

Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim

In vitro culture of *miconia ligustroides* (dc.) Naudim

Débora de Oliveira Prudente¹, Fernanda Carlota Nery², Renato Paiva¹, Michele Valquíria dos Reis¹,
Patrícia Duarte de Oliveira Paiva¹, Marcela Carlota Nery³

RESUMO

Miconia ligustroides (DC.) Naudim pertencente à família Melastomataceae, é uma espécie endêmica do Brasil, que possui ação analgésica, antimicrobiana e está na lista de espécies recomendadas para recuperação de matas ciliares. Objetivou-se estabelecer protocolos de micropropagação para *M. ligustroides*. As sementes foram desinfestadas e inoculadas em meios de cultura WPM e MS, suplementados com GA₃ (0,0; 5,77; 11,54; 17,31; 23,08 µM). Explantes foliares, nodais e radiculares de plântulas *in vitro* foram inoculados em meio MS suplementado com BAP (0,0; 13,5; 27,0; 40,5; 54 e 135 µM) e 2,4-D (0,0; 4,5; 13,5; 22,6 e 45,2 µM) para a indução de organogênese indireta. Para o enraizamento das brotações foi testado o meio de cultura MS suplementado com AIB (0,0 e 9,8 µM). As brotações enraizadas foram aclimatizadas *ex vitro* em substrato Tropstrato®. O maior percentual de germinação *in vitro* foi obtido com o meio de cultura MS isento de GA₃. Houve diferença significativa para formação de calos e regeneração de brotações quando os explantes foliares e nodais foram cultivados em 54 µM de BAP e 13,5 µM de 2,4-D, respectivamente, e os explantes radiculares em 135 µM de BAP. O enraizamento das brotações foi obtido sem a suplementação de AIB. Com o uso de 9,8 µM de AIB observou-se significativo comprimento das raízes, porém para o número de raízes não houve diferença significativa. As etapas de micropropagação alcançadas nesse estudo indicam que a germinação, multiplicação de brotos, enraizamento *in vitro* e aclimatização de *M. ligustroides* podem ser obtidos com sucesso.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, espécie florestal, Melastomataceae, micropropagação.

ABSTRACT

Miconia ligustroides (DC.) Naudim belonging to the Melastomataceae family, is an endemic species of Brazil, which has analgesic, antimicrobial and is on the list of recommended species for restoration of riparian forests. The objective was to establish an *in vitro* germination and micropropagation protocols for *M. ligustroides*. The seeds were sterilized and inoculated into culture media, saline formulations based on MS and WPM medium supplemented with five concentrations of GA₃ (0.0; 5.77; 11.54; 17.31; and 23.08 µM). Leaf explants and nodal root seedlings were inoculated on MS medium supplemented with different concentrations of BAP (0.0; 13.5; 27.0; 40.5; 54 and 135 µM) and 2,4-D (0.0; 4.5; 13.5; 22.6 and 45.2 µM) for inducing indirect organogenesis. For rooting of shoots MS medium supplemented with IBA (0.0 and 9.8 µM) was tested. Rooted shoots were acclimatized *ex vitro* in Tropstrato® substrate. Higher germination percentage was obtained with MS medium free of GA₃. The highest sprouting rate was observed when the leaf and nodal explants were cultured in 54 µM BAP and 13.5 µM 2,4-D, respectively, and in the presence of 135 µM BAP for root explants. Shoot rooting was obtained without supplemental IBA. The use of 9.8 µM IBA promoted a significant root length and no influence on root number. The micropropagation steps achieved in this study indicate that germination, shoot multiplication, *in vitro* rooting and acclimatization of *M. ligustroides* can be successfully obtained.

Keywords: Tissue culture, forest species, Melastomataceae, micropropagation.

INTRODUÇÃO

Melastomataceae constitui-se em uma das famílias mais importantes da flora neotropical, com cerca de 2.000 espécies distribuídas entre 30 gêneros (Michelangeli et al., 2004), ocorrendo em praticamente todas as formações vegetais da América do Sul (Martin et al., 2008). Entre os gêneros que ocorrem no Brasil destaca-se o *Miconia*, por ser o maior gênero com uma alta diversidade de espécies

(Mendonça et al., 2008). No Brasil, estão concentradas cerca de 250 espécies (Mendonça et al., 2008), dentre elas *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim, espécie endêmica do Brasil de ocorrência no Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga (Goldenberg et al., 2013), é conhecida popularmente por jacatirão-do-brejo e possui ação analgésica (Cunha et al., 2003) antimicrobiana e tripanocida (Cunha et al., 2006). Seus frutos são dispersos por animais, sendo um

Recebido em 19 de janeiro de 2016 e aprovado em 14 de abril de 2016

¹Universidade Federal de Lavras/UFLA, Lavras, MG

²Universidade Federal de São João Del-Rei/UFSJ, São João Del-Rei, MG, Brasil

³Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri/UFVJM, Diamantina, MG, Brasil

*Autor para correspondência: deholiveira_bg@hotmail.com

importante recurso para a vida selvagem (Chaves et al., 2012) além de existir um grande número de bromélias associadas ao seu tronco (Bonnet & Queiroz, 2006). Outro ponto relevante é o fato de estar na lista de espécies recomendadas para a recuperação de matas ciliares conforme (SMA 21/01) resolução de 21 de Novembro, 2001.

Técnicas de micropropagação têm sido utilizadas para propagação de muitas espécies nativas, e estabelecimento de bancos ativos de germoplasma. Sendo o cultivo *in vitro* uma ferramenta de grande importância para espécies que apresentam dificuldades de propagação por outros métodos vegetativos ou sexuais (Ferreira et al., 2015). Assim, estudos envolvendo os processos de indução de calos e a regeneração de brotações podem viabilizar a produção em larga escala da espécie e explorar características importantes no cultivo *in vitro*, tal como o potencial medicinal de *M. ligustroides*. Diante desse contexto, objetivou-se estabelecer protocolos de germinação *in vitro* e micropropagação para *M. ligustroides*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Os frutos de *M. ligustroides* foram coletados em plantas matrizes localizadas na Floresta Nacional de Ritapólis (FLONA/IBAMA) em Ritópolis, MG (21° 3' 21" S 44° 15' 35" O). E os experimentos conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, localizado no Campus CTAN, na Universidade Federal de São João Del Rei.

Após a retirada das sementes dos frutos, as mesmas foram desinfestadas através da imersão em álcool 70% por 60 segundos, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 10 minutos e, em seguida três enxágues em água destilada autoclavada. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo diferentes meios de cultura. Ao meio de cultura básico foram acrescidos 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar (Sigma®). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Após inoculação foram mantidas em sala de crescimento sob

irradiância de fótons de 36 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Germinação *in vitro*

Para germinação *in vitro* foram utilizadas duas formulações salinas: MS (Murashige & Skoog, 1962) e WPM - *Woody Plant Medium* (Lloyd & Mc Cown, 1980) combinado com a suplementação de cinco concentrações de GA₃ - ácido giberélico (0,0; 5,77; 11,54; 17,31; 23,08 µM). Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaio com uma semente com quatro repetições por tratamento, dispostas completamente ao acaso. As avaliações foram realizadas em intervalos de dois dias durante 30 dias, sendo observada a porcentagem de sementes germinadas (adotando como critério de germinação a protrusão radicular de aproximadamente 2 mm) e o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Maguire, 1962).

Multiplificação *in vitro*

Explantos foliares, nodais e radiculares (1 cm²), obtidos de plântulas cultivadas *in vitro*, foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS suplementado com 6- benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,0; 13,5; 27,0; 40,5; 54 e 135 µM e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações de 0,0; 4,5; 13,5; 22,6 e 45,2 µM. Após inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro sob temperatura de 25 °C ± 2 °C. Cada unidade experimental foi constituída de 10 tubos de ensaio com um explante, com três repetições por tratamento, dispostas completamente ao acaso. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliadas a porcentagem de formação de calos e a regeneração de brotações.

Enraizamento *in vitro*

Brotações (5 cm de altura) oriundas do melhor tratamento de multiplicação foram individualizadas aos 60 dias de cultivo *in vitro* e transferidas para meio de cultura MS suplementado com 0,0 e 9,8 µM de ácido indolbutírico (AIB). Cada unidade experimental foi constituída de 10 tubos de ensaio com um explante, com três repetições por tratamento, dispostas completamente ao acaso. Após 30 dias de cultivo *in vitro*, as variáveis avaliadas foram:

Porcentagem de enraizamento (%), número de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm).

Aclimatização *ex vitro*

Brotações oriundas de organogênese indireta e enraizadas *in vitro* passaram por um período de pré-aclimatização durante 7 dias em recipientes plásticos (50 mL), contendo substrato Tropstrato®, envoltos com saco plástico transparente. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento na temperatura controlada de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após esse período, foi feita a abertura do recipiente de cultivo e as plantas permaneceram mais 15 dias em sala de crescimento. Os recipientes com as plantas foram levados para casa de vegetação, onde permaneceram por mais 15 dias, antes do transplantio para tubetes contendo substrato Tropstrato®. Após 30 dias em casa de vegetação, foi realizada a avaliação da porcentagem (%) de sobrevivência das plantas.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2014) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, com probabilidade de 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação *in vitro*

A maior porcentagem de germinação (71%) de *M. ligustroides* foi observada quando as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS sem regulador de crescimento. Em relação ao IVG houve diferença

significativa (0,03) para o uso do meio de cultura MS com ausência e presença de GA_3 ($5,77 \mu\text{M GA}_3$) (Tabela 1). As sementes de *M. ligustroides* iniciaram a germinação 18 dias após a inoculação, sendo observado a formação de plantas completas em aproximadamente 30 dias, com parte aérea e raízes secundárias bem desenvolvidas (Figura 1a).

A maior porcentagem de germinação em meio de cultura MS pode ser justificada pelo fato de que as sementes de *M. ligustroides* são muito pequenas (1 mm^2), possuindo assim pouca reserva, e no meio de cultura MS há uma maior disponibilidade de macronutrientes, além de micronutrientes, vitaminas e aminoácidos necessários ao início do processo de germinação (Moreira et al., 2012). Faltou falar que está comparando com WPM

As concentrações de GA_3 fornecidas não incrementaram na germinação das sementes de *M. ligustroides*. A concentração de GA_3 adicionada ao meio de cultura, pode resultar em efeito significativo na germinação *in vitro*, quando as sementes apresentam dormência primária, dependendo diretamente da concentração endógena de GA_3 presente nas sementes (Bojórquez-Quintal et al., 2013). Por outro lado, a adição de GA_3 ao meio de cultura pode proporcionar um atraso na protrusão radicular, pois poderá ocorrer inibição das enzimas hidrolíticas induzidas pelo acúmulo de GA_3 endógeno (Santos et al., 2013). Assim, é importante conhecer os fatores que afetam a germinação de sementes de cada espécie para se obter sucesso no processo de estabelecimento de plantas *in vitro* ou *in vivo*.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *M. ligustroides* cultivadas em meio de cultura WPM, MS e MS suplementado com diferentes concentrações de GA_3 .

Tratamento	Germinação (%)	IVG
WPM	42 c	0,02 b
MS	71 a	0,03 a
MS + $5,77 \mu\text{M GA}_3$	50 c	0,03 a
MS + $11,54 \mu\text{M GA}_3$	45 d	0,02 b
MS + $17,31 \mu\text{M GA}_3$	25 e	0,02 b
MS + $23,08 \mu\text{M GA}_3$	40 d	0,02 b

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

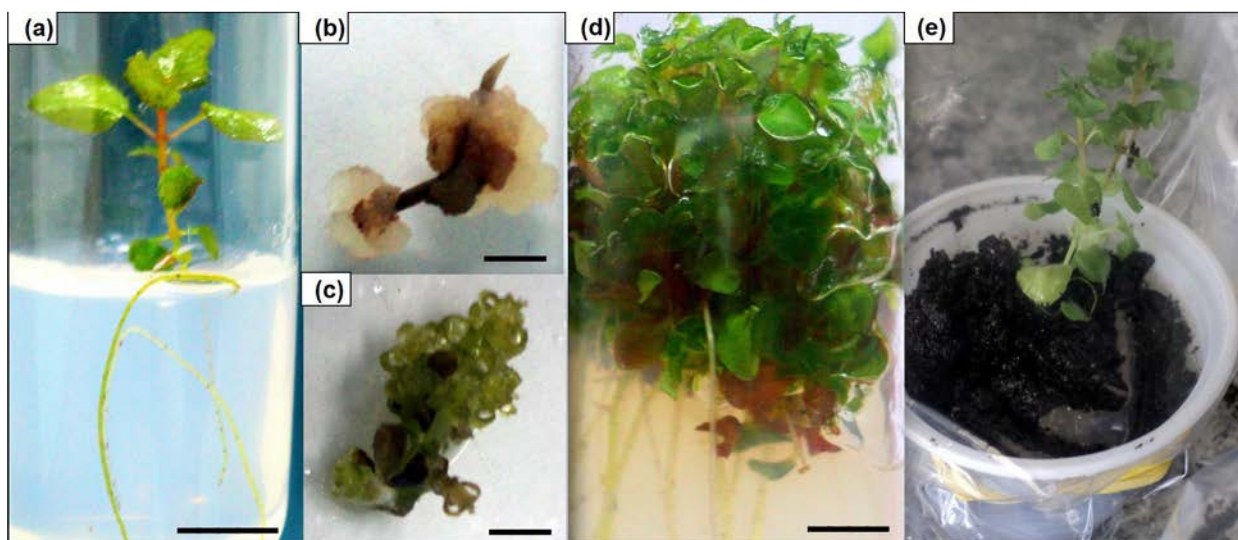


Figura 1 – Aspecto visual de plantas de *M. ligustroides* germinadas *in vitro* em meio de cultura MS isento de fitorreguladores (a) calos em explantes nodais em meio de cultura MS suplementado com 54 μ M de BAP (b) brotação em explantes nodais em meio de cultura MS suplementado com 54 μ M de BAP (c) brotações obtidas a partir de organogênese indireta de explantes nodais em meio de cultura MS (d) e brotações aclimatizadas *ex vitro* em substrato Tropstrato® (e). Barra = 1cm.

Multiplificação *in vitro*

Houve formação de calos em todas as combinações hormonais e explantes utilizados, os quais variaram em tamanho, textura e subsequente regeneração de brotações (Figura 2). Para os explantes foliares e nodais as concentrações de 54 μ M de BAP e 13,5 μ M de 2,4-D obtiveram as maiores porcentagens de formação de calos e regeneração de brotações (Figura 2 a-d). Já para os explantes radiculares a concentração de 135 μ M de BAP obteve as maiores porcentagens de formação de calos (figura 2e) e regeneração de brotações (Figura 2e).

Os calos obtidos em todos os tratamentos a partir de explantes foliares, nodais e radiculares apresentaram aspecto friáveis, de fácil desagregação e coloração predominante albina com posterior escurecimento (Figuras 1b e 1c).

O material vegetal utilizado como explante pode advir de qualquer parte da planta, tendo em vista a totipotência das células vegetais (Pierik, 1990). Contudo, os explantes podem variar em sua sensibilidade nos processos de desdiferenciação celular, sendo mais apropriados para a indução de calogênese explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou

oriundos de tecidos jovens, não lignificados (Nogueira et al., 2007). Apresentando também relação direta com o tipo e a concentração do regulador de crescimento adicionado ao meio de cultura, devido a diferenças no teor endógeno de hormônios em cada explante (Anwar et al., 2015).

Dentre as citocininas, o BAP tem sido eficaz na promoção de desdiferenciação celular em diferentes explantes e espécies de planta. Para *M. ligustroides*, sua presença foi satisfatória para explantes foliares e radiculares. A aplicação exógena de auxinas também pode favorecer a formação de calos, pois são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e elongação celular (Souza et al., 2006; Nogueira et al., 2007). O 2,4-D é mais utilizado na indução de calogênese e, no caso de *M. ligustroides*, explantes nodais responderam significativamente à sua presença.

Enraizamento *in vitro*

Brotações oriundas de organogênese indireta, apresentaram enraizamento *in vitro* independente da presença ou ausência de AIB (0,0 e 9,8 μ M), no meio de cultura MS em todos os explantes testados: foliares (44,6%), nodais (74,6%) e radiculares (22,6%) (Figura 3a). Para a

variável número médio de raízes não houve diferença significativa entre os tratamentos empregados para os diferentes explantes (Figura 3b). Já para o comprimento médio das raízes, houve diferença significativa para a concentração de 9,8 μM de AIB em todos os explantes (Figura 3c). Aos 30 dias de cultivo *in vitro* o enraizamento das brotações já eram bem evidentes (figura 3d).

O regulador de crescimento AIB possui expressiva funcionalidade *in vitro* por provocar menor fitotoxicidade aos explantes e apresentar eficiência em uma ampla faixa de concentrações, garantindo assim, êxito na formação de raízes, o que é fundamental para posterior

aclimação às condições *ex vitro* (Bandeira et al., 2012). Porém no presente estudo, a suplementação do meio de cultura MS com 9,8 μM de AIB não apresentou efeito significativo para a promoção do enraizamento, o que pode ser explicado pelo acúmulo de auxinas endógenas provenientes da grande quantidade de folhas e gemas formadas nas brotações regeneradas, resultando em aumento da atividade metabólica do tecido e, consequente translocação de auxina endógena para as raízes, resultando em formação de raízes sem a necessidade de suplementar o meio de cultura com AIB (Vieira et al., 2014).

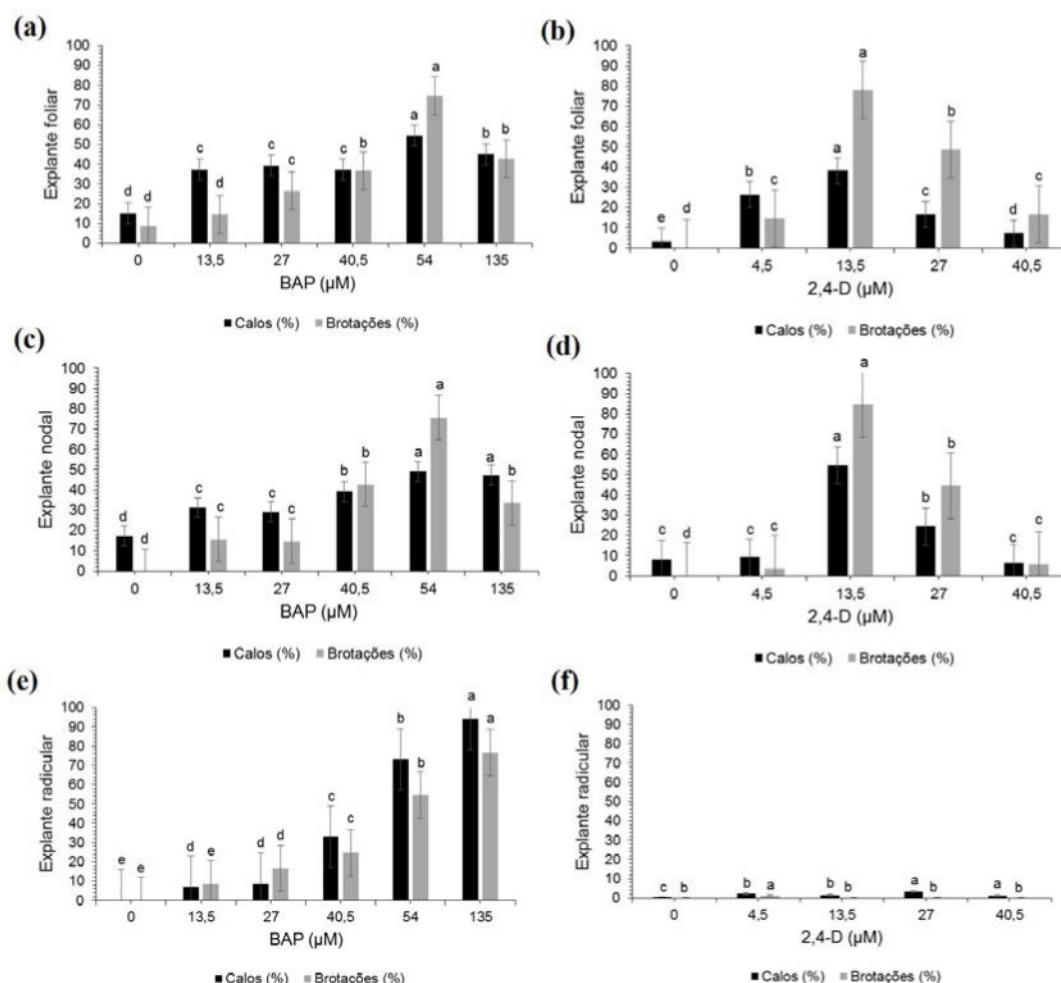


Figura 2 – Influência do tipo de explante (foliar, nodal e radicular) e suplementação de BAP e 2,4-D no meio de cultura MS na porcentagem de formação de calos e regeneração de brotações em *M. ligustroides*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

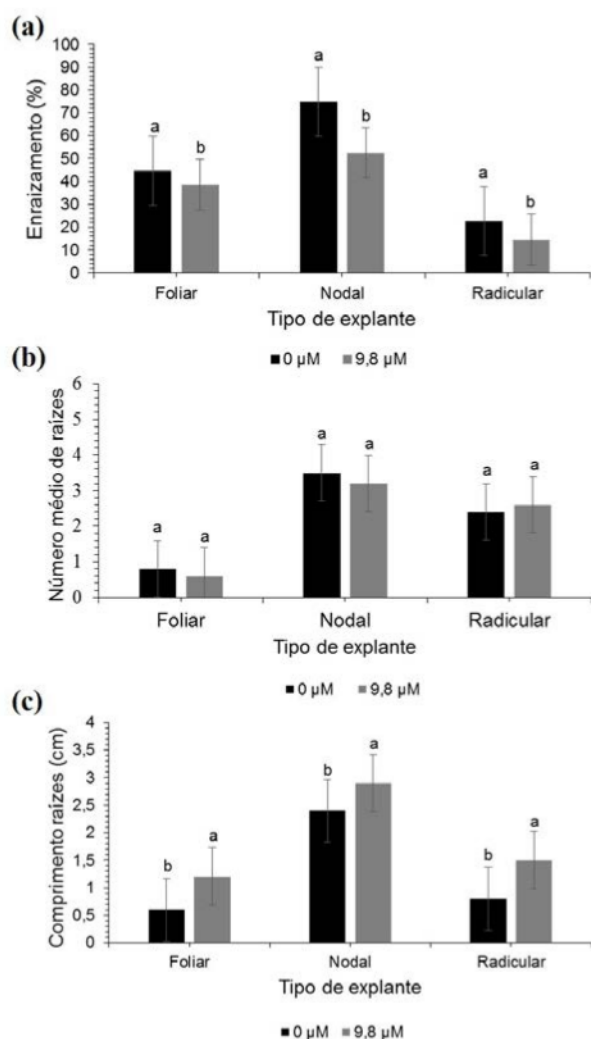


Figura 3 – Efeito de diferentes concentrações de AIB na porcentagem de enraizamento *in vitro* de brotações de *M. ligustroides* oriundas de organogênese indireta (a), número médio de raízes formadas (b) e comprimento médio das raízes (cm) (c). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Aclimatização *ex vitro*

Na etapa de aclimatização *ex vitro*, o índice de sobrevivência das brotações de *M. ligustroides* oriundas da organogênese indireta e enraizadas *in vitro*, ficou em torno de 55%, quando foram transferidas para a condição *ex vitro* (Figura 1e). A baixa taxa de sobrevivência às condições *ex vitro* mostra a fragilidade dos tecidos foliares de *M. ligustroides*, o que, possivelmente, dificultou seu

estabelecimento *ex vitro*. Sendo que ainda faltam ajustes na metodologia de aclimatização, a fim de garantir, uma maior porcentagem de sobrevivência das plantas de *M. ligustroides* a condição *ex vitro*.

CONCLUSÕES

Para germinação *in vitro* de sementes de *M. ligustroides* recomenda-se meio de cultura MS. Para indução de organogênese indireta e posterior regeneração de brotações a partir de explantes foliares e nodais recomenda-se 54 μM de BAP e 13,5 μM de 2,4-D, respectivamente, e para explantes radiculares 135 μM de BAP, em meio de cultura MS. O enraizamento das brotações é obtido em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento, com posterior aclimatização alcançada. Os resultados obtidos neste estudo são contribuições valiosas que no futuro poderão otimizar a propagação *in vitro* em larga escala de *M. ligustroides*.

REFERÊNCIAS

- ANWAR, N.; KIKUCHI, A.; WATANABE, K.N. Assessment of somaclonal variation for salinity tolerance in sweet potato regenerated plants. **African Journal of Biotechnology**, 9 (43): 7256-7265, 2015
- BANDEIRA, J. M. et al. Rooting and acclimatization of the Japanese plum tree, cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 34(2):597-603, 2012.
- BOJÓRQUEZ-QUINTAL, J. E. D. A. et al. Effect of plant growth regulators on *in vitro* germination of coffee zygotic embryos. **African Journal of Biotechnology**, 10(82):19056-19065, 2013.
- BONNET, A.; QUEIROZ, M.H. Estratificação vertical de bromélias epifíticas em diferentes estádios sucessionais da Floresta Ombrófila Densa, Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 29(2):217-228, 2006.
- BRASIL, GOVERNO ESTADUAL. Resolução Secretaria do Meio Ambiente nº 21 de Novembro de 2001. Disponível em: <http://licenciamento.cetesb.sp.gov.br/legislacao/estadual/resolucoes/2001_Res_SM_A_21.pdf> Acesso em 24 de Out de 2014.
- CHAVES, I. S. et al. Morphological characterization of fruits, diaspores and germination of *Miconia ligustroides* (DC.) Naundim (Melastomataceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 35(1):93-98, 2012.

- CUNHA, W. R. et al. A study of the tripanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* spp. **Phytotherapy Research**, 20(1):474-478, 2006.
- CUNHA, W.R. et al. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 84(1):47-49, 2003.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, 38(2):109-112, 2014.
- FERREIRA, E.A.; PASQUAL, M.; REZENDE, J.C. Calogênese em plântulas de figueira. **Ceres**, 54(312): 112-117, 2015.
- GOLDENBERG, R. et al. Nomenclator botanicus for the neotropical genus *Miconia* (Melastomataceae: Miconieae). **Phytotaxa**, 106(1):1-171, 2013.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, 15(3): 416-417, 1980.
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2 (2): 176-177, 1962.
- MARTIN C. V. et al. Phylogenetic evaluation of *Leandra* (*Miconieae*, Melastomataceae): A polyphyletic genus where the seed tells the story, not the petals. **Cladistics**, 24(3): 315-327, 2008.
- MENDONÇA, P.K.; SILVA, E.A.; MELO, C. Oferta qualitativa e quantitativa de frutos em espécies ornitocóricas do gênero *Miconia* (Melastomataceae). **Revista Brasileira de Biociências**, 5 (S1): 672-674, 2008.
- MICHELANGELI, F. A. et al. A preliminary phylogeny of the tribe *Miconieae* (Melastomataceae) based on nrITS sequence data and its implications on inflorescence position. **Taxon**, 53(2):279-279, 2004.
- MOREIRA, R.A. et al. Diferentes meios de cultura no crescimento *in vitro* de sorvetão. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 7(3):409-413, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3):473-497, 1962.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, 31(2):366-370, 2007.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Martins: Nijoff, 1990. 326 p.
- SANTOS, C. A. C. et al. Seed germination and seedling vigor of passion fruit submitted to the action of gibberellic acid. **Bioscience Journal**, 29(2):400-407, 2013.
- SOUZA, J.A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, 36(6):1920-1922, 2006.
- VIEIRA, R. L. et al. *In vitro* morphogenesis of garlic plants: The role of growth regulators in bulb induction and development. **Ciência Rural**, 44(3):439-445, 2014.

