

ENRAIZAMENTO DE SEQUÓIA SPP. IN VITRO

VANIA TREVELIN¹; MAURÍCIO C. FLORES²; DAIANE DE PINHO
BENEMANN³; LUIS WILLIAN PACHECO ARGE⁴; ANTONIO C. TORRES⁵; JOSÉ
ANTONIO PETERS⁶

¹Bióloga, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal (*Lab. Cultura de Tecidos de Plantas/ Depto de Botânica*), UFPel, vaniatre@hotmail.com;

²Estudante de Graduação em Biologia, Bolsista de Iniciação Científica-Fapers, *Lab. Cultura de Tecidos de Plantas/ Depto de Botânica* -UFPel

³Dra. em Biotecnologia, *Lab. Cultura de Tecidos de Plantas/Depto de Botânica*, UFPel, daiane_bio@yahoo.com.br

⁴Doutorando em Fitomelhoramento, FAEM, UFPel, l.willianpacheco@yahoo.com.br

⁵Dr., Pesquisador da EMBRAPA

⁶Dr. em PPG em Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica- IB, UFPel, japeters@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Sequóia é um gênero da família Cupressaceae, apresentando tronco grosso na base, fibroso e avermelhado, quase sem ramificação na parte inferior do tronco e sua copa é cônica com ramos pendentes com extremidades curvadas para cima, com folhagem perene e produz pinhas no final do verão, sendo uma planta nativa da Califórnia (EUA). Pode chegar a mais de 3.000 anos e a uma altura de mais de 90 metros, sendo uma planta de clima tropical. No século XIX, várias delas foram derrubadas para fins comerciais, porém sua madeira se mostrou frágil e inadequada para construção, sendo usada no máximo para postes, cercas ou palitos de fósforo. A visão de enormes sequóias derrubadas e a enorme quantidade de madeira desperdiçada nos bosques causou uma forte comoção pública, acabou por mobilizar esforços de conservação da espécie. A população nativa da sequóia gigante é restrita hoje a aproximadamente 67 bosques (área total ~ 15.000 ha) ao longo do encostas ocidentais de Sierra Nevada na Califórnia (WILLARD 2000).

Esta árvore é considerada um fóssil vivo e tem sido plantada no Brasil para fins ornamentais e para a adaptação da espécie, já que seu habitat de origem tem sido destruído, pois as queimadas naturais foram impedidas durante décadas, o que ocasionou uma queda brusca na taxa de germinação das sementes e proliferação das mudas, pois o fogo é responsável pela abertura de clareiras e pela quebra de dormência das sementes (STEPHENSON, 1994). A sequóia pode ser propagada por sementes ou estacas. No entanto, devido a dormência e difícil produção de pêlos radiculares na raiz ,a taxa de germinação das sementes (uma média de 10%) BOE (1974) e viabilidade das estacas (OLSON et al. 1990) são geralmente baixos. Por esta razão, a micropropagação é uma das ferramentas essenciais para a regeneração, multiplicação e enraizamento desta espécie.

A micropropagação pode ser uma técnica alternativa, que possibilita o desenvolvimento de plantas sob condições assépticas e controladas, visando maior rapidez de proliferação e da capacidade de enraizamento, levando assim a maiores taxas de sobrevivência na fase de aclimatização.

O principal obstáculo na micropropagação de plantas lenhosas é sua reduzida capacidade de enraizamento. Segundo BORNMAN (1983) e BERTHON et al. (1990), raízes primórdiais em muitas coníferas não poderiam ser obtidas sem uma passagem em meio contendo auxina. Procedimentos de enraizamento clássicos para brotações de sequóia consistem em duas ou três etapas sucessivas de cultivo, usando meios com e sem auxina (FETT-NETO et al. 1992).

O enraizamento é uma etapa realizada classicamente *in vitro*, aumentando, contudo, os custos de produção (FERRI et al. 1998). Além disto, as raízes produzidas *in vitro* não sobrevivem após a transferência das plantas para o estágio de aclimatização (MCCLELLAND et al.1990). Para a maioria das espécies, ao enraizamento, é necessária a presença de uma auxina no meio de cultura, na fase de indução (DE KLERK et al. 1995). A quantidade a ser adicionada no meio de cultura depende das concentrações endógenas de auxinas do explante utilizado (BLAKESLEY et al. 1991).

O objetivo do presente trabalho foi de estabelecer um protocolo eficiente para o enraizamento de sequóia spp. *in vitro*.

2. METODOLOGIA

Os explantes de sequóia previamente estabelecidos *in vitro*, foram submetidos aos seguintes tratamentos: T1, meio MS MURASHIGE & SKOOG, (1962), sem Boro; T2, meio MS normal (com todos macro e micronutrientes); T3, meio MS acrescido de 14 mg/L⁻¹ de Cloreto de Cálcio; T4, MS sem Boro e acrescido de 14 mg/L⁻¹ de cloreto de cálcio. Todos os tratamentos foram acrescidos de 2,4 mg/L⁻¹ de AIA e 20 g/L⁻¹ de sacarose e seu pH foi ajustado para 5,8. Foram realizadas 5 repetições por tratamento, com 5 explantes por repetição, inoculados com aproximadamente 3 cm de comprimento que permaneceram em câmara de crescimento com luminosidade de 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons e 16 horas de fotoperíodo. A temperatura da câmara de crescimento foi mantida a 25 \pm 1°C. Após 45 dias foram analisadas as seguintes variáveis: percentagem de explantes sobreviventes, média do comprimento dos explantes, média do número de explantes com uma raiz, média do número de explantes com mais de duas raízes, média do comprimento de raiz e percentagem de explantes sem raiz.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado e para verificação dos dados foi utilizado o teste de Tukey em diferentes níveis de significância, utilizando o software R, (R CORE TEAM, 2013) com o pacote Agricolae (DE MENDIBURU, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Tabela 1, não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos, em relação a variável explantes sobreviventes. Nos tratamentos T1, T2 e T3 ocorreu 100% de sobrevivência, enquanto no tratamento T4 apenas 60% sobreviveram, devido ao aparecimento de contaminações por parte dos explantes. Em relação ao comprimento dos explantes, também não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém o tratamento T4 (média de 10,74 cm) foi o que apresentou maior média, enquanto o tratamento T3 apresentou a menor (média de 8,78 cm). Em relação as variáveis explantes com 1 raiz ou mais de duas raízes, os tratamentos T1 e T2 não se diferenciaram, já o tratamento T3 foi o que apresentou maior média de raízes, sendo este o ideal para produção de raízes de Sequóia, com uma média de 3,20 explantes com mais de duas raízes. A presença de cloreto de cálcio neste tratamento foi benéfica ao enraizamento, pois o Ca⁺ sendo um constituinte da lamela média (integridade da parede celular) e sua deficiência pode afetar particularmente os pontos de crescimento da raiz, com o surgimento de núcleos poliplóides, células binucleadas, núcleos conscritos, divisões amitóticas, podendo cessar o desenvolvimento e até mesmo ocorrer escurecimento e morte do tecido vegetal (TANAKA; FUJIWARA, 2008).

O tratamento T3 também foi o que resultou em maior crescimento das raízes, com uma média de 3,88 mm, enquanto o tratamento T1 apresentou média de 1 mm. Possivelmente esse tamanho de raiz seria muito pouco para posterior aclimatização da planta. Em relação a variável percentagem de explantes sem raízes, os tratamentos T1 e T2, não diferiram entre si, tendo as maiores percentagens (18,4 e 16,8 respectivamente) e os tratamentos T3 e T4 as menores percentagens (1,6 e 4,1 respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si.

Tabela 1. Variáveis analisadas em *Sequóia spp. in vitro*.

Tratamentos	Explantes sobreviventes (%)	Altura (cm)	Explantes com 1 raiz****	Explantes com mais de 2 raízes***	Comprimento de raiz (mm)**	Explantes sem raízes (%) *
T1	100 ^A	10,19 ^A	0,20 ^A	0,20 ^A	1,00 ^A	18,4 ^A
T2	100 ^A	10,36 ^A	0,20 ^A	0,60 ^A	2,16 ^A	16,8 ^A
T3	100 ^A	8,78 ^A	1,40 ^B	3,20 ^B	3,88 ^B	1,6 ^B
T4	60 ^A	10,74 ^A	1,00 ^{AB}	1,00 ^{AB}	3,62 ^B	4,1 ^B

Nível de significância: * 0,0; ** 0,01; *** 0,05; **** 1,0

4. CONCLUSÕES

O meio MS acrescido de 14 mg/L⁻¹ de cloreto de cálcio, foi o que induziu maior número e tamanho de raízes, sendo o mais indicado para enraizamento *in vitro* de sequóia spp.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHON, J.Y.; BEN TAHAR S. BOYER,G.N, Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum* invitro and their requirements, **Plant Physiol. Biochem.** 28, 631–638, 1990.
- BLAKESLEY, D.; WESON, G. D.; HALL, J.F. The role of endogenous auxin in rootinitiation. **Plant Growth Regulation**, Dordresh, v.10, p.341
- BOE K. N.; (1974) *Sequoia sempervirens* (D.Don) Endl. In: Schopmeyer CS (ed) *Seeds of woody plants in the United States. Agriculture handbook 450*. USDA Forest Service, Washington, DC, USA, pp 764–766 Bourgard F, Favre.
- BORNMAN, C. H. Possibilities and constrains in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* in vitro, **Physiol. Plant.** 57 (1983) 5–16.
- DE KLERK, G. J.; KEPPEL, M.; BRUGGE, J. T.; MEEKES. H. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46 n.289, p. 965-972, 1995.
- DE MENDIBURU, F. **Una herramienta de analisis estadistico para la investigacion agricola**. Tesis. Universidad Nacional de Ingenieria (UNI-PERU), 2009.
- FERRI, V. C.; CENTELLAS, A. Q.; HELBIG, V. E.; FORTES, G. R. L. Uso de ágar, amido e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira MM 111. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.4, p. 561-565, 1998.
- FETT-NETO A.G.; TEIXIERA S. L.; DA SILVA, E. A. M; SANT ANNA, R. Biochemical and morphological changes during in vitro rhizogenesis in cuttingsb of *Sequoia semperirens* (D.Don) Endl, **J. Plant Physiol.** 140, 720–728,1992.
- MCCLELLAND, M. T.; SMITH, M. A. L.; CAROTHERS, Z. B. The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 23, p. 115-123, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

OLSON, D. F.; ROY, D. F.; Walters, G. A. (1990) *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. In: Barnes RM, Honkala BH (eds) Silvics of North America. **Agriculture handbook 654**, vol. 1 Conifers. USDA Forest Service, Washington, DC, USA, pp 541–551.

R CORE TEAM, R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Acessado em 01 de out. de 2013. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

STEPHENSON, N. L. 1994. Long-term dynamics of Giant Sequoia populations: Implications for managing a pioneer species. Pp. 56–63 in P. S. Aune (tech. coord.), **The Symposium on Giants Sequoias: Their place in the ecosystem and Society**, June 23–25 Visalia, CA. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, General Technical Report PSW-151. 1992.

TANAKA, M.; FUJIWARA, T. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, Berlin, v. 456, n. 4, p. 671-677, 2008.

WILLARD, D. Pages 6–7 in **A guide to the sequoia groves of California**. Yosemite Association, El Portal, California, 2002.