

Estabelecimento *in vitro* de *Ceiba rubriflora* Carv.-Sobr. e L. P. Queiroz: uma espécie endêmica do vale do rio São Francisco

Anna Luiza Mota Docha¹, Leandro Silva de Oliveira², Nayara dos Santos de Souza³, Gilvano Ebling Brondani^{4*}

DOI: <https://doi.org/10.35699/2447-6218.2020.24029>

Resumo

Ceiba rubriflora é uma espécie nativa da região do médio São Francisco que se encontra em risco crítico de extinção. Em decorrência do endemismo da espécie, a produção de sementes é escassa e a micropropagação apresenta-se como ferramenta para a propagação da espécie. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer *in vitro* sementes de *C. rubriflora* após desinfestação com diferentes concentrações de cloro ativo e testar a multiplicação *in vitro* de brotações apicais em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). O estabelecimento *in vitro* das sementes foi realizado em meio de cultura MS, sendo estas submetidas previamente à desinfestação com hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,5% de cloro ativo. Em condições *in vitro*, brotações apicais das plântulas germinadas foram utilizadas como explantes para a multiplicação, em meio de cultura MS, suplementado com BAP nas concentrações de 0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹. As avaliações foram referentes à sobrevivência das plântulas, à contaminação fúngica e bacteriana e ao número de brotações por explante. A germinação *in vitro* das sementes foi superior a 98% com taxa de sobrevivência das plântulas maior que 50%. A porcentagem total de contaminação fúngica foi de apenas 2%, isenta de culturas bacterianas. Não houve multiplicação das brotações apicais de *C. rubriflora* em um único subcultivo *in vitro* em meio de cultura com BAP. Os resultados demonstram a viabilidade da germinação *in vitro* de sementes de *C. rubriflora* para a introdução e posterior processo de micropropagação, abrindo perspectivas para maiores estudos com a espécie.

Palavras-chave: Paineira rubi. Mata seca. Conservação de espécie. Micropropagação.

In vitro establishment of *Ceiba rubriflora* Carv.-Sobr. e L. P. Queiroz: an endemic species of the São Francisco River Valley

Abstract

Ceiba rubriflora is a native Brazilian species, critically endangered, from region of middle São Francisco River. *C. rubriflora*'s seed production is scarce because of its endemism. Therefore, the micropropagation is presented as a tool for its propagation and seedling production. Thus, the aim of the present study was to evaluate the *in vitro* establishment of *C. rubriflora* seeds after disinfection with different concentrations of active chlorine and testing the *in vitro* multiplication of apical shoots in different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). The *in vitro* establishment of seeds was performed in MS culture medium, which were previously submitted to sodium hypochlorite (NaOCl) disinfection at concentrations of 0.0; 0.5; 1.0; 1.5; and 2.5% active chlorine. Apical shoots of *in vitro* germinated seedlings were used as explants for multiplication, in MS culture medium, supplemented with BAP in concentrations of 0.0; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹. The evaluations were related to seedling survival, fungal and bacterial contamination and

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Curso de Engenharia Florestal, Campus Montes Claros. Montes Claros, MG. Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-2903-4357>

²Universidade Federal de Minas Gerais, Curso de Engenharia Florestal, Campus Montes Claros. Montes Claros, MG. Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-0800-5001>

³Universidade Federal de Minas Gerais, Curso de Engenharia Florestal, Campus Montes Claros. Montes Claros, MG. Brasil. <https://orcid.org/0000-0003-3691-7294>

⁴Universidade Federal de Lavras, Curso de Engenharia Florestal. Lavras, MG. Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-8640-5719>

* Autor para correspondência: lsoliveira@ufmg.br

number of shoots per explant. The *in vitro* germination of seeds was satisfactory, with survival rate higher than 98%. The percentage of *in vitro* contamination was only 2%, free from bacterial cultures. The apical shoots of *C. rubriflora* were not multiplied in a single subculture *in vitro* in BAP culture medium. The results demonstrate the viability of *in vitro* germination of *C. rubriflora* seeds for the introduction and subsequent micropropagation process, opening perspectives for further studies with the species.

Keywords: Ruby paineira. Calcareous Dry Forest. Species conservation. Micropropagation.

Introdução

Ceiba rubriflora é uma árvore nativa do Brasil, de ocorrência natural na região do médio São Francisco nas fitofisionomias da Caatinga (*stricto sensu*), Floresta Estacional Semidecidual, e vegetação sobre Afloramentos Rochosos (REFLORA, 2019). As árvores podem atingir mais de 20 metros de altura e a espécie se destaca na paisagem árida, pelo florescimento em plena estação seca, com flores de pétalas vermelhas. (Carvalho-Sobrinho e Queiroz, 2008; Mahr, 2009).

Atualmente, o habitat natural da *C. rubriflora* encontra-se fragmentado e degradado. Cerca de 46% da cobertura vegetal original da Caatinga foi suprimida da sua área original pela intervenção humana (MMA, 2019). Isso agrava-se pelo endemismo da *C. rubriflora*, pois a baixa densidade de indivíduos numa área, limita a produção de sementes, que garantiria a perpetuação da espécie. Em decorrência disso, a *C. rubriflora* encontra-se sob risco de extinção e assim há urgência na realização de estudos relacionados a propagação da espécie.

Nesse contexto, a micropropagação apresenta-se como uma ferramenta com potencial de viabilizar a conservação e multiplicação de espécies e/ou genótipos em risco de extinção, tais como a *C. rubriflora*. Muitas espécies florestais ameaçadas de extinção com valor comercial e ornamental, tais como *Moringa peregrina*, *Renanthera imschootiana*, *Aegiphila verticillata*, *C. petandra*, *Cariniana legalis*, têm sido protegidas e multiplicadas via propagação *in vitro* (Al-Khateeb et al., 2013; Wu et al., 2014; Almeida et al., 2015; Aragão et al., 2018). Contudo, não há ainda estudos na literatura que reportam o cultivo *in vitro* de *C. rubriflora*.

O estabelecimento *in vitro* corresponde à primeira etapa da micropropagação. A avaliação de agentes desinfetantes na introdução *in vitro* dos explantes, como o cloro ativo, tem sido determinante para o seu sucesso (Pasqual et al., 2010; Brondani et al., 2013). Ademais, vários fatores podem interferir na multiplicação *in vitro* dos explantes, como reguladores de crescimento, a otimização de suas concentrações potencializa a produção de propágulos vegetativos. O regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido utilizado com eficiência para a multiplicação *in vitro* dos diversos tipos de explantes de diferentes espécies (Oliveira et al., 2015).

Dada a importância de estabelecer e desenvolver de um protocolo de cultivo *in vitro* de *C. rubriflora*, os objetivos do presente estudo foram: (1) avaliar a ação

hipoclorito de sódio (NaOCl) na desinfestação das sementes para germinação *in vitro* e (2) avaliar o efeito do BAP na multiplicação *in vitro* de brotações apicais.

Material vegetal

Frutos da *C. rubriflora* foram coletados de uma árvore matriz crescendo em um afloramento calcário numa área de Mata Seca na Fazenda Pequi-Porteirinha (16°45'38"S, 43°54'07"W) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Montes Claros - MG. Para a realização do presente estudo, um dos frutos foi armazenado em ambiente seco e à temperatura ambiente até sua completa maturação e deiscência no Laboratório de Melhoramento Florestal da UFMG, campus Montes Claros. Após abertura espontânea do fruto procedeu-se o beneficiamento das sementes e as mesmas foram armazenadas em recipiente plástico sob temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) durante 6 meses.

Estabelecimento e multiplicação *in vitro*

O procedimento foi executado no Laboratório de Biotecnologia, do Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias (CPCA) do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

No estabelecimento *in vitro* foi realizado experimento de desinfestação das sementes de *C. rubriflora*. Inicialmente, as sementes foram lavadas em água corrente durante 20 minutos com duas gotas de detergente Spa Soft® neutro. Lavadas em água deionizada autoclavada por três vezes e em capela de fluxo laminar, as sementes foram imersas em solução de álcool (70%) durante 30 segundos, em seguida, imersas em diferentes soluções de NaOCl nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,5% (v/v) de cloro ativo por 15 minutos e adicionadas 3 gotas do detergente Spa Soft® neutro, em agitação constante. Ao término da desinfestação, as sementes foram lavadas em água deionizada autoclavada por quatro vezes e então inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com sacarose (30,0 mg L⁻¹), solidificado com ágar (7,0 mg L⁻¹) e pH ajustado para 5,8. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos e 30 repetições por tratamento, onde cada unidade experimental foi constituída por um tubo de ensaio contendo uma semente. Aos 21 dias foram avaliados o número de sementes germinadas (após emissão

da radícula) e de plântulas sobreviventes; o número de sementes com contaminação fúngica e bacteriana.

Na etapa de multiplicação *in vitro*, após a germinação, brotações apicais foram excisadas das plântulas de *C. rubriflora* germinadas *in vitro* e inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, com pH ajustado para 5,8, suplementado com sacarose (30,0 mg L⁻¹), ágar (7,0 mg L⁻¹) e 6-benzilaminopurina (BAP) disposto em três tratamentos nas concentrações de 0; 1,0 e 2,0 mg/L. O experimento foi realizado em delineado experimental inteiramente casualizado (DIC), com 3 tratamentos e 15 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída por um tubo de ensaio contendo um ápice meristemático. Após 21 dias o experimento foi avaliado pela contagem do número de brotações nos explantes apicais.

Em ambos os experimentos, os tratamentos foram mantidos em câmara de crescimento por 21 dias, com

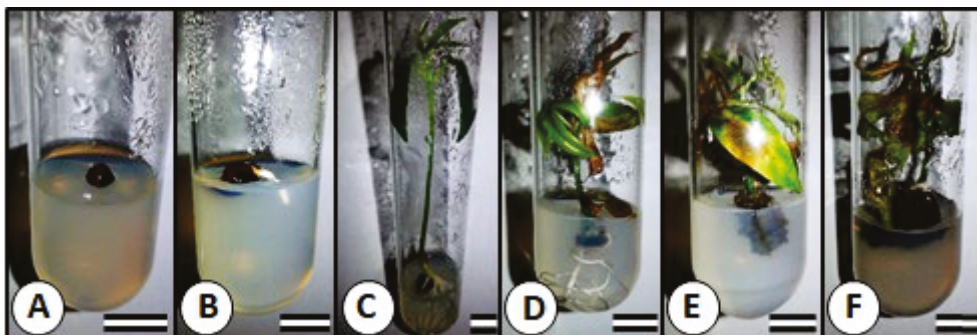
fotoperíodo de 16 horas, na temperatura de 25±2°C, sob densidade média de fluxo de fótons de 26±2 μmol m⁻² s⁻¹, obtidas por lâmpadas brancas fluorescentes.

Os dados mensurados foram submetidos ao teste de Hartley ($p < 0,01$) e de Lilliefors ($p < 0,01$) previamente à análise de variância (ANOVA, $p < 0,01$) a 1% de probabilidade de erro, sendo as médias comparadas através de um gráfico de barras.

Cultivo *in vitro* de *C. rubriflora*

O estabelecimento *in vitro* das sementes de *C. rubriflora* com a desinfestação com NaOCl demonstrou ser um procedimento eficiente, com 98% de germinação, considerando todos os tratamentos, demonstrando que a ação do cloro ativo sobre as sementes não compromete sua germinação (FIGURA 1).

Figura 1 – Etapas do estabelecimento *in vitro* de sementes e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Ceiba rubriflora*. (A) Semente inoculada em meio MS; (B) Emissão da radícula; (C) Plântula desenvolvida; Brotações apicais de *C. rubriflora* no meio de multiplicação *in vitro* com formação de raízes adventícias (D) e de calos na região basal nos tratamentos com 1,0 mg L⁻¹ (E) e 2,0 mg L⁻¹ (F) de BAP, após 30 dias de cultivo *in vitro*. Barras = 1 cm.



Não houve diferença entre estes quanto a sobrevivências das plântulas, após 21 dias de cultivo *in vitro*. No entanto, nem todas as sementes que germinaram completaram seu desenvolvimento, após emissão de radícula. No presente estudo, a sobrevivência de plântulas foi superior a 50% para todos os tratamentos (FIGURA 2), indicando que as sementes *C. rubriflora* coletados de frutos ainda fechados não necessitam de tratamento de desinfestação.

Ademais, a desinfestação das sementes é eficiente mesmo em concentrações baixas, inferior ou igual a 0,5% de cloro ativo, visto que as plântulas germinadas *in vitro* não apresentaram contaminação bacteriana e a taxa de contaminação fúngica total foi de apenas 2%. Tal resultado, pode estar correlacionado ao fato de as sementes terem sido obtidas de frutos imaturos, antes da sua deiscência. Lazarotto *et al* (2010) afirmam que a contaminação das sementes e frutos de essências florestais ocorre predominantemente no solo, onde são colonizados por diversos fungos. A qualidade sanitária

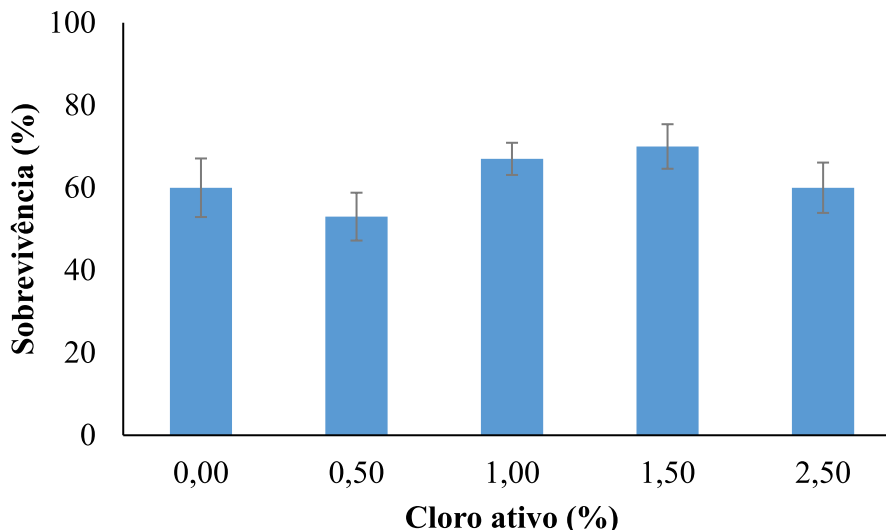
de sementes de espécies florestais tem papel importante na sua germinação, devido a ocorrência de perdas por deterioração e lesões ao embrião, o que enfatiza a importância de tratamentos de assepsia eficazes (Lazarotto *et al.*, 2011). Portanto, atrelado ao tratamento de assepsia, a adoção de práticas que minimizem a contaminação das sementes, como a coleta do fruto antes da sua queda e deiscência, além do armazenamento laboratorial, pode ser decisiva para o sucesso do estabelecimento *in vitro*.

O cultivo *in vitro* dos explantes apicais de *C. rubriflora* em meio de cultura suplementado com BAP não proporcionou o desenvolvimento de novas brotações. A dominância apical dos explantes e o fato de ter sido realizado um único cultivo *in vitro*, provavelmente, influenciou na ausência de multiplicação de novas brotações. Por sua vez, no tratamento isento de BAP, os explantes apresentaram a formação de raízes adventícias (FIGURA 1D). Nos tratamentos com BAP, os explantes apresentaram a formação de calos em sua região basal, sendo estes maiores na concentração de 2,0 mg L⁻¹ (FIGURA

1E-F). O uso de outro regulador de crescimento com ação citocínica, além de BAP, pode aumentar a proliferação de brotações de *C. rubriflora*, conforme reportado para *C. pentandra* com o uso das citocininas, BAP, cinetina (CIN) e thidiazuron (TDZ) (Silva et al., 2010). Além disso, a resposta calogênica dos explantes ao BAP pode ser explicada pelo desequilíbrio no balanço endógeno entre auxina e citocinina nos mesmos, acarretando um

desenvolvimento celular desorganizado, ou seja, formação de calos (Takahashi, 2002). A literatura reporta que além do uso de reguladores de crescimento no meio de cultura, a retirada do meristema apical no primeiro subcultivo é uma alternativa para a redução da dominância apical e indução do desenvolvimento das brotações axilares dos explantes (George et al., 2008; Stephin et al., 2019).

Figura 2 – Valores médios da sobrevivência de plântulas de *C. rubriflora* nos tratamentos com hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,5 % de cloro ativo na desinfestação das sementes no estabelecimento *in vitro*. Barras indicam o desvio padrão da média.



Os resultados apresentados neste estudo representam um avanço na micropropagação de *C. rubriflora*. Demonstrando um esforço para desenvolver metodologias de preservação e proteção desta espécie endêmica. Além disso, novas perspectivas se abrem para o desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* com fins de obtenção de mudas de *C. rubriflora* em larga escala

Conclusão

O estabelecimento *in vitro* de sementes de *C. rubriflora* a partir de tratamento de assepsia com NaOCl, independente da concentração de cloro ativo, é eficiente. A germinação *in vitro* total das sementes foi superior a 98% e com taxa de sobrevivência de plântulas superior a

50%. As concentrações de BAP não induziram brotações a partir de explantes apicais de *C. rubriflora* em um único cultivo.

Agradecimentos

A Professora Rúbia dos Santos Fonseca pela disponibilização dos frutos de *C. rubriflora* para a realização do estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Pró-reitoria da Pesquisa da UFMG pela concessão de bolsa de Iniciação Científica à primeira autora.

Referências

Al-Khateeb, W., Bahar, E., Lahham, J.; Schroeder, D. 2013. Regeneration and assessment of genetic fidelity of the endangered tree *Moringa peregriana* (Forsk.) Fiori using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). *Physiol Mol Biol Plants*, 19: 157–164. doi: <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0149-z>.

Almeida, L. M. S.; Morais, L. E.; Resende, C. F.; Braga, V. F.; Pereira, P. F.; Silva, R. A. C.; Peixoto, P. H. P. 2015. Micropropagation and acclimatization of *Aegiphila Verticillata* Vell.: an endangered woody species. *Revista Árvore*, 39: 305–314. doi: <https://dx.doi.org/10.1590/0100-67622015000200010>.

Aragão, V. P. M.; Navarro, B. V.; da Silva, A. T.; Silveira, V.; Santa-Catarina, C. 2018. Micropropagation of *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze, an endangered hardwood tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 13: 41–50. Disponível em: <http://pccm.ufla.br/index.php/plantcellculturemicropropagation/article/view/116/60>.

Brondani, G. E.; Oliveira, L. S. D.; Bergonci, T.; Brondani, A. E.; França, F. A. M.; Silva, A. L. L. D.; Gonçalves, A. N. 2013. Chemical sterilization of culture medium: a low cost alternative to *in vitro* establishment of plants. *Scientia Forestalis*, 41: 257–264. Disponível em: <https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr98/cap11.pdf>.

- Carvalho-Sobrinho, J. G.; Queiroz, L. P. 2008. *Ceiba rubriflora* (Malvaceae: Bombacoideae), a new species from Bahia, Brazil. Kew Bulletin, 63: 649–653. doi: <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs12225-008-9070-6>.
- George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G. J. (Ed.). 2008. Plant propagation by tissue culture: volume 1. Springer Netherlands.
- Lazarotto, M.; Muniz, M. F. B.; Santos, A. F. 2010. Detection, transmission, pathogenicity and chemical treatment of fungi in *Ceiba speciosa* seeds. Summa Phytopathologica, 36:134–139. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000200005>.
- Lazarotto, M.; Piveta, G.; Muniz, M. F. B.; Reiniger, L. R. S. 2011. Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. Semina: Ciências Agrárias, 32, 1243–1250. doi: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1243>.
- Mahr, D. L. 2009. Some Succulent Trees of Bahia and Minas Gerais, Brazil. Cactus and Succulent Journal, 81: 138–146. doi: <https://doi.org/10.2985/015.081.0308>.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. 2019. Caatinga. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473–497. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Oliveira, L. S.; Brondani, G. E.; Batagin-Piotto, K. D.; Calsavara, R.; Gonçalves, A. N.; Almeida, M. D. 2015. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. Australian Forestry, vol. 78, 219–231. doi: <https://doi.org/10.1080/00049158.2015.1073211>.
- Pasqual, M.; Dutra, L. F.; Araujo, A. G.; Pereira, A. R. 2010. Prevenção de Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. 61–161. In: Scherwinski-Pereira, J.E. (Ed.). Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, Brasil: Embrapa Informação Tecnológica.
- REFLORA - Flora do Brasil 2019 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.
- Silva, P. P.; Contim, L. A. S.; Freitas, D. V.; Aride, P. H. R.; Santos, A. L. W. 2010. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). Scientia Agraria, 11: 437–443. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v11i6.20389>.
- Stephin, S., Gangaprasad, A., Mathew, S.P. 2019. Enhanced *in vitro* shoot multiplication of *Piper sarmentosum* by suppression of apical dominance. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 89: 1–8. doi: <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01086-w>.
- Takahashi, E. K. Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística. 2002. Tese Doutorado. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 137f. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-03122002-083637/>.
- Wu, K., Zeng, S., Lin, D., da Silva, J. A. T., Bu, Z., Zhang, J., & Duan, J. 2014. In vitro propagation and reintroduction of the endangered *Renanthera imschootiana* Rolfe. Plos One, 9: e110033. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110033>.