accélérée en culture *in vitro*. Thèse (Doct Ingénieur), Univ Paris-Sud, Cent Sci d'Orsay, 237p., 1982.

_____. Evolution de l'ÁIA, des composés phénoloques, de l'activité spécifique des peroxydases et de la production d'éthylène, au cours de la rhizogenèse, sur des microbou-

tures de Vigne (*Vitis riparia* Michx. x *V. rupestris* Scheele). Thèse (Doct d'Etat), Biol Physiol végétale. Univ Nancy, 164p., 1987.

_____. Evolution du contenu auxinique endogène au cours de l'enracinement in vitro de boutures de *Malus*. *Cilloq arbres fruitiers et Biotechnol*, Moët-hennessy, Paris, p. 61, 1986c.

_____. Peroxidase as a marker for rooting improvement of clones of *Vitis* cultured in vitro. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Genebra: Univ Genève, 1986b.

_____. Peroxidase as a tracer for rooting improvement and expressing rejuvenation during *in vitro* multiplication of *Cynara cardunculus scolymus* L. S.l.: s.ed., p.147-148, 1991.

MOSELLA-CHANCEL, L.; MACHEIX, J. J.; JONARD, R. Les conditions du microbouturage in vitro du pêcher (*Prunis persica* Batsch.): influences combinées de certaines substances de croissance et de divers composés phénologiques. *Physiologie Végétale*, v.18, p.597-608, 1980.

NEMETH, G. Induction of rooting. In: BAJAJ, Y. P. S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry trees*. Springer: Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo: 1986.

QUOIRIN, M.; BOXUS, P.; GASPAR, T. Root initiation and isoperoxidasas of stem tip cuttings from mature *Prunus* Plants. *Physiologie Végétale*, v.12, p.165-174, 1974.

SANCHEZ, M. C.; VILITEZ, A. M. Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology*, v.16, p.673-680, 1996.

SHARMA, A. K.; PRASAD, R. N.; CHATURVEDI, H.C. Clonal propagation of *Boungainvillea glabra magnifica* through shoot apex culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.1, p.33-38, 1981.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposium Society Biology*, v.11, p.118-131, 1957.

WILLIAMS, R. R.; TAJI, A. A.; BOLTON, J. A. *In vitro* propagation of *Dampiera diversifolia* and *Prostanthera rotundifolia*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.3, p.273-281, 1984.

Como citar este artigo

GOMES, G. A. C.; PAIVA, R. Enraizamento *in vitro* de brotações obtidas a partir de segmentos nodais de Moreira (*Maclura tinctoria*). *Scientia Vitae*, vol. 1, n. 3, ano 1, jan. 2014, p. 3-9. Disponível em: <www.revistaifsp.com/>; acesso em: __/__/__.