



MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE IPÊ-AMARELO (*Handroanthus chrysotrichus*)

Mariane de Oliveira PEREIRA¹, Marcio Carlos NAVROSKI^{2*}, Lia Rejane Silveira REINIGER³

¹Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Departamento de Engenharia Florestal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brasil.

³Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

*E-mail: marcio.navroski@udesc.br

Recebido em agosto/2014; Aceito em dezembro/2015.

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). Segmentos nodais de plântulas obtidas da germinação *in vitro* de sementes foram utilizados como fonte de explantes, sendo inoculados em meio nutritivo ½ WPM contendo diferentes concentrações de BAP (0, 2, 4, 8 e 16 µM). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo cinco tratamentos e 10 repetições, cada uma composta por um frasco contendo dois segmentos nodais. Após 30 dias de cultivo avaliaram-se a porcentagem de estabelecimento (desenvolvimento de novos primórdios foliares), formação de calos na base do explante, enraizamento e número de brotações por explante. A presença de BAP no meio nutritivo não é benéfica à multiplicação *in vitro* das plântulas de ipê-amarelo. A adição do BAP diminuiu a porcentagem de explantes estabelecidos, o enraizamento e, também, a formação de brotações, além de aumentar, consideravelmente, a formação de calos.

Palavra-chave: *Handroanthus chrysotrichus*, espécie florestal nativa, micropropagação, meio de cultura.

IN VITRO MULTIPLICATION OF IPÊ-AMARELO (*Handroanthus chrysotrichus*)

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the *in vitro* multiplication of ipê-amarelo tree in different 6-benzylaminopurine (BAP) concentrations. Nodal segments of seedlings obtained from the *in vitro* seeds germination were used as explants source being inoculated in nutrient broth ½ WPM containing different concentrations of BAP (0, 2, 4, 8 and 16 µM). The experiment was conducted in a completely randomized design with five treatments and 10 replications, each consisting of a vial containing two nodal segments. After 30 days of cultivation assessed the establishment percentage (development of new leaf primordia), callus formation at the explant base, rooting and number of shoots per explant. The BAP presence in the nutrient medium is not beneficial to the *in vitro* multiplication of ipê-amarelo tree seedlings. The BAP addition decreases the explants established percentage, rooting, and also the shoots formation, in addition to considerably increase in the calluses formation.

Keywords: *Handroanthus chrysotrichus*; native forestry species; micropropagation; culture medium.

1. INTRODUÇÃO

O ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus* Mart. ex A. DC. Mattos), é comumente utilizada na arborização urbana e em projetos paisagísticos, principalmente em função da beleza de suas flores e seu porte mediano. Sua madeira é moderadamente pesada, resistente e de grande durabilidade, o que faz com que a espécie produza madeira considerada “de lei”. Pode ser utilizada em reflorestamento de áreas degradadas, matas ciliares e demais áreas de preservação permanente, além de plantios homogêneos para produção de madeira (LORENZI, 1992).

A crescente demanda por mudas de espécies lenhosas observada nos últimos anos mostra a necessidade do desenvolvimento de protocolos que otimizem a produção de mudas com qualidade morfofisiológica, capazes de

atender às necessidades dos plantios (LELES et al., 2006). A propagação do ipê-amarelo é feita normalmente por meio de sementes que, apesar de produzidas em grande quantidade, podem apresentar problemas de germinação e conservação, prejudicando a produção de mudas de qualidade (OLIVEIRA et al., 2005).

Em ipê-amarelo não são conhecidos muitos trabalhos envolvendo a seleção de indivíduos superior para o uso futuro em programas de melhoramento genético ou seleção clonal, restringindo-se somente ao trabalho de Costa et al. (2007) com teste de progênies. Em relação à propagação vegetativa com estaquia não são encontrados trabalhos com a espécie. Dessa forma, a propagação *in vitro* pode constituir uma alternativa adequada em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies florestais nativas, pois eleva a taxa de multiplicação e

acelera os programas de propagação clonal, fato que possibilita a propagação vegetativa de genótipos de alto valor comercial e de difícil enraizamento (OLIVEIRA et al., 2013). Para muitas espécies florestais de importância econômica ou que se encontram em extinção, a micropropagação tem sido uma ferramenta importante para a obtenção de mudas mais uniformes em larga escala, em tempo e espaço físico reduzido. Entretanto, são escassos os relatos na literatura sobre a micropropagação do ipê-amarelo (RIBAS et al., 2005).

A bibliografia sobre a propagação *in vitro* de *Handroanthus* e *Tabebuia* é limitado a estudos específicos de determinadas espécies. A germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich e um protocolo de indução de brotações adventícias de *Tabebuia donnell-smithii* foram publicados por Dousseau et al. (2008). Além disso, a micropropagação *ex vitro* de *Tabebuia rosea* Bertol DC (SUAREZ et al., 2006) e o uso de tecidos foliares *in vitro* de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (CARAVITA-ABBADE et al., 2009). Por consequência, qualquer melhoria no protocolo de cultivo *in vitro* em *Handroanthus chrysotrichus* irá fornecer informações para programas de conservação e propagação em massa de espécies do gênero *Handroanthus*.

Na micropropagação, o sucesso de um protocolo depende de todas as fases, iniciando pela fase de estabelecimento *in vitro*, multiplicação, alongamento (pode não ser necessária), enraizamento e aclimatização. Fatores como o genótipo, o estado fisiológico da planta-matriz, a forma de seleção, a coleta e o tipo de explante, a assepsia que será utilizada, o meio de cultura e concentrações e tipos de reguladores de vegetais influenciam o sucesso da micropropagação (GEORGE; DEBERGH, 2008).

A obtenção de uma alta taxa de multiplicação com o mínimo de variação no material, de explantes livres de contaminantes que prejudiquem a micropropagação e de gemas reativas que produzam partes aéreas com qualidade suficiente para a fase seguinte são os principais objetivos da multiplicação na micropropagação. Desta forma, devem ser observadas nas gemas formadas as questões de qualidade e quantidade. De modo geral, o sucesso da fase de multiplicação é dependente da fase de estabelecimento e determinará o sucesso das fases subsequentes (XAVIER et al., 2009).

Para a obtenção de altas taxas de multiplicação no cultivo *in vitro* as citocininas têm função primordial. Essa classe de regulador de crescimento atua principalmente na divisão celular e também na quebra da dominância apical, além de influenciar a indução e crescimento das brotações (PREECE, 1995). O tipo de citocinina e a sua concentração são fatores que tem grande influência no sucesso da multiplicação *in vitro* (SCHUCH; ERIG, 2005). A utilização de uma fonte de citocinina no meio de multiplicação é indispensável para promover a quebra da dominância apical do explante e induzir à proliferação de gemas axilares (PÉREZ-TORNERO et al., 2000), multiplicando a quantidade de material para o posterior alongamento e/ou enraizamento. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo sob concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

As sementes utilizadas na realização do ensaio foram adquiridas comercialmente, coletadas em 8 árvores matrizes localizadas na região da Grande São Paulo (SP).

Inicialmente, as sementes foram submetidas a um pré-tratamento efetuado pela imersão de 100 g em solução contendo 1 g (p/v) de Benomyl® (Benzimidazol), durante 24 horas. Decorrido esse período, as sementes foram lavadas em água corrente durante 10 minutos e enxaguadas em água esterilizada. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas superficialmente com etanol a 70% (v/v) por 30 segundos e, após, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% (v/v) por 15 minutos, passando, então, por triplo enxágue em água estéril. A seguir, foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, e inoculadas em frascos de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio de cultura WPM, na metade da composição original de macro e micronutrientes, vitaminas, sacarose (30 g L⁻¹), ágar Sigma® (7 g L⁻¹), sendo o pH ajustado em 5,7. Após o ajuste do pH o meio de cultura foi autoclavado, por 15 minutos a 121°C (1,5 kgf cm⁻²). Em cada frasco foram colocadas quatro sementes.

2.2. Multiplicação *in vitro*

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, os segmentos nodais foram isolados das plântulas e inoculados em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio de cultura WPM, na metade da composição original de macro e micronutrientes (1/2 WPM), vitaminas, sacarose (30 g L⁻¹), ágar (6 g L⁻¹), sendo o pH ajustado em 5,7 e suplementado com 0,5 µM de ácido alfa-naftaleno acético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP), conforme o tratamento. Previamente, o meio de cultura foi autoclavado por 15 minutos a 121°C (1,5 kgf cm⁻²).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos compostos por: 0, 2, 4, 8 e 16 µM de BAP e 10 repetições, cada uma composta por um frasco contendo dois segmentos nodais introduzidos *in vitro*. As unidades experimentais foram cultivadas na sala de crescimento sob temperatura de 25 °C ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 20 µM m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Após 30 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis: porcentagem de estabelecimento (desenvolvimento de novos primórdios foliares), de formação de calos na base do explante, de enraizamento e número de brotos por explante.

2.3. Análise estatística

Quando não foram atendidos os pressupostos do modelo matemático os dados obtidos foram transformados para a função $\sqrt{(x + 0,5)}$, sendo “x” o valor observado, e, após, submetidos à análise de variância. Quando significativas, as médias foram submetidas à regressão polinomial ou a teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo para todas as variáveis analisadas na multiplicação do ipê-amarelo, à exceção da porcentagem de contaminação (Tabela 1). Para o estabelecimento houve um comportamento quadrático da curva, quanto maior a concentração de BAP menor o estabelecimento (Figura 1 A). Obteve-se o maior índice de estabelecimento (100%) com a ausência de BAP, por outro lado, com a maior concentração de BAP (16 μM) observou-se um índice de estabelecimento inferior a 50%. O aumento da concentração de BAP também foi prejudicial na multiplicação devido a uma maior formação de calos na base do explante (Figura 1 B). Sem a utilização da citocinina a formação de calos se manteve

em torno de 30%, já com a maior concentração utilizada verificou-se o aparecimento de calos em todos os explantes.

A formação de estruturas calogênicas prejudica o cultivo *in vitro* quando o objetivo é a propagação direta. A formação de calos na base do explante pode comprometer a proliferação de gemas axilares e o alongamento de brotações, afetando o desenvolvimento *in vitro*. O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto, quando há um excesso de um desses reguladores pode também haver a formação exagerada de calos (SANTOS et al., 2003).

Tabela 1. Resultados da análise de variância (quadrado médio) para estabelecimento (%), contaminação (%), formação de calos (%), enraizamento e nº de brotos de *Handroanthus chrysotrichus* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em concentrações de BAP.

FV	GL	Estabelecimento (%)	Contaminação (%)	Formação de calos (%)	Enraizamento (%)	Nº de brotos
BAP	4	4325,00*	500,00 ^{ns}	7425,00*	800,00*	2,04*
Resíduo	45	1083,33	955,55	922,22	133,33	0,49
Média	-	73,00	10,00	76,00	4,00	1,11
CV%	-	20,1	43,2	10,8	17,3	24,6

^{ns}F não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; * F significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

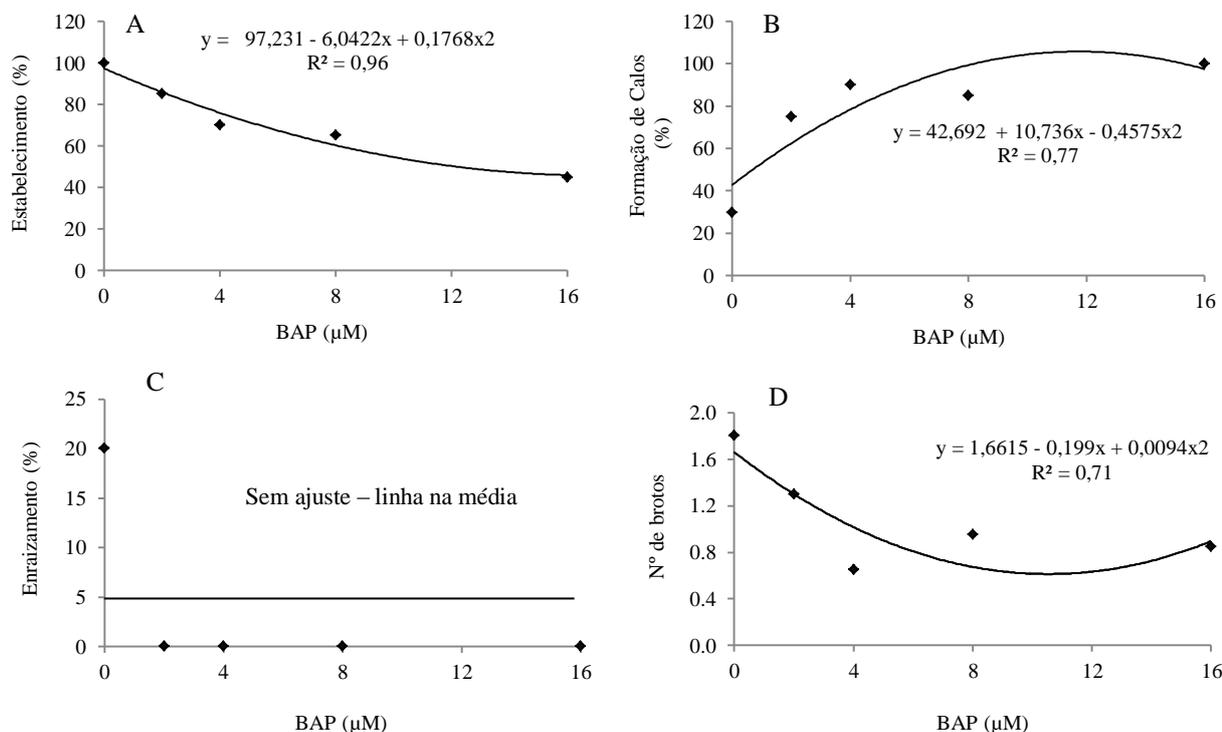


Figura 1. Porcentagem de estabelecimento (A), formação de calos (B), porcentagem de enraizamento (C) e número de brotos (D) em segmentos nodais de *Handroanthus chrysotrichus* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de BAP.

Valores semelhantes quanto à formação de calos foram obtidos por Martins et al. (2009) em ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*). A concentração de 4,4 μM de BAP promoveu a formação de calos na base dos explantes em 50% dos segmentos, aumentando para 66,6% na utilização de 35,56 μM . Este mesmo comportamento foi observado em segmentos nodais de faia (*Fagus grandifolia*), no qual foi observada maior formação de calos a partir de 2,22 μM de BAP (BARKER et al., 1997). Também foi observada a ocorrência de calos na base dos explantes ao induzir a formação de brotações em

mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), isso se deu com o aumento das concentrações de BAP no meio de cultura chegando a 90% na concentração de 17,78 μM de BAP (SOARES et al., 2007) resultado este, semelhante ao observado neste trabalho.

A ausência de BAP no meio nutritivo foi responsável pela única ocorrência de enraizamento dos explantes (Figura 1 C). Na presença de BAP, em todas as concentrações, os explantes não apresentaram qualquer formação radicular. Apesar de ocorrer em baixa escala (< 20%) o enraizamento no tratamento sem a adição do AIB

é uma resposta da presença da auxina (ANA), que induz a formação de raízes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Segundo Pasqual (2001) a rizogênese é geralmente inibida pela presença de citocinina que, utilizada na indução de brotações, pode afetar negativamente a indução e o alongamento dos primórdios radiculares. Entretanto, algumas espécies de plantas lenhosas não formam raízes adventícias, ou formas em baixa quantidade, devido à alta atividade de enzimas que inativam a auxina por degradação oxidativa ou pela falta de resposta do tecido à auxina acumulada (NORMANLY, 1997).

O número de brotos também apresentou um decréscimo com o aumento na concentração de BAP, apresentando um efeito quadrático na curva (Figura 1 D). A ausência de BAP foi responsável pela maior indução de brotações por explante. Na presença de citocinina, a concentração mais baixa de BAP utilizada (2 µM) apresenta em relação às demais, o maior número de brotos por explante. O número de brotos formados tende a estabilizar a partir do uso de 8 µM da citocinina, entretanto esse aumento na concentração acaba elevando a formação de calos, os quais são indesejáveis na propagação vegetativa direta.

As citocininas são indispensáveis para a indução da proliferação de gemas axilares, sendo o tipo de citocinina e sua concentração os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (BRONDANI et al., 2009). Entretanto, concentrações mais elevadas que a considerada ótima deste regulador podem atuar inibindo esses efeitos, o que prejudica a multiplicação e o crescimento da espécie (STOYNOVA et al., 2004), fato ocorrido neste estudo. Outro fator que pode ter ocasionado piores resultados na multiplicação com o uso de altas concentrações de BAP é o determinismo endógeno. Segundo Nogueira et al. (2007), o efeito conjunto da citocinina exógena presente no meio nutritivo e a endógena do explante podem causar um excesso dessa classe de fito hormônio, diminuindo a formação de brotos e aumentando os calos.

A toxidez causada pelo excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura, ou pelo prolongado período de tempo em que a cultura permanece exposta a eles, pode provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando na redução da taxa de multiplicação e no encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas e o processo de enraizamento (NARAYANASWAMY, 1977). Resultado semelhante foi obtido em estudo com ipê-roxo, no qual foi alcançada a maior formação de brotos na ausência da citocinina BAP. Neste caso a citocinina endógena foi suficiente para assegurar a maior formação de brotos por explante (1,2 brotos) (MARTINS et al., 2009). Estudo com fisalis (*Physalis peruviana* L.) também identificou maior número de brotações utilizando concentrações relativamente baixas de BAP (1,33 µM) (CHAVES et al., 2005).

É importante destacar que o material utilizado no experimento é jovem, com os tecidos altamente determinados para o crescimento celular. Pode-se utilizar esse protocolo para multiplicar plantas jovens buscando ampliar a quantidade de mudas produzidas. Para a multiplicação de material obtido de plantas adultas é

necessário um ajuste no protocolo para cada genótipo utilizado, idade das árvores e situações hormonais e fisiológicas específicas.

4. CONCLUSÕES

A presença de BAP no meio nutritivo não é benéfica à multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de plântulas de ipê-amarelo. A adição desta citocinina diminui o estabelecimento, o enraizamento e também a formação de brotos, além de aumentar consideravelmente a formação de calos.

5. REFERÊNCIAS

BARKER, M. J. et al. Micropropagation of juvenile and mature american beech. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.51, n.3, p.209-213, dez. 1997.

BRONDANI, G. E. et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.1, p.11-19, jan./fev. 2009.

CARAVITA-ABBADE, L. et al. Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo* Alba (Ridl.) Sand.) - Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.31, n.3, p.307-311, jul./set. 2009.

CHAVES, A. C. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.6, p.1281-1287, nov./dez. 2005.

COSTA, R. B. et al. Desenvolvimento inicial de progênies de ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex a. DC.) Standl.) no município de Campo Grande, MS, Brasil. **Ensaio e Ciência**, Valinhos, v.11, n.2, p.39-45, mar./abr. 2007.

DOUSSEAU, S. et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p.1694-1700, nov./dez. 2008.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. p.29-64.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. 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. p.183-260.

LELES, P. S. S. et al. Qualidade de mudas de quatro espécies florestais produzidas em diferentes tubetes. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.13, n.1, p.69-78, jan./mar. 2006.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368p.
- MARTINS, J. P. R. et al. Multiplicação *in vitro* de explantes de Ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9, 2009, São Lourenço, Minas Gerais. **Anais...** São Lourenço: SBE, 2009.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture.** Berlin: Springer Verlag, 1977. p.179-248.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.366-370, mar./abr. 2007.
- NORMANLY, J. Auxin metabolism. **Physiologia Plantarum**, Weinheim, v.100, n.3, p.431-442, jul. 1997.
- OLIVEIRA, L. M. et al. Temperatura e regime de luz na germinação de sementes de *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex A. P. de Candolle) Standley e *T. serratifolia* Vahl Nich. - Bignoniaceae. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.642-648, maio/jun. 2005.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.33, n.76, p.439-453, out./dez. 2013.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.
- PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n.2, p.133-141, nov. 2000.
- PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, n.1, v.1, p.26-37, jan./jun. 1995.
- RIBAS, L. L. F. et al. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.4, p.517-524, jul./ago. 2005.
- SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, E. Induction and biochemical analysis of callus obtained from leaf segments of *Coffea arabica* L., Cultivar Rubi. **Revista de Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.3, p.571-577, maio/jun. 2003.
- SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.155-173.
- SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.4, p.1048-053, jul./ago. 2007.
- SUAREZ, I. E. et al. Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rósea* Bertol DC). **Temas Agrarios**, v.11, n.2, p.52-62, jul./dez. 2006.
- STOYNOVA, B. E. et al. Cell division and cell expansion in cotyledons of *Arabidopsis* seedlings. **New Phytologist**, Lancaster, v.162, n.2, p.471-479, maio 2004.
- THORPE, T. A. et al. Application and micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.311-336.
- XAVIER, A. et al. **Silvicultura clonal:** princípios e técnicas. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272p.