



REVISTA BRASILEIRA DE ENERGIAS RENOVÁVEIS

GERMINAÇÃO *IN VITRO* E ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE ESPINHEIRA-SANTA¹

Eric Lucas Dalpiaz², Milla de Freitas Oliveira³, Roberta Paulert⁴, Patricia da Costa Zonetti⁴,
Suzana Stefanello⁵

¹Apresentado no 6º Simpósio de Biotecnologia na Agroindústria: 08 e 09 de junho de 2017 na UFPR; Setor Palotina;

²Discente do Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina/PR, Brasil. ericagronomia@gmail.com

³Discente do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina/PR. Brasil. freitas.milla@yahoo.com.br

⁴Docente do Departamento de Ciências Agrônômicas, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, Palotina/PR. Brasil. roberta@ufpr.br; patricia.zonetti@gmail.com

⁵Docente do Departamento de Biodiversidade, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, Palotina/PR. Brasil. sstefanello@ufpr.br

Resumo

A espinheira-santa é uma planta com folhas utilizadas na prevenção e tratamento de gastrites e úlceras gástricas. Suas sementes perdem a viabilidade rapidamente e a propagação vegetativa por estacas oriundas de plantas adultas é difícil de ser obtida. O trabalho objetivou avaliar a germinação *in vitro* e o enraizamento *ex vitro* de miniestacas caulinares de espinheira-santa submetidas ao Ácido Indolilacético (AIA). Sementes obtidas de frutos maduros recém-colhidos foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) com metade da concentração dos seus macronutrientes e cultivadas em fotoperíodo de 16 h a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. A unidade experimental constituiu-se de um vidro com 10 sementes e 25 repetições. Após 75 dias, miniestacas obtidas da germinação *in vitro*, foram seccionadas e suas bases imersas em AIA (1000 e 2000 mg L⁻¹),

aconditionadas em frascos com substrato comercial. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado e a unidade experimental consistiu de um frasco com três estacas e quatro repetições. O percentual de germinação após 45 dias foi 62,8% e as miniestacas responderam à imersão em ambas as concentrações de AIA, com 100% de sobrevivência. Após 45 dias, maior percentagem de enraizamento (75,02%), número médio de raízes (1,92) e comprimento médio das raízes (1,31 cm) foi obtido com o tratamento das miniestacas com 1000 mg L⁻¹ de AIA. Os resultados obtidos indicam que é possível otimizar a produção de mudas de espinheira-santa, com redução no tempo e custos de produção realizando a germinação *in vitro* das sementes e enraizamento *ex vitro* de miniestacas com AIA.

Palavras-chave: auxina, estaquia, *Maytenus aquifolia* Mart.

IN VITRO GERMINATION AND ROOTING OF ESPINHEIRA-SANTA MINICUTTINGS

Abstract

Espinheira-santa is a plant whose leaves are used for gastritis and gastric ulcers prevention and treatment. Their seeds lose viability quickly and vegetative propagation by cuttings from adult plants is hard to obtain. The objective of this study was to evaluate *in vitro* germination and *ex vitro* rooting of espinheira-santa stem minicuttings subjected to Indolyacetic Acid (IAA). Seeds obtained from freshly harvested ripe fruits were inoculated in MS (Murashige and Skoog) culture medium with half the macronutrients concentration and cultivated in 16 h to 24 ± 2°C photoperiod. The experimental unit consisted of a glass with 10 seeds and 25 replications. After 75 days, minicuttings obtained from *in vitro* germination were sectioned and their bases were immersed in IAA (1000 and 2000 mg L⁻¹), accommodated in flasks with commercial substrate. The experimental design was entirely randomized and the experimental unit consisted of a flask with three cuttings and four replications. The percentage of germination after 45 days was 62.8% and the minicuttings responded to immersion in both IAA concentrations, with 100% survival rate. After 45 days, higher percentage of rooting (75.02%), root number average (1.92) and root length

average (1.31 cm) were obtained from the minicuttings treatment with 1000 mg L⁻¹ IAA. The results indicate that it is possible to optimize espinheira-santa production with reduced production time and costs by *in vitro* germination of seeds and *ex vitro* rooting of minicuttings with IAA.

Keywords: auxin, cutting, *Maytenus aquifolia* Mart.

Introdução

O gênero *Maytenus* é rico em espécies arbustivas e arbóreas (CARVALHO-OKANO, 2005) com potencial medicinal, tendo sido identificados vários compostos com ação farmacológica (MARIOT, BARBIERI, 2007). Algumas plantas da família Celastraceae são conhecidas com o nome popular de espinheira-santa, dentre elas *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek. Carvalho-Okano (1998) recomendou a utilização do nome *Maytenus aquifolia* uma vez que “*Maytenus*” é um nome feminino.

Ambas as espécies possuem características e propriedades similares (LORENZI, MATOS, 2008). Estudos demonstraram a atividade destas plantas contra úlceras gástricas em ratos e seres humanos, utilizando os extratos aquosos (infusões) das folhas (YARIWAKE et al., 2005). A presença de fenóis totais, mais especificamente dos taninos, é que confere o efeito antiulcerogênico (PEREIRA et al., 1993) e estudos recentes demonstraram a ocorrência de maior teor de taninos em folhas da espécie *M. ilicifolia* (HOLNIK et al., 2015).

As sementes representam a forma mais viável de propagação da espinheira-santa, que também ocorre por meio de rebentos formados a partir das raízes, estacas caulinares (ALVES, 2015) ou por micropropagação (PEREIRA, 1998). As sementes recém-colhidas apresentam elevado potencial de germinação que decresce ao longo do tempo (KOWALSKI et al., 2008).

Como outras espécies lenhosas, a espinheira-santa é considerada de difícil enraizamento, o que dificulta sua propagação vegetativa (ALVES, 2015). Em espécies florestais, a propagação vegetativa através da utilização de estaquia e miniestaquia tem sido uma alternativa viável quando a disponibilidade de sementes de uma matriz é baixa ou apresenta dificuldade no armazenamento e na germinação (XAVIER et al., 2009).

Dias et al. (2012) realizaram um levantamento dos estudos com propagação vegetativa via miniestaquia em espécies florestais lenhosas nativas do Brasil e salientaram que esta técnica tem sido viável para o enraizamento de miniestacas coletadas a partir de minicepas produzidas através de sementes em várias espécies (*Cariniana legalis*, *Cedrela fissilis*, *Swietenia macrophylla*) e, por utilizar propágulos jovens, possibilita a obtenção de material vegetativo mais responsivo ao enraizamento.

A cultura de células e tecidos *in vitro* pode auxiliar na multiplicação sistematizada de plantas elite pelo processo de micropropagação (MORAIS et al., 2012) e ser utilizada, por exemplo, para a germinação das sementes, originando plantas de onde podem ser retiradas as miniestacas que originarão novas plantas, podendo ser enraizadas *ex vitro*.

A formação do sistema radicular com o surgimento de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condição *in vitro* ou *in vivo*, é um processo que envolve fatores endógenos e exógenos (SOUZA, PEREIRA, 2007). O processo de formação das raízes adventícias ocorre de uma a três semanas e sua indução geralmente é dependente da presença de auxinas, consideradas as principais substâncias estimuladoras do enraizamento adventício (GRATTAPAGLIA, MACHADO, 1998). Outros fatores como a maturação/juvenilidade dos propágulos; a época de coleta (estação do ano); a qualidade do substrato, fatores abióticos como temperatura, luz e umidade também podem influenciar o enraizamento das estacas (XAVIER et al., 2009).

A principal auxina de ocorrência natural nas plantas é o AIA (HARTMANN et al., 2002). A aplicação exógena de AIA na base das estacas favoreceu o enraizamento adventício em plantas como bambu (LIMA NETO et al., 2009) e pitósporo-japonês (MENEGUZZI et al., 2015).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* e o enraizamento *ex vitro* de miniestacas caulinares de espinheira-santa (*Maytenus aquifolia* Mart.) submetidas à aplicação de Ácido Indolilacético (AIA).

Material e Métodos

Frutos maduros ainda fechados foram coletados no mês de dezembro de 2016 no município de Palotina - PR e levados para o Laboratório de Anatomia e Morfologia Vegetal da UFPR - Setor Palotina para a retirada das sementes as quais foram utilizadas no dia seguinte para a instalação do experimento de germinação *in vitro*.

Ramos vegetais com flores e frutos foram coletados e uma amostra foi depositada no Herbário Campus Palotina (HCP) sob o número 1.268. A planta-matriz de onde foram coletados os frutos não recebeu tratamentos culturais, como adubação, irrigação e controle fitossanitário.

Germinação in vitro

Em câmara de fluxo laminar as sementes passaram pelo processo de assepsia, que consistiu inicialmente da imersão em álcool 70% por 3 min, seguida de hipoclorito 2% por 30 min e três lavagens com água destilada e autoclavada. Em seguida, as sementes foram dispostas em frascos de vidro contendo 50 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) com metade da concentração dos macronutrientes (MS/2) os quais foram levados para a sala de crescimento do Laboratório de Micologia e Plantas Medicinais onde permaneceram sob fotoperíodo de 16 h a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ para acompanhamento do percentual de germinação. Os meios de cultura foram acrescidos de sacarose (30 g L^{-1}), geleificados com ágar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$) e seu pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

A unidade experimental consistiu de um vidro com 10 sementes e 25 repetições. A contagem do número de sementes germinadas foi realizada diariamente até os 45 dias, considerando-se germinadas as sementes que apresentavam protrusão da radícula sendo os resultados expressos em porcentagem.

Enraizamento ex vitro

Transcorridos 75 dias após a semeadura, miniestacas caulinares com aproximadamente 3 cm de comprimento obtidas das plantas germinadas *in vitro*, foram seccionadas em bisel e suas bases foram imersas por 1 min em AIA (1000 e 2000 mg L^{-1}), sendo em seguida acondicionadas em potes de acrílico ($4,5 \times 4,5 \text{ cm}$) com tampa contendo substrato comercial para a produção de

mudas (Humusfétil®), permanecendo na sala de crescimento. Irrigação por nebulização foi realizada diariamente até o molhamento completo do substrato e após 15 dias foi realizada a abertura dos potes com a retirada gradual das tampas.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, tendo como unidade experimental um frasco com três estacas e quatro repetições. Após 45 dias foi avaliado o percentual médio de enraizamento, o número e o comprimento médio das raízes formadas, este último determinado com o auxílio de uma régua milimetrada e o valor expresso em centímetros.

Resultados e Discussão

As sementes iniciaram a protrusão da radícula no nono dia e ao final de 45 dias o percentual de germinação foi de 62,8% e a maior parte das plantas apresentava entre 3 a 5 centímetros de altura com um número médio de cinco folhas. O valor do percentual de germinação não foi elevado e pode ser atribuído ao fato dos frutos terem sido coletados ainda fechados e algumas sementes ainda não estarem completamente maduras.

As miniestacas caulinares retiradas das plantas germinadas *in vitro* responderam à imersão em ambas as concentrações de AIA testadas, com 100% de sobrevivência *ex vitro*. O aspecto geral das miniestacas nos frascos pode ser observado na Figura 1.



Figura 1: Miniestacas de espinheira-santa cultivadas em frascos de acrílico contendo substrato comercial após 45 dias de cultivo *ex vitro*.

* Barra branca corresponde a 1 cm.

A maior percentagem de enraizamento (75,02%), o maior número médio de raízes por estaca (1,92) assim como o maior comprimento médio das raízes (1,31 cm) ocorreu com a imersão da base das miniestacas em 1000 mg L⁻¹ de AIA (Tabela 1).

Tabela 1: Enraizamento de miniestacas de espinheira-santa submetidas a imersão com AIA (1000 e 2000 mg L⁻¹) 45 dias após a instalação do experimento.

AIA mg L ⁻¹	% enraizamento	Número de raízes/estaca	Comprimento das raízes (cm)
1000	75,02 ± 16,65	1,92 ± 0,44	1,31 ± 0,18
2000	50 ± 43,04	0,96 ± 0,67	0,53 ± 0,68

Um dos principais fatores relacionados ao processo de iniciação da formação de raízes adventícias é inerente à presença e/ou ausência de auxina. Vários autores confirmam o papel fundamental das auxinas no processo de enraizamento adventício, que pode depender do tipo de auxina empregada e também da sua concentração (OLIVEIRA et al., 2003; SOUZA, PEREIRA,

2007). No presente trabalho, houve maior enraizamento das miniestacas com a utilização de 1000 mg L⁻¹ de AIA. Lima Neto et al. (2009) também relataram que a exposição das estacas de bambu por 1 min a solução de AIA favoreceu o enraizamento, porém a concentração de AIA foi inferior (500 mg L⁻¹).

Alves (2015), por outro lado, relatou que a imersão lenta (por um período de 24 horas) de estacas apicais, medianas e basais de espinheira-santa (*M. aquifolia*) com 1000 mg L⁻¹ da auxina sintética AIB (Ácido Indolbutírico) foi extremamente tóxica, ocorrendo mortalidade total das mesmas.

O estado de juvenildade das estacas também é um fator importante. No presente trabalho foram utilizadas miniestacas obtidas de plantas germinadas *in vitro* e obteve-se elevado percentual de enraizamento (Tabela 1) e número de raízes por estaca (Tabela 1 e Figura 2). Lima et al. (2008) observaram que estacas caulinares semilenhosas e herbáceas de *M. ilicifolia* não respondem à aplicação das auxinas sintéticas ANA (Ácido Naftalenoacético) e AIB. Contudo, quando os autores utilizaram miniestacas caulinares apicais coletadas a partir de brotações de minicepas com 10 meses de idade mantidas sob irrigação intermitente as mesmas apresentaram elevado percentual de enraizamento (88,35%) sem ter recebido tratamento com auxina.

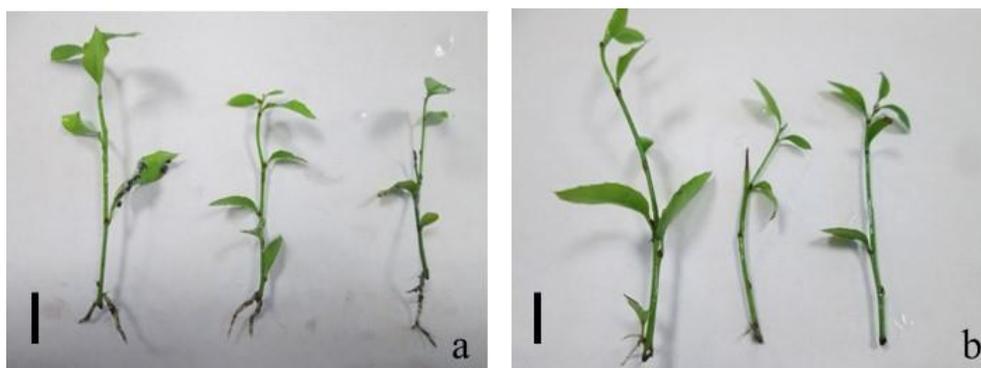


Figura 2: Miniestacas de espinheira-santa enraizadas após 45 dias de cultivo: a) raízes em estacas tratadas com 1000 mg L⁻¹ de AIA; b) 2000 mg L⁻¹ de AIA.

* Barra preta corresponde a 1 cm.

O grau de lignificação dos ramos pode ser um fator limitante à iniciação do enraizamento adventício. Lima et al. (2001) verificaram que o tratamento de estacas lenhosas de *M. muelleri*

provenientes de ramos de plantas matrizes de seis anos com diferentes concentrações de AIB não foi eficiente na indução do enraizamento e através de análises anatômicas detectada a presença de uma camada quase contínua de fibras e braquiesclereídes, a qual constituiu uma barreira anatômica à indução do enraizamento adventício.

Os resultados obtidos neste trabalho são ainda preliminares, contudo demonstraram que a juvenildade do material utilizado favoreceu o enraizamento das miniestacas, as quais apresentaram diferentes respostas a concentração de AIA empregada. Através da realização do presente estudo pode-se inferir que a produção de mudas de espinheira-santa por meio da técnica de miniestaquia a partir de material de origem seminal é viável, sendo uma alternativa para a produção de mudas.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que é possível otimizar a produção de mudas de espinheira-santa, com redução no tempo e nos custos de produção realizando a germinação *in vitro* das sementes e o enraizamento de miniestacas com AIA em condições *ex vitro*.

Agradecimentos

A Prof. Dra. Carina Kozera (UFPR Setor Palotina) pelo auxílio na identificação botânica da espécie.

Referências

ALVES, L.F. **Tecnologias para produção de mudas de espinheira-santa: propagação vegetativa por estacas caulinares**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2015.

CARVALHO-OKANO, R.M. Novos sinônimos para espécies de *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae). **Herbarium Bradeanum**, v. 8, n. 14, 73-76, 1998.

CARVALHO-OKANO, R.M. Celastraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM, T.S.; MARTINS, S.E.; KIRIZAWA, M.; GIULIETTI, A.M. (Eds.) **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 4, p. 185-194, 2005.

DIAS, P.C.; OLIVEIRA, L.S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 43-76.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIS JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002, 880 p.

HOLNIK, P.R.; HUSSEIN, A.A.; SOUZA, B.M.C.; COLDEBELLA, P.F.; SHIMABUKU JR, R.S.; LEITE, N.K. Comparação do teor de taninos entre duas espécies de espinheira-santa (*Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) cultivadas no Horto Medicinal do Refúgio Biológico Bela Vista - RBBV da Itaipu Binacional – Foz do Iguaçu, PR - Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 385-391, 2015.

KOWALSKI, A.P.J; SIGNOR, D.; MACHADO, E.M.; BIASI, L.A.; LIMA, D.M. Influência da qualidade da semente e do tipo de substrato na formação de mudas de espinheira-santa. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p. 15-20, 2008.

LIMA, D.M.; SILVA, C.S.; RITTER, M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. Substratos e auxinas no enraizamento de estacas caulinares de espinheira-santa. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p. 85-89, 2008.

LIMA, D.M.; TANNO, G.N.; PURCINO, M.; BIASI, L. A.; RIBAS, K.C.Z.; ZANETTE, F. Enraizamento de miniestacas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 617-623, 2009.

LIMA, D.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; BONA, C.; MAYER, J.L.S. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 422-438, 2011.

LIMA NETO, M.C.; RIBEIRO, J.S.; BEZERRA NETO, E. Enraizamento de estacas de bambu com o uso de auxinas. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 7, n. 2, p. 175-179, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 544p.

MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus illicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 3, p. 89-99, 2007.

MENEGUZZI, A.; NAVROSKI, M.C.; LOVATEL, Q.C.; DE MARCO, F.T.; PEREIRA, M.O.; TONETT, E.L. Ácido indolacético influencia no enraizamento de estacas de *Pittosporum tobira*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.14, n.1, p.24-28, 2015.

MORAIS, T. P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, A.F.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; REGINA, M.A.; RINCÓN, C.D.R. Enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira sob o efeito de diferentes épocas, substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 117- 125, 2003.

PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinheira-santa). In: MING, L.C. (Coord.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agronômica**. Botucatu: Unesp, 1998. v. 2, p. 19-32.

PEREIRA, A.M.S.; PEREIRA, P.S.; CERDEIRA, R.M.M.; FRANCA, S.C.; RODRIGUES, D.C.; MORAES, F.R.; MOARES, J.R.E. Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Acta Horticulturae**, v. 333, p. 205-210, 1993.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed UFV, 2009. 272 p.

YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M.; CAPPELARO, E.A.; VASCONCELOS, E.C.; TIBERTIL, L.A.; PEREIRA, A.M.S.; FRANCA, S.C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 162-168, 2005.