

EFEITO DO pH, DE CONCENTRAÇÕES DE SAIS E DE ÁGAR NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart. GUTTIFERAE¹

José Eduardo Brasil Pereira Pinto²
Eduardo Fonseca Arelló³
Márcio Henrique Pereira Barbosa⁴

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart. Guttiferae é bastante comum nos cerrados de Minas Gerais e recebe os seguintes nomes: “pau-santo”, “folha-santa”, “pau-de-são-josé” e “gordinha”. Sua exploração é predominantemente extrativista e, aliada à expansão da fronteira agrícola nos cerrados, poderá causar o seu desaparecimento em muitas regiões, onde outrora era abundante.

A micropropagação é alternativa para a preservação de espécies se conseguir aumentar a taxa de multiplicação de plântulas *in vitro* e obter alta taxa de reestabelecimento *ex vitro*. ALDRUFEU *et alii* (1) observaram que as propriedades físicas do substrato usado durante a rizogênese *in vitro* determina o início, o crescimento e o número de raízes de plântulas de diversas espécies. LEIFERT *et alii* (7) mostraram que diferentes espécies de plantas (*Choisya*, *Daphne*, *Deplphinium*, *Hemerocallis*, *Hosta*,

¹ Aceito para publicação em 26.05.1994.

² Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras. Laboratório de Cultura de Tecidos. Cx. Postal 37. 37200-000 Lavras, MG.

³ Cooperativa Agropecuária Holambra. Cx. Postal 170. 13825-000 Jaquariúna, SP.

⁴ Estudante de doutorado em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras.

Iris e *Photinia*) tinham requerimento distinto em relação ao pH para ótimo crescimento e taxa de enraizamento. Experimentos têm mostrado diferentes efeitos da presença ou ausência de ágar ao meio, em termos de organogênese (3). O meio MS, de MURASHIGE e SKOOG (8), é o mais utilizado para a organogênese *in vitro*. De modo geral, LANE (5, 6) sugere que as diluições da formulação básica do MS, de 50%; 66,66%; ou 75%, são freqüentemente utilizadas para o enraizamento. Entretanto, algumas vezes os nutrientes salinos são necessários em concentrações mais elevadas para que ocorra rizogênese. Por outro lado, PIERIK e STEEGMANS (10) mostraram que os macroelementos não exercem influência sobre o enraizamento de microestacas de *Rhododendron*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta morfogênética *in vitro* das microbrotações de *Kielmeyera coriacea* submetidas a diferentes pHs, concentrações de sais do MS e de ágar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes secundários constituíram-se de segmentos nodais provenientes de brotações *in vitro*, sendo seccionados de modo que o comprimento ficasse em torno de 40 mm. Foram realizados dois experimentos independentes.

2.1. Avaliação de Diversas Concentrações de Sais e de Ágar no Meio

Foram avaliadas neste experimento as concentrações de sais e de ágar no meio de enraizamento. Reduziu-se a 0%; 66,66%; e 83,33% a concentração dos sais do meio básico de MURASHIGE e SKOOG (8). Os demais componentes do meio de cultura não tiveram suas concentrações modificadas, exceto o ágar, cujos níveis usados foram 0,0; 3,0; 6,0; e 9,0 g/L. Para o nível 0,0 g/L, isto é, na ausência de ágar, foi necessário usar um pequeno chumaço de algodão no fundo dos tubos de ensaio para evitar que as brotações submergissem no meio líquido. Adicionaram-se 4,0 mg/L de ácido indolbutírico (IBA) ao meio. O ensaio foi composto de 12 tratamentos e 36 parcelas em esquema fatorial de 3 x 4.

2.2. Efeito do pH e de Concentrações de Ágar no Meio

No segundo experimento foi testado o efeito do pH e de diversos níveis de ágar no meio de enraizamento. O pH do meio MS foi ajustado para 5,1; 5,4; 5,7; 6,0; e 6,3 e os níveis de ágar foram modificados para

0,0; 3,0; 6,0; e 9,0 g/L. O meio foi suplementado com 4,0 mg/L de IBA. Os demais componentes do meio MS não foram alterados. O esquema fatorial foi de 5 x 4, totalizando 20 tratamentos e 60 parcelas.

Em ambos os experimentos empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, e os dados coletados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se os níveis de significância de 1% e 5%, para o teste F. Para efeito de análise estatística, os dados foram transformados para $\sqrt{(x + 0,5)}$.

As brotações foram colocadas para se desenvolver em tubos de ensaio (25 x 150 mm) com 10 mL de meio de cultura. Os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento sob condições ambientais controladas, como fotoperíodo de 16/8 h luz e escuro, à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Após 45 dias de inoculação dos explantes secundários no meio de cultura, foram feitas avaliações levando em conta o número médio de raízes primárias, tamanho médio de raízes primárias (cm) e número médio de raízes secundárias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação de Diversas Concentrações dos Sais e de Ágar no Meio

O enraizamento *in vitro* de brotações micropropagadas de *K. coriacea* foi variável de acordo com a combinação de diversos níveis de ágar e diferentes concentrações dos sais utilizados no meio de cultura.

A ausência do ágar não trouxe benefício algum à indução e ao desenvolvimento do sistema radicular. No meio inteiramente líquido, as brotações de *K. coriacea* não emitiram raízes, independentemente do grau de salinidade do meio. Este fato não aconteceu nos outros tratamentos quando ágar foi adicionado ao meio. Há aparente necessidade de *K. coriacea* para meios densos no que diz respeito à rizosfera. O meio de cultura líquido pode estar provocando forte condição de anaerobismo, à qual ficaram expostas as partes basais das brotações, provocando forte desoxigenação letal à diferenciação de raízes. Apesar do oxigênio ser um gás de solubilidade difícil em água ou em meios nutritivos líquidos, a oxigenação ocorre com maior intensidade na interface entre o ar e o líquido, ou seja, na superfície deste. Ao contrário de muitas espécies vegetais citadas em literatura, *K. coriacea* não suporta este anaerobismo. Ocorreram casos em que os tecidos das brotações submersos no meio chegaram a necrosar e morrer. Um dos modos de se contornar essa acentuada desoxigenação é fazer com que o meio fique a maior parte do tempo possível sob condições

de agitação. Essa agitação faz com que ocorra maior transferência de oxigênio no meio de cultura, na medida em que provoca aumento da superfície de interface ar-líquido e melhoria na distribuição de oxigênio recém-solubilizado. O meio líquido nutritivo empregado neste experimento foi totalmente estacionário, o que, seguramente, ajudou o anaerobismo. É importante ressaltar que o algodão utilizado como suporte evitou a submersão total das brotações, mas não a parcial.

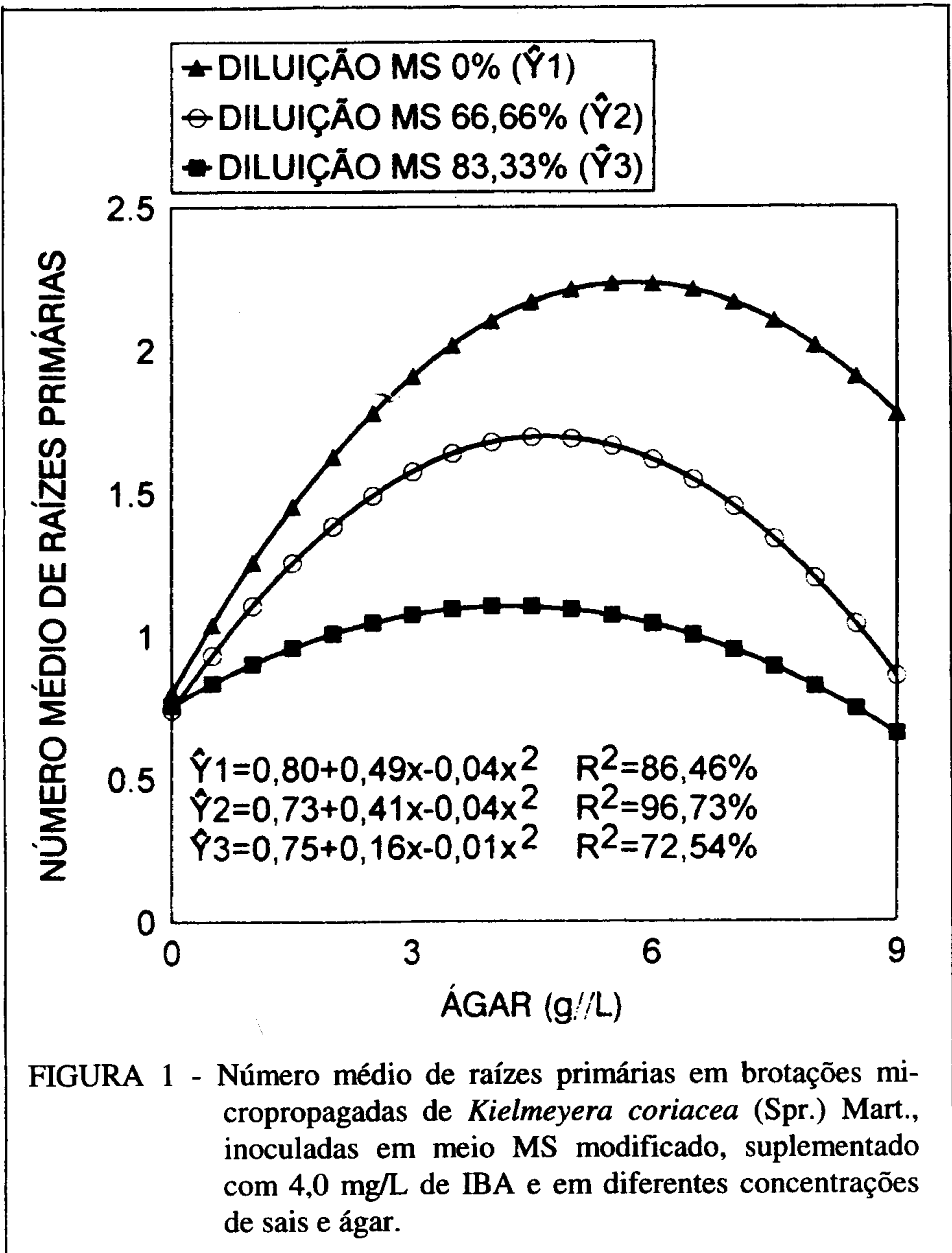
O emprego de ágar, ou de qualquer dos geleificantes mencionados por PIERIK (9) cria condição para melhor aeração das bases dos explantes. Nas culturas de meio sólido, ocorre interface entre o ar, o meio e os tecidos expostos das brotações inoculadas, fazendo com que o oxigênio fique mais disponível ao metabolismo.

A consistência do meio de cultivo provocada pelo ágar, de modo geral, foi favorável à produção de raízes primárias (Figura 1). Para as diferentes concentrações de sais do MS, observaram-se acréscimos nos números de raízes primárias, as quais atingem crescimento máximo e depois decrescem. Verifica-se ainda, pela Figura 1, decréscimos no número médio de raízes primárias nos meios cuja salinidade foi menor, isto é, 66,66% e 83,33%, inferior em relação à concentração normal dos sais do MS.

Para emissão de raízes primárias, *K. coriacea* responde melhor quando se utiliza o meio MS com as proporções de sais integrais (Figura 1). Por outro lado, meios muito densos como aqueles conseguidos pelos suprimentos de 6,0 g/L e 9,0 g/L de ágar, aqui empregados, provocaram diminuição aparente na capacidade de emissão das raízes primárias, principalmente para menores concentrações salinas. Provavelmente tenha ocorrido a indução, mas não o desenvolvimento das raízes em estruturas maiores, perceptíveis a olho nu.

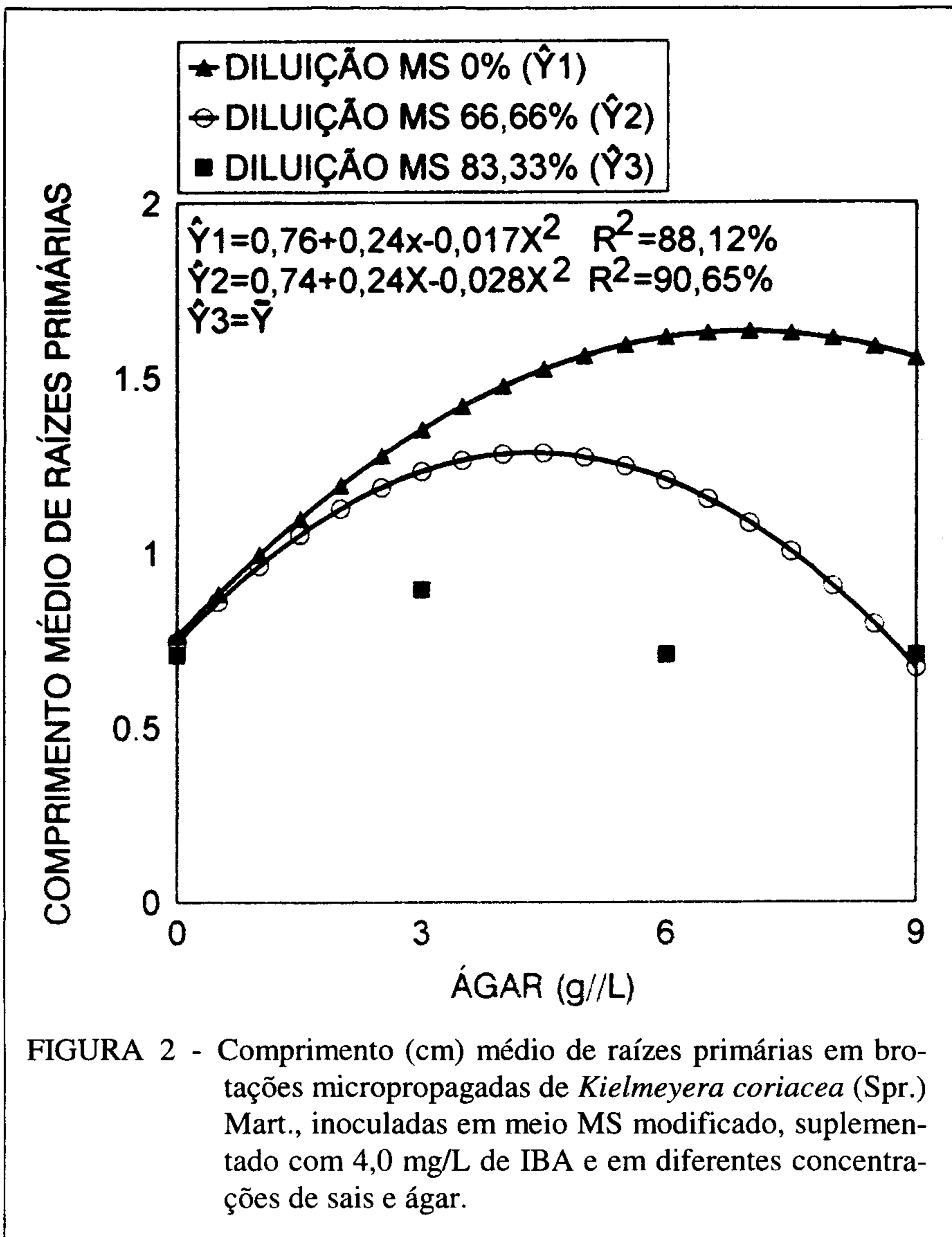
A densidade maior do meio poderia estar impossibilitando ou inibindo este desenvolvimento por proporcionar "barreira mecânica" difícil de ser rompida pelos frágeis primórdios radiculares, logo após sua indução. Além disso, altos níveis de ágar fazem com que ocorra menor intensidade de disponibilidade de nutrientes aos explantes inoculados e isto se agrava à medida que o meio fica mais denso. Então, aqueles nutrientes que seriam necessários para a rizogênese têm sua absorção prejudicada e o metabolismo inerente ao fenômeno fica, também, prejudicado. Pode-se ter aqui uma possível explicação para o fato da concentração salina integral ter apresentado resultados superiores às demais. Os níveis relativamente elevados dos sais do MS poderiam ser suficientes para compensar esta menor disponibilidade em meios de cultura mais densos.

O comprimento das raízes primárias, de modo semelhante ao que ocorreu com o número delas, foi afetado pela salinidade do meio e pela concentração de ágar empregada, de modo geral. A Figura 2 mostra que a



utilização da formulação básica dos sais do MS foi interessante para que as raízes primárias emitidas atingissem comprimentos mais avantajados. Embora ocorresse a tal "barreira mecânica" nos meios mais densos, a salinidade elevada foi suficiente para vencer a menor disponibilidade dos sais e nutrir adequadamente os explantes, fazendo com que suas raízes primárias se desenvolvessem mais. Observa-se, ainda (Figura 2), que diluições da formulação básica do MS foram prejudiciais ao tamanho de

raízes primárias quando em combinação com níveis de ágar superiores a 3 g/L.



A emissão de raízes secundárias foi significativamente afetada pela salinidade do meio. O meio MS, somente quando usado em sua plenitude em termos de sais, possibilitou obter maior número de raízes secundárias, decrescente linearmente com as diluições empregadas (Figura 3).

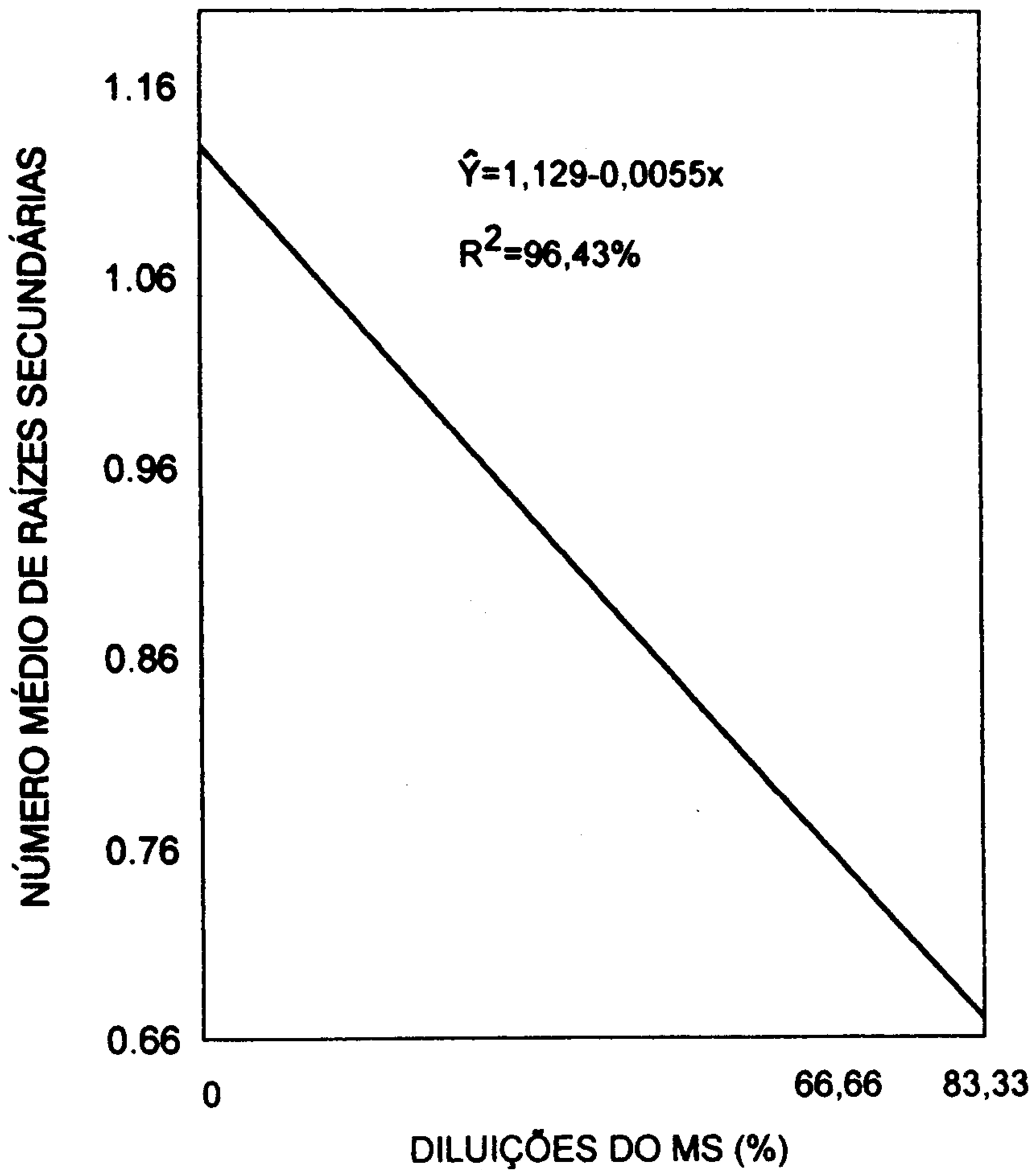


FIGURA 3 - Número médio de raízes secundárias em brotações micropropagadas de *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart., inoculadas em meio MS modificado, suplementado com 4,0 mg/L de IBA e em diferentes concentrações de sais.

De modo geral, *K. coriacea* mostrou o melhor desenvolvimento do sistema radicular com a formulação salina original de MURASHIGE e SKOOG (8) suplementada de preferência com 3,0 ou 6,0 g/L de ágar.

3.2. Efeito do pH e de Concentrações de Ágar no Meio

Na análise de variâncias constatou-se interação significativa entre os fatores estudados, o pH e as concentrações de ágar, relativa às variáveis; o número e o comprimento médio de raízes primárias nas brotações; e o número médio de raízes secundárias. Observou-se (Figura 4) maior número médio de raízes primárias na faixa de pH de 5,4 e 5,7 associada a 3 e 6 g/L de ágar.

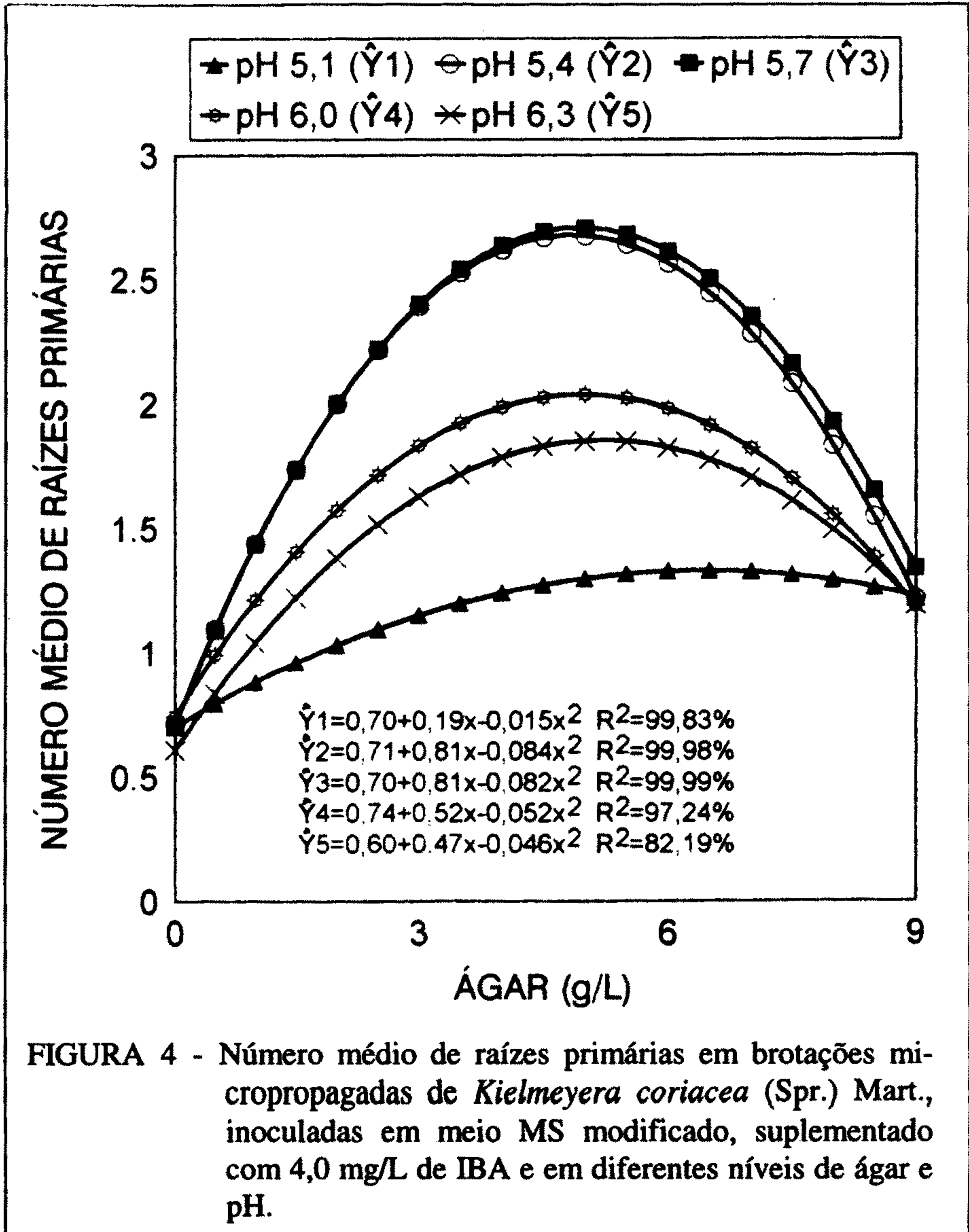


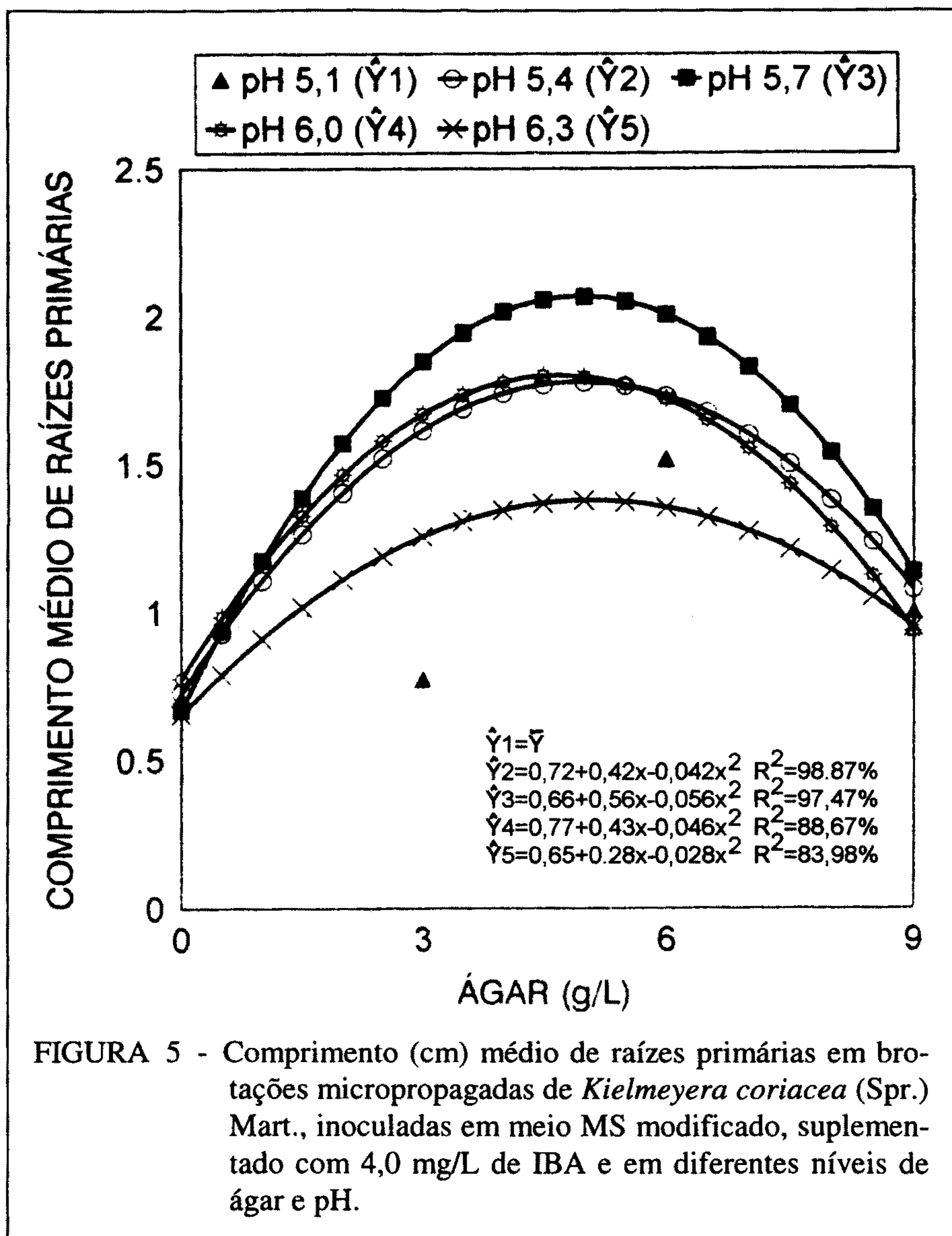
FIGURA 4 - Número médio de raízes primárias em brotações micropropagadas de *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart., inoculadas em meio MS modificado, suplementado com 4,0 mg/L de IBA e em diferentes níveis de ágar e pH.

As faixas de pH muito acima ou muito abaixo de 5,7 podem provocar distúrbios no que diz respeito à disponibilidade de íons que resultam da dissociação dos sais no meio de cultura e sua assimilação pelo explante (7). Assim, em determinados pHs, alguns íons tornam-se mais facilmente disponíveis e, ou, assimiláveis do que outros em igual condição. Essas podem ser as explicações para a queda na capacidade das brotações das raízes de *K. coriacea*, bem como para o seu desenvolvimento, principalmente nos pHs 5,1; 6,0; e 6,3 testados. Outro fato que poderia auxiliar a análise desta menor taxa de emissão de raízes é a dissociação que os hormônios auxínicos sofrem em condições de diferentes concentrações hidrogênicas. Essa dissociação pode levar, conseqüentemente, à menor atividade do hormônio, fazendo com que a indução da formação de raízes e o seu desenvolvimento sejam prejudicados. A dissociação das auxinas tem sido estudada há muito tempo, mas os estudiosos não sabem dizer, com clareza, se a dissociação é maléfica ou benéfica ao enraizamento de estacas. AUDUS (2) e WHITE (11) sustentam a hipótese de que as auxinas só são ativas quando não-dissociadas, mas BURSTROM (4) mostra tendência de aceitar a forma aniônica da auxina como realmente ativa. Fica difícil, e também fora de propósito do presente trabalho, elucidar essa questão.

Analogamente aos resultados do experimento anterior, a ausência de ágar no meio de cultura foi prejudicial à emissão de raízes primárias e os dados aqui coletados reforçam a idéia de que o anaerobismo, ao qual ficaram expostos os tecidos da base das brotações, é desinteressante para o processo (Figura 4). Os mesmos comentários anteriormente feitos devem, aqui, ser considerados, como mostram as Figuras 4 e 5, para os diferentes pHs adotados, maior número médio e comprimento médio de raízes primárias foram formados na faixa de 3 e 6 g/L de ágar, ocorrendo decréscimo em meio mais denso.

Raízes pouco desenvolvidas foram observadas com os valores extremos de pH aqui testados, ou seja, 5,1 e 6,3 (Figura 5). Nestes níveis, parece que, novamente, a disponibilidade e a assimilação de nutrientes estão determinando o desenvolvimento e o crescimento das raízes primárias. É lógico supor que a taxa de multiplicação celular, que determina em parte o crescimento da raiz, fique prejudicada em função do desbalanço nutricional ao qual as brotações ficaram sujeitas nesses níveis de pH. É lógico supor também que a já referida dissociação auxínica tenha contribuído, neste caso, negativamente para o crescimento das raízes, uma vez que as auxinas agem de modo direto sobre a multiplicação e o alongamento celular.

A emissão de raízes secundárias pode ser também maximizada, na faixa de pH de 5,4 e 5,7, pela suplementação de 3 ou 6 g/L de ágar (Figura 6). Observou-se também (Figura 6) que em meios muito densos, 9 g/L de



ágar e, ou, meios líquidos foram desinteressantes para emissão de raízes secundárias.

De modo geral, a maior densidade do meio de cultura, determinada pelo uso de 9,0 g/L de ágar, resultou em efeitos prejudiciais para o enraizamento *in vitro* de brotações micropropagadas de *K. coriacea*, nos diferentes pHs estudados. Nestes meios, a formação de raízes primárias foi limitada e a formação de raízes secundárias, praticamente inexistente.

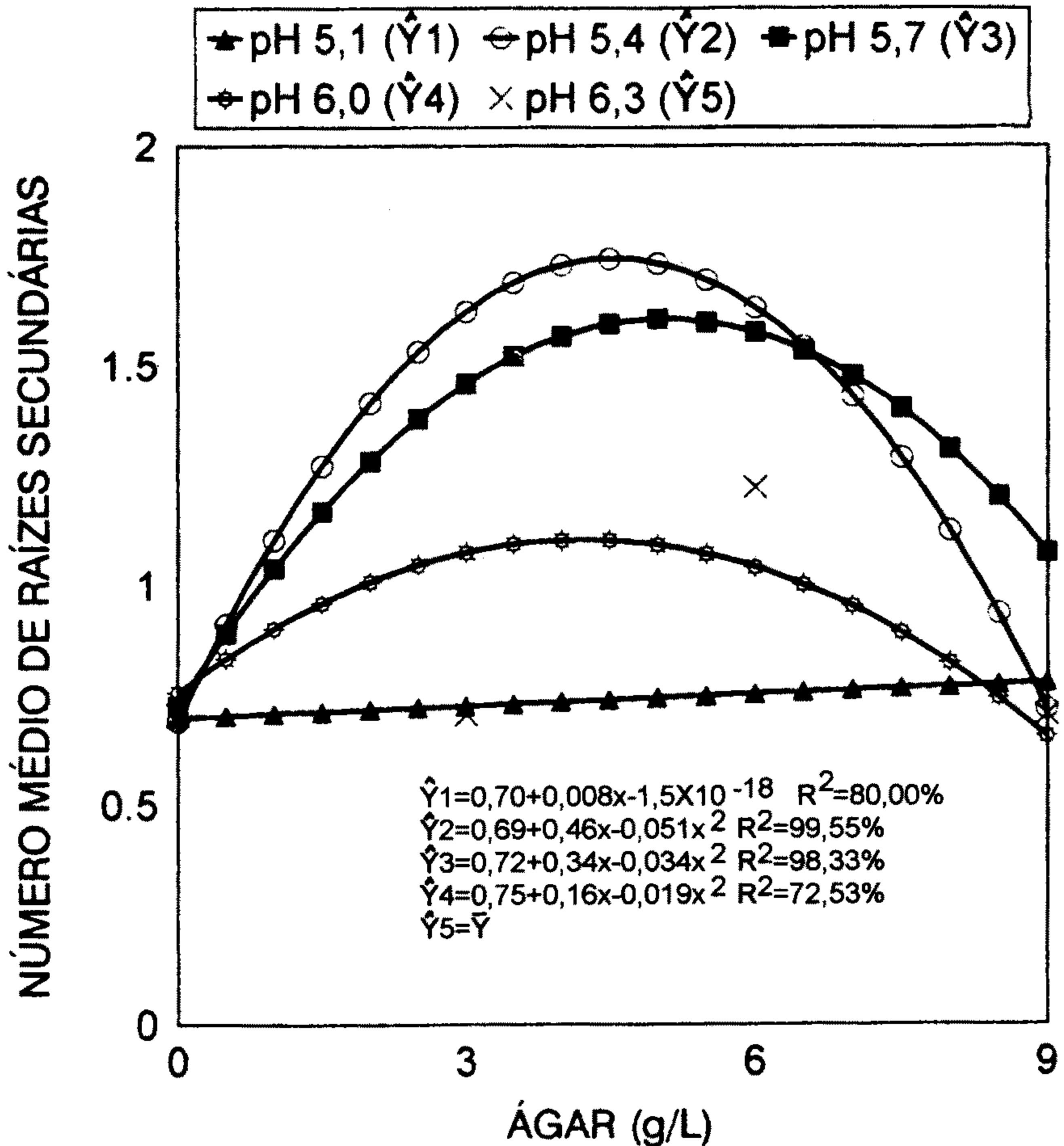


FIGURA 6 - Número médio de raízes secundárias em brotações micropropagadas de *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart., inoculadas em meio MS modificado, suplementado com 4,0 mg/L de IBA e em diferentes níveis de ágar e pH.

4. RESUMO

A espécie *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart. Guttiferae é nativa dos cerrados brasileiros. Sua exploração é extrativista, o que pode causar o seu desaparecimento. Esta espécie é utilizada em revestimento acústico, térmico e decorativo de ambientes, além de ser utilizada como planta medicinal.

Microbrotações produzidas *in vitro*, com tamanho de 40 mm, foram inoculadas em meio de cultura MS - MURASHIGE e SKOOG (8) em diferentes diluições (0%; 66,66%; e 83,33%) da formulação básica dos sais e concentrações de ágar: 0,0; 3,0; 6,0; e 9,0 g/L. Em outro experimento, foi testado o efeito do pH (5,1; 5,4; 5,7; 6,0; e 6,3) e da concentração de ágar no enraizamento. Os resultados mostraram que os níveis de 3,0 ou 6,0 g/L de ágar proporcionaram a emissão do maior número de raízes primárias e o melhor crescimento das mesmas, para as concentrações de sais integrais do MS. Na faixa de pH estudada, pH de 5,4 e 5,7 aliado a 3,0 ou 6,0 g/L de ágar tenderam a apresentar maior número e comprimento médio de raízes primárias e também maior emissão de raízes secundárias.

5. SUMMARY

(EFFECT OF pH, CONCENTRATIONS OF SALT AND OF AGAR ON
IN VITRO ROOTING OF *Kielmeyera coriacea* (Spr.) Mart.
GUTTIFERAE)

Kielmeyera coriacea (Spr.) Mart. Guttiferae is a native species of the Brazilian cerrado (savanna-like vegetation), popularly known as "pau-santo", "folha-santa", "pau-de-são-josé", and "gordinha". The specific characteristic of *K. coriacea* is its strong suberized bark, from which cork is obtained for covering acoustic, thermic and decorative objects. This specie can be utilized as a medicinal plant.

Microshoots (40 mm in length) were inoculated in a Murashige & Skoog culture medium having several dilutions of salts (0%, 66.66% and 83.33%) and concentrations of ágar (0.0, 3.0, 6.0 and 9.0 g/L). Several pHs (5.1, 5.4, 6.0 and 6.3) and concentrations of agar were also investigated in rhizogenesis *in vitro*. Microshoots grown on 3.0 or 6.0 g/L of agar produced the highest number of primary roots and the best growth was obtained with the original "MS" salt concentration. The pHs 5.4 and 5.7 with 3.0 or 6.0 g/L agar resulted in the best primary root emission and growth and number of secondary roots.

6. LITERATURA CITADA

1. ALDRUFEU, A.; PAGES, M.; MESSEGUER, J. & MALE, E. In vitro rhizogenesis in different substrates. *Acta Hort.*, 150:315-323, 1983.
2. AUDUS, L.J. Studies on the pH relationships of root growth and its inhibition by 2.4-D and coumarin. *The New Phytologist*, 48:97-134, 1948.
3. BORNMAN, C.H. & VOGELMANN, T.C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiologia Plantarum*, 61:505-512, 1984.
4. BURSTROM, H. Physiology of root growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 4:237-252, 1953.

5. LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. *Plant Science Letters*, 13:281-285, 1978.
6. LANE, W.D. "In vitro" propagation of *Spirea bumalda* and *Prunus cisterna* from shoot apices. *Canadian Journal Plant Science*, 59:1025-1029, 1979.
7. LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J. & WAITES, W.M. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30:171-179, 1992.
8. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.
9. PIERIK, R.L.M. "In vitro" culture of higher plants. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 345p.
10. PIERIK, R.L.M. & STEEGMANS, H.H.M. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. *Scientific Horticulture*, 3:1-20, 1975.
11. WHITE, P.R. The influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat seedlings in liquid media. *Plant Physiology*, 7:613-618, 1932.