

Germinação *in vitro* de sementes e parâmetros morfofisiológicos de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC.

Marcelo Vielmo Afonso¹, Juçara Terezinha Paranhos²,
Luciane Almeri Tabaldi² & Hilda Hildebrand Soriani³

¹Instituto Federal Farroupilha, Campus Panambi, Coordenação Geral de Ensino, Laboratórios, Rua Erechim, 860, CEP 98280-000, Panambi, RS, Brasil. marcelovielmo@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Biologia, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil, jtparanhos@gmail.com, lutabaldi@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Santa Maria, Campus Frederico Westphalen, Departamento de Engenharia Florestal, Linha 7 de setembro s/n, BR 386 Km 40, CEP 98400-000, Frederico Westphalen, RS, Brasil, hildasoriani@gmail.com

Recebido em 15.IV.2016

Aceito em 24.V.2018

DOI 10.21826/2446-8231201873105

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar a germinação *in vitro* de sementes e parâmetros morfofisiológicos de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Nos bioensaios de germinação, sementes foram imersas em soluções de 0,0; 300 e 600 mg L⁻¹ GA₃ por 24 ou 48h. As plântulas provenientes da germinação *in vitro* foram doadoras de microestacas, e estas inoculadas em meio de cultivo MS completo suplementado com 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de AIB. O uso de GA₃ não favorece maiores taxas de germinação em sementes de *T. catharinensis*, sendo a velocidade de germinação afetada negativamente em sementes expostas ao GA₃ por um período maior (48h). A rizogênese em microestacas de *T. catharinensis* pode ser induzida sem a necessidade de fitoreguladores. No entanto, os parâmetros morfofisiológicos podem ser maximizados com a adição de AIB ao meio de cultura, demonstrando que o uso de AIB potencializa a produção de microestacas assépticas de *T. catharinensis*.

Palavras-chave: ácido giberélico, ácido indolbutírico, cobraína

ABSTRACT – *In vitro* seed germination and morphophysiological parameters of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. microcuttings. The aim of this study was to evaluate *in vitro* seed germination and the morphophysiological parameters of *Tabernaemontana catharinensis* microcuttings. In the germination bioassays, the seeds were immersed at solutions of 0.0; 300; and 600 mg L⁻¹ GA₃ for 24 or 48h. The seedlings from *in vitro* germination were used to produce microcuttings, which were inoculated in MS growth medium supplemented with 0.0; 1.0; 2.0; and 4.0 mg L⁻¹ of IBA. The use of GA₃ did not lead to higher seed germination rates in *T. catharinensis* and the germination rate was negatively affected in seeds exposed to GA₃ for longer periods (48h). Rhizogenesis of *T. catharinensis* microcuttings can be induced without the need for phytohormones. However, the morphophysiological parameters can be improved with the addition of IBA to the growth medium, showing that the use of IBA potentiates the production of aseptic microcuttings of *T. catharinensis*.

Keywords: gibberellic acid, indolebutyric acid, cobraína

INTRODUÇÃO

O número limitado de estudos dos principais processos básicos da germinação das sementes de plantas lenhosas e nativas tem dificultado a realização de programas de reflorestamento e melhoramento genético com espécies de potencial medicinal (Nascimento *et al.* 2007). Devido aos efeitos dos promotores de crescimento na germinação das sementes e crescimento e desenvolvimento das plantas, muitos compostos e combinações desses produtos têm sido pesquisados com a finalidade de resolver problemas do sistema de produção e melhorar qualitativa e quantitativamente a produtividade (Castro & Vieira 2003).

Tabernaemontana catharinensis A. DC. (*Apocynaceae*) é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, sendo também encontrada na Argentina, Paraguai e Bolívia (Pereira *et al.* 2008). É uma planta pioneira medindo de 3 a 8 m de altura, popularmente conhecida como “cobraína”, “jasmim-cata-vento”, “leiteira-de-dois-irmãos” e “casca-de-cobra”

(Quinet & Andreato 2005). O chá ou a infusão das folhas e cascas são utilizados na medicina popular como antídoto para picadas de cobra, para aliviar dor de dente, tratamento de feridas, herpes, tumores e ainda como hemostática, hipotensora, cardiotônica e também como vermífugo (Pereira *et al.* 2005).

A espécie é rica em flavonoides, saponinas, terpenos, alcaloides e esteroides (Bélo *et al.* 2009), possuindo capacidade bioinseticida (Ferreira *et al.* 2001) e atividade antioxidante devido ao acúmulo de rutina, quercetina e ácido clorogênico (Piana *et al.* 2014). A espécie, além de possuir potencial ornamental, é indicada para reflorestamentos mistos destinados à recuperação de mata nativa (Sobral *et al.* 2006).

A busca por mecanismos para acelerar e uniformizar a germinação das sementes para obtenção de plântulas com alta qualidade genética e fitossanitária são imprescindíveis e constituem o ponto de partida para o estabelecimento de povoamentos comerciais produtivos e para a conservação

e estocagem de germoplasma, especialmente espécies consideradas de interesse medicinal e florestal (Galdiano *et al.* 2012). No entanto, a falta de informações para obtenção de mudas de espécies nativas e, em alguns casos, a falta de viabilidade de suas sementes, indicam o uso de técnicas biotecnológicas como alternativa na sua multiplicação (Bortolini *et al.* 2009).

Nesse sentido, a germinação *in vitro* para algumas espécies permite maior germinabilidade das sementes, possivelmente em função das condições do cultivo *in vitro* oferecer maior controle do que as condições de viveiro (Noletto & Silveira 2004). Além disso, as plântulas obtidas a partir da germinação das sementes *in vitro* podem ser utilizadas para estudos alternativos que visem o desenvolvimento de protocolos, para servir de base para outras técnicas biotecnológicas (Xavier *et al.* 2009).

Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *Tabernaemontana catharinensis* e o enraizamento, produção de biomassa e conteúdo de pigmentos de microestacas oriundas das plântulas obtidas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Bioensaios de germinação

Frutos de *Tabernaemontana catharinensis* foram coletados no terço médio lateral de cinco matrizes com cerca de 4,0 m de altura e localizadas em remanescente vegetal, no município de Ijuí, região Noroeste do Rio Grande do Sul (28°26'07"S e 53°57'50"O), no mês de junho de 2015. No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, as sementes foram submetidas ao processo de secagem natural sobre bandeja com fundo de tela por cinco dias. Em câmara de fluxo laminar as mesmas foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos e após, enxaguadas três vezes em água destilada e esterilizada. As sementes foram imersas em soluções aquosas de ácido giberélico (GA₃) nas concentrações de 0,0; 300 e 600 mg L⁻¹, em dois regimes de tempo, 24 e 48h. Para as soluções aquosas de ácido giberélico, o GA₃, em câmara de fluxo laminar, foi dissolvido em três gotas de álcool 70% e após, acrescentado água destilada e autoclavada.

Após a imersão, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio medindo 25 x 150 mm (uma semente por tubo) contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962), com 30% dos sais minerais, 15 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 mL L⁻¹ de fungicida Maxim® (princípio ativo fludioxonil) e 0,3 mg L⁻¹ de bactericida Chlortetracycline. Estes produtos foram utilizados pelo fato das espécies arbóreas nativas apresentarem, normalmente, diversidade de microrganismos contaminantes endógenos, os quais não são eliminados pela desinfestação. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N e após semi-solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar em pó bacteriológico

puro e esterilizado em autoclave a 1,0 atm, 120 °C, por 20 minutos.

Os tubos foram fechados com papel alumínio e as culturas foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 horas (densidade de fluxo de fótons de 35 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias).

O experimento foi em esquema bifatorial 3 x 2 (três concentrações de GA₃ e dois tempos de imersão), totalizando seis tratamentos com quatro repetições por tratamento e 15 sementes por repetição, em delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas a cada três dias, até a estabilização da germinação em cada tratamento. Os parâmetros avaliados foram a percentagem de germinação (%G), conforme Labouriau & Valadares (1976), sendo considerada geminada quando os cotilédones estavam totalmente livres acima do meio de cultivo, e o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme Maguire (1962).

Enraizamento *in vitro* de microestacas

Plântulas com 90 dias de idade obtidas dos bioensaios da germinação das sementes foram doadoras de microestacas para o estudo de enraizamento *in vitro*. Microestacas de 4,0 cm de comprimento, contendo meristema apical e três pares de folhas, foram inoculadas em tubos de ensaio (mesmas dimensões do experimento anterior) contendo 15 mL de meio MS completo, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e adicionado fungicida Maxim® 2,5 μL L⁻¹, bactericida Chlortetracycline 0,15 mg L⁻¹, pH do meio de cultura ajustado para 5,8 ± 0,1 e semi-solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar antes da esterilização em autoclave. Aos meios foi adicionado ácido indolbutírico (AIB), testando-se as concentrações 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹, totalizando quatro tratamentos com quatro repetições por tratamento e sete explantes por repetição em delineamento experimental inteiramente casualizado.

As culturas foram mantidas nas mesmas condições do estudo de germinação e aos 30 dias após a inoculação, as avaliações foram realizadas obtendo-se a percentagem de enraizamento. Através de quatro microestacas por repetição foi obtida a massa fresca das raízes em balança analítica de precisão em miligramas (mg), comprimento das raízes, área superficial, volume e número de raízes primárias, através da digitalização com auxílio de um scanner Epson 11000 XL e analisadas com ajuda do Software WinRhizo Pro.

Para obtenção dos teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas das microestacas enraizadas, o material vegetal foi macerado em acetona 80%, determinando-se os teores de clorofilas *a*, *b*, clorofilas totais, relação clorofila *a/b* e carotenoides (mg g⁻¹ MF), por espectrofotometria de UV a 663, 645 e 480 nm, conforme metodologia de Arnon (1949).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das variáveis dos experimentos comparadas pelo teste Scott-knott, a 5% de probabilidade de erro, utilizando o aplicativo Sisvar (Ferreira 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância não demonstraram efeito significativo entre os tratamentos pelo teste de Scott-knott para a percentagem de germinação (Fig. 1). As concentrações de GA_3 e tempos de imersão não influenciaram significativamente a germinação das sementes, ficando esta numa faixa de 68 a 83%, não diferindo entre si.

Embora o ácido giberélico, considerado ativador enzimático endógeno, promove a germinação e sua aplicação exógena influencia o metabolismo protéico (Braun *et al.* 2010), os tratamentos sem GA_3 (controles), independentemente do tempo de imersão, também responderam satisfatoriamente para percentagem de germinação.

O ácido giberélico promove a germinação, por influenciar o metabolismo proteico, podendo dobrar a taxa de síntese de proteínas das sementes favorecendo o alongamento celular, fazendo com que a raiz primária rompa os tecidos que restringem o seu crescimento (Braun *et al.* 2010). Entretanto, neste estudo, a presença de GA_3 , independentemente do tempo de imersão, não mostrou efeito na percentagem de germinação das sementes. Provavelmente, as sementes de *Tabernaemontana catharinensis* não possuem dormência intrínseca dependente deste fitoregulador ou estas sementes possuem adequado nível endógeno do mesmo.

Estes resultados também foram observados em outras espécies, de acordo com Sousa *et al.* (2002) a aplicação de ácido giberélico em sementes de porta-enxertos cítricos (Limoeiro-'Cravo'; Tangerineira-'Sunki'; Tangerineira-'Cleópatra'; 'UFLAD-4' e 'UFLAD-5) também não surtiu efeito significativo sobre a germinação, tal fato foi atribuído a um adequado nível endógeno do referido hormônio nas sementes.

Para Dalastra *et al.* (2010), foi verificada que em sementes não incisas de noqueira-macadâmia (*Macadamia integrifolia*), houve redução na emergência das plântulas com a elevação da concentração de ácido giberélico, da ordem de 25,51%, quando comparada a maior concentração (450 mg L⁻¹) em relação ao tratamento controle. Scalon *et al.* (2006) também observaram que não houve efeito da aplicação de giberelina em tratamento pré-germinativo de sementes de jacarandá (*Jacaranda mimosifolia*). Segundo esses autores, as sementes provavelmente possuíam teores endógenos de giberelinas suficientes para a germinação.

Para a variável IVG houve diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 2); sementes imersas por 24 horas em 300 e 600 mg L⁻¹ de GA_3 , quando comparadas com àquelas imersas por 48 horas nas referidas concentrações mostraram maior velocidade de germinação. Além disso, sementes imersas em 600 mg L⁻¹ de GA_3 apresentaram menor IVG em relação as concentrações 0,0 e 300 mg L⁻¹ de GA_3 dentro do tempo de imersão de 48 horas.

Embora a aplicação de giberelina geralmente induza a uma maior rapidez na germinação de sementes observada nos primeiros dias de tratamento, culminando posteriormente

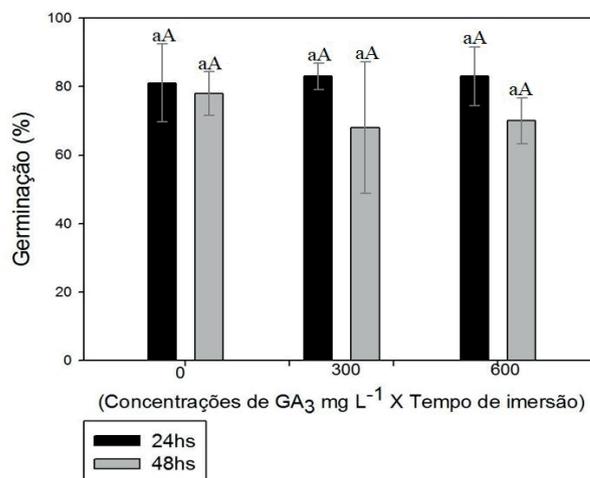


Fig. 1. Percentagem de germinação das sementes de *Tabernaemontana catharinensis* em condições *in vitro*. * Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de GA_3 dentro do tempo de imersão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tempo de imersão dentro da mesma concentração de GA_3 , pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

em um maior vigor (Aragão *et al.* 2006), neste trabalho não foi observado esta tendência, evidenciando uma redução no IVG nas sementes expostas a um maior tempo de imersão (48h) nas concentrações de 300 e 600 mg L⁻¹ de GA_3 , quando comparado com sementes imersas nas referidas concentrações por 24h. Estes resultados também foram observados por Stein *et al.* (2007) na germinação *in vitro* de sementes de ingazeiro (*Inga vera*). Neto *et al.* (2007) observaram que a embebição em 200 mg L⁻¹ de GA_3 proporcionou aumento significativo do IVG, indicando efeito positivo desta substância na melhoria

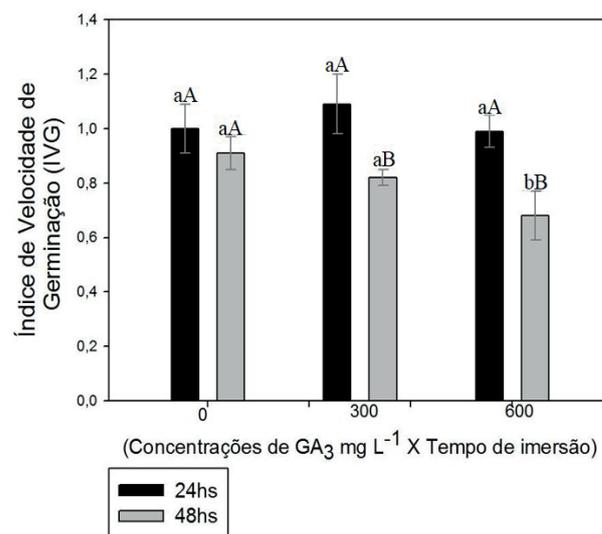


Fig. 2. Índice de velocidade de germinação das sementes de *Tabernaemontana catharinensis* em condições *in vitro*. * Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações de GA_3 dentro do tempo de imersão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre o tempo de imersão dentro da mesma concentração de GA_3 , pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade.

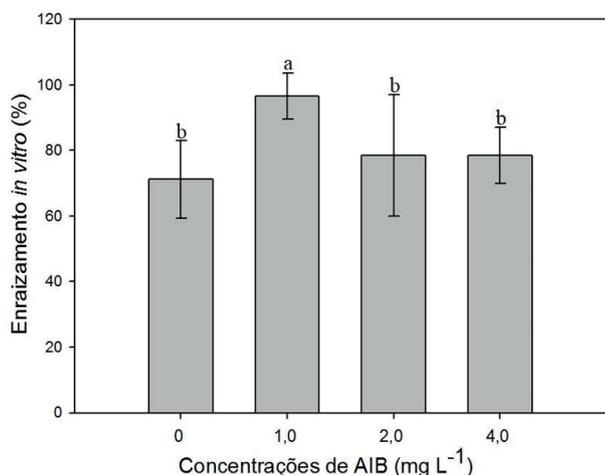


Fig. 3. Percentagem de enraizamento das microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* em diferentes concentrações de AIB. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

do desempenho das sementes de jenipapeiro (*Genipa americana*), evidenciando que cada espécie apresenta um comportamento.

Ainda, suplementações com fitorreguladores de crescimento podem causar efeito inibidor devido à ocorrência de sinergismo entre as concentrações aplicadas e a quantidade endógena de giberelina existente em sementes (Scalon *et al.* 2006). Essa inibição pode ocorrer devido à toxicidade causada pelo excesso do fitorregulador no meio de cultura, ou pelo prolongado período de tempo em que a semente permanece exposta a ele, podendo provocar alterações fisiológicas e morfológicas (Vicente *et al.* 2009).

No enraizamento de microestacas houve efeito das diferentes concentrações de AIB na percentagem de microestacas enraizadas (Fig. 3). Maior percentagem de enraizamento foi observada na concentração de 1,0 mg L⁻¹ (96 %), diferindo dos demais tratamentos. Nas concentrações de 0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de AIB as percentagens de enraizamento não diferiram, apresentando uma faixa de 71 a 78% de microestacas enraizadas.

As auxinas controlam uma grande variedade de processos implicados no desenvolvimento das plantas, entre eles a iniciação de novos meristemas de raízes, apresentando maiores efeitos na formação de raízes adventícias (Rocha *et al.* 2007). Dentre as auxinas, o AIB tem apresentado maior eficiência no enraizamento, no entanto, a utilização do regulador de crescimento bem como

as concentrações ótimas a serem utilizadas é específica para cada situação (Xavier *et al.* 2009). A ação das auxinas ocorre, inicialmente, em nível celular nos meristemas primário e secundário, estimulando a divisão celular e o subsequente alongamento das células, sendo que essa ação inicial das auxinas culmina com a formação das raízes (Ford *et al.* 2002).

Altas taxas de enraizamento encontradas neste trabalho, acima de 70%, incluindo no meio de cultura sem AIB, podem caracterizar alto vigor das microestacas, condicionado a fatores como reservas nutricionais adequadas, status hídrico ótimo, sem aparente condição de estresse. Além disso, esses resultados podem indicar juvenildade do material utilizado e balanço hormonal endógeno proporcionados pelas condições de cultivo *in vitro*, induzindo a formação de raízes adventícias sem a necessidade do uso de fitorreguladores (Xavier *et al.* 2009).

Estacas apicais, geralmente utilizadas na microestaquia, são mais propensas à formação de raízes devido ao grau de maturação fisiológica e de lignificação menor. Acrescenta-se que as auxinas são sintetizadas principalmente em regiões de crescimento ativo, como gemas terminais e primórdios foliares, contribuindo para elevação dos níveis endógenos desse fitorregulador nas estacas apicais, refletindo em maior potencial de enraizamento (Xavier *et al.* 2009, Borges *et al.* 2011). Silva *et al.* (2010), estudando a propagação da espécie arbórea *Calophyllum brasiliense* através de miniestacas, utilizando propágulos juvenis oriundos de mudas produzidas por sementes, relataram que não foi necessário o uso de reguladores vegetais para o enraizamento.

Dados de massa fresca, comprimento, área superficial, volume e número de raízes primárias são apresentados na tabela 1 e ilustrados na figura 4. Os resultados indicam um efeito significativo da adição de AIB nas variáveis analisadas. Para massa fresca, área superficial, volume de raízes e número de raízes primárias as concentrações de AIB promoveram um aumento significativo nesses parâmetros morfológicos do sistema radicular, comparado com o tratamento controle (ausência de AIB). Para comprimento de raiz, na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de AIB observase valor superior estatisticamente em relação as demais concentrações (15,96 cm).

Um sistema radicular mais desenvolvido pode influenciar positivamente na absorção de nutrientes e de água. Quando este for limitado reduz a eficiência das atividades, afetando posteriormente a produção de biomassa. Microestacas que

Tabela 1. Valores de massa fresca (MF), comprimento (COM), área superficial (AS), volume (VOL) e número de raízes primárias (N°R) de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., avaliadas aos 30 dias após a inoculação em concentrações de AIB. *Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

AIB (mg L ⁻¹)	MF (mg)	COM (cm)	AS (cm ²)	VOL (cm ³)	N°R
0,0	18,7 b	6,32 c	1,26 b	0,021 b	3,2 b
1,0	37,13 a	15,96 a	2,95 a	0,043 a	5,58 a
2,0	30,08 a	11,94 b	2,27 a	0,034 a	5,13 a
4,0	35,33 a	13,31 b	2,68 a	0,043 a	5,25 a
CV (%)	15,26	17,60	19,12	23,57	13,54



Fig. 4. Enraizamento de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* em diferentes concentrações de AIB aos 30 dias após a inoculação.

apresentam maior área superficial e número de raízes primárias são mais aptas a enfrentar condições de estresse hídrico, garantindo maiores taxas de sobrevivência. Além disso, maior número de raízes primárias aumenta o contato com regiões de absorção de água e de nutrientes. Segundo Maggio *et al.* (2007), a redução do volume radicular reduz a produção da biomassa fresca da raiz, reduzindo principalmente, a relação raiz/parte aérea, afetando o transporte dos sais do meio de cultivo para a parte aérea.

O crescimento acelerado das raízes pode ocorrer em função do estado nutricional da planta, mostrando que as microestacas são capazes de oferecer carboidratos, hormônios e outras substâncias necessárias ao alongamento das raízes, seja pela absorção do meio nutritivo e/ou pela produção através da fotossíntese (Dias *et al.* 2012). Segundo os autores, quanto mais bem nutrida à planta, maior o número de células produzidas pelos meristemas e mais longo será o eixo de crescimento. A formação de raízes adventícias é um processo que exige elevada quantidade de energia, por envolver a divisão celular, na qual as células predeterminadas alteram a rota morfofisiológica para formar os primórdios radiciais (Brondani *et al.* 2012). Segundo Haq *et al.* (2009), as reservas de carboidratos nas microestacas de *Olea europaea* constituíram a principal fonte de energia para a iniciação destes primórdios.

Em plantas obtidas *in vitro*, o sistema radicular mais vigoroso é considerado benéfico, uma vez que é

importante para a posterior aclimatização *ex vitro* (Canto *et al.* 2004). A aclimatização é uma fase relevante e ao mesmo tempo crítica da micropropagação, podendo causar baixa sobrevivência das plantas, devido principalmente ao estresse que sofrem na passagem da condição *in vitro* para o *ex vitro*. Nesse processo de aclimatização, as plantas passam de um ambiente de baixa transpiração para ambiente de alta taxa de transpiração, de um estado heterotrófico para o estado autotrófico, de um meio com alta disponibilidade de nutrientes para um substrato com menor disponibilidade e de um estado asséptico para ficar sujeito ao ataque de microrganismos patogênicos (Grattapaglia & Machado 1998). Todos esses fatores influenciam na sobrevivência das plantas.

Quando analisados os teores dos pigmentos fotossintéticos (Tab. 2), para os valores de chl *a*, chl total, relação chl *a/b* e carotenoides não houve diferença estatística entre os tratamentos com ou sem AIB no meio de cultura. Com relação aos teores de chl *b*, a presença de AIB no meio promoveu aumento nos mesmos, quando comparados com o valor obtido no tratamento sem AIB.

A auxina AIB tem efeito relevante na indução das raízes, pois este fitorregulador não só promove a divisão e o crescimento celular, como favorece o aumento da área superficial de raízes, e, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água e nutrientes do meio de cultura, potencializando o fluxo de nitrogênio, fósforo, potássio,

Tabela 2. Valores médios da clorofila *a* (Chl*a*), *b* (Chl*b*), total (Chl*total*), relação entre clorofila *a* e *b* (Chl *a/b*) e carotenoides em folhas de microestacas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. expostas à diferentes concentrações de AIB aos 30 dias após a inoculação. MF refere-se à matéria fresca. *Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

AIB (mg L ⁻¹)	Chl <i>a</i> (mg g ⁻¹ MF)	Chl <i>b</i> (mg g ⁻¹ MF)	Chl <i>total</i> (mg g ⁻¹ MF)	Chl <i>a/b</i>	Carotenoides (mg g ⁻¹ MF)
0,0	1,33 a	0,36 b	1,69 a	3,74 a	0,36 a
1,0	1,41 a	0,41 a	1,82 a	3,47 a	0,40 a
2,0	1,54 a	0,44 a	1,98 a	3,47 a	0,43 a
4,0	1,55 a	0,45 a	2,00 a	3,45 a	0,44 a
CV (%)	11,31	10,50	10,86	5,91	9,92

magnésio, cálcio e boro, importantes no processo de enraizamento (Ansari *et al.* 2004). Estes nutrientes também possuem papel fundamental no metabolismo vegetal por participar da biossíntese das clorofilas, especialmente o nitrogênio e o magnésio que compõem a estrutura química das mesmas (Streit *et al.* 2005), influenciando o conteúdo de clorofilas, especialmente clorofila *b* nos tecidos juvenis (Martínez-Morales *et al.* 2003).

Os maiores teores de clorofila *b* observados nos meios com AIB neste estudo são relevantes, pois este pigmento capta radiação luminosa de comprimento de onda diferente da clorofila *a* e transfere a energia para esta, a qual efetivamente atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese (Scalon *et al.* 2003). Uma maior taxa de absorção de radiação, promovida pela clorofila *b*, durante os últimos estádios da fase de enraizamento pode facilitar a aclimatização e aumentar a sobrevivência das plantas (Santana *et al.* 2008).

É possível evidenciar nas condições deste estudo que o uso do GA₃ não promoveu maiores taxas de germinação em sementes de *T. catharinensis*, sendo a velocidade de germinação afetada negativamente em sementes expostas ao fitorregulador por um período maior (48h). A rizogênese em microestacas de *T. catharinensis* pode ser induzida sem a necessidade de AIB no meio de cultura. No entanto, o uso deste regulador de crescimento proporciona maior sistema radicular. Conclui-se que os parâmetros morfofisiológicos podem ser maximizados com a adição de auxina ao meio de cultura, demonstrando que o uso de AIB favorece a produção de mudas mais vigorosas a partir de microestacas de *T. catharinensis*.

REFERÊNCIAS

- Ansari, S.A., Singh, S. & Rani, A. 2004. Inorganic salts influence IAA ionization and adventitious rhizogenesis in *Pongamia pinnata*. *Journal of Plant Physiology* 161(1):117-120.
- Aragão, C.A., Deon, M.D.I., Queiróz, M.A. & Dantas, B.F. 2006. Germinação e vigor de sementes de melancia com diferentes ploídias submetidas a tratamentos pré-germinativos. *Revista Brasileira de Sementes* 28(3):82-86.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1):1-15.
- Bélo, M., Barbosa, J.C., Pereira, P.S., Bertoni, B.W., Zingaretti, S.M. & Belebôn, R.O. 2009. Avaliação do efeito bioinseticida dos extratos de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae) e *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) sobre a mosca *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) (Gupta, 1970). *Revista Brasileira de Biociências* 7(3):235-239.
- Borges, S.R., Xavier, A., Oliveira, L.S., Melo, L.A & Rosado, A.M. 2011. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Árvore* 35(3):425-434.
- Braun, H., Lopes, J.C., Souza, L.T., Schmidt, E.R., Cavatte, R.P.Q. & Cavatte, P.C. 2010. Germinação in vitro de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. *Semina: Ciência Agrárias* 31(3):539-546.
- Brondani, G.E., Hoffmann, M.E., Gonçalves, A.N & Almeida, M. 2012. Determinação do teor de carboidratos em minicépas de *Eucalyptus benthamii*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* 3(1):51-60.
- Bortolini, M.F., Mayer, J.L.S., Ribas, C.Z., Koehler, H.S. & Carpanezzi, A.A. 2009. Enraizamento de estacas caulinares de quatro espécies do gênero *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae Juss.). *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 14(2):187-192.
- Canto, A.M.M.E., Souza, F.V.D., Costa, M.A.C., Souza, A.S., Ledo, C.A.S. & Cabral, J.R.S. 2004. Conservação in vitro de germoplasma de abacaxi tratado com paclotrazol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(7):717-720.
- Castro, P.R.E. & Vieira, E.L. 2003. Ação de bioestimulante na cultura do feijoeiro. In *Feijão irrigado: tecnologia e produtividade* (A.L. Fancelli & V. Dourado Neto, eds). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, p. 73-100.
- Dalstra, I.M., Pio, R., Entelmann, F.A., Werle, T., Uliana, M.B. & Scarpere Filho, J.A. 2010. Germinação de sementes de nogueira-macadâmia submetidas à incisão e imersão em ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia* 34(3):641-645.
- Dias, P.C., Xavier, A., Oliveira, L.S., Paiva, H.N. & Correia, A.C.G. 2012. Propagação vegetativa de progênies de meios-irmãos de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan) por miniestaca. *Revista Árvore* 36(3):389-399.
- Ferreira, D.F. 2008. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. *Revista Symposium* 6(2):36-41.
- Ferreira, J.T.B., Corrêa, A.G. & Vieira, P.C. 2001. *Produtos Naturais no Controle de Insetos*. Editora da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 176 p.
- Ford, Y.Y., Bonham, E.C., Cameron, R.W.F., Blake, P.S., Judd, H.L. & Harrison-Murray, R.S. 2002. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. *Plant Growth Regulation* 36(2):149-159.
- Galdiano Júnior, R.F., Mantovani, C., Pivetta, F.L. & Lemos, E.G.M. 2012. Crescimento in vitro e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. *Ciência Rural* 42(5):801-807.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A. 1998. Micropropagação. In *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso, eds). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, p. 183-260.
- Haq, I.U., Ahmad, T., Hafiz, I.A. & Abbasi, N.A. 2009. Influence of microcutting sizes and IBA concentrations on in vitro rooting of olive cv. 'Dolce Agogia'. *Pakistan Journal Botany* 41(3):1213-1222.
- Labouriau, L.G. & Valadares, M.E.B. 1976. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 48(2):263-284.
- Maggio, A., Raimondi, G., Martino, A. & Pascale, S. 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany* 59(3):276-282.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2(1):176-177.
- Martínez-Morales, L.J., Soto-Urzuá, L., Baca, B.E. & Sánchez-Ahédo, J.A. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology Letter* 228(2):167-173.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Nascimento, P.K.V., Franco, E.T.H. & Frassetto, E.G. 2007. Desinfestação e Germinação in vitro de sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenan). *Revista Brasileira de Biociências* 5(2):141-143.
- Neto, M.P., Dantas, A.C.V.L., Vieira, E.L. & Almeida, V.O. 2007. Germinação de sementes de jenipapeiro submetidas à pré-embebição em regulador e estimulante vegetal. *Ciência Agrotécnica* 31(3):693-698.
- Noletto, L.G. & Silveira, C.E.S. 2004. Micropropagação de copaíba. *Biociência Ciência e Desenvolvimento*. Disponível em: <http://www.biociencia.com.br/revista/bio33/copaiba.pdf>. Acessado em 01.02.2016.
- Pereira, C.G., Leal, P.F., Sato, D.N. & Meireles, M.A. 2005. Antioxidant and antimycobacterial activities of *Tabernaemontana catharinensis* extracts obtained by supercritical CO₂ + cosolvent. *Journal of Medicinal Food* 8(4):53-538.
- Pereira, P.S., França, S.C., Oliveira, P.V.A., Breves, C.M.S., Pereira, S.I.V., Sampaio, S.V., Nomizo, A. & Dias, D.A. 2008. Chemical constituents from *Tabernaemontana catharinensis* root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. *Química Nova* 31(1):20-24.

- Piana, M., Boligon, A.A., Brum, T.F., Zadra, M., Belke, B.V., Froeder, A.L.F., Fröhlich, J.K., Nunes, L.T., Pappis, L., Boligon, A.A. & Athayde, M.L. 2014. Phytochemical analysis and antioxidante capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Fruits and branches. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86(2):881-888.
- Quinet, C.G.P. & Andreato, R.H.P. 2005. Estudo Taxonômico e Morfológico das Espécies de Apocynaceae Adans na Reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Pesquisa Botânica* 56:13-74.
- Rocha, S.C., Quorim, M., Ribas, L.L.F. & Koehler, H.S. 2007. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. *Revista Árvore* 31(1):43-50.
- Santana, J.R.F., Paiva, R., Resende, R.K.S., Castro, E.M., Pereira, F.D. & Oliveira, L.M. 2008. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. *Ciência e Agrotecnologia* 32(2):640-644.
- Scalon, S.P.Q., Mussury, R.M., Scalon Filho, H., Francelino, C.S.F. & Florencio, D.K.A. 2006. Armazenamento e tratamento pré-germinativos em sementes de jacarandá (*Jacaranda cuspidifolia* Mart.). *Revista Árvore* 30(2):529-536.
- Scalon, S.P.Q., Mussury, R.M., Rigoni, M.R. & Scalon Filho, H. 2003. Crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns sob condição de sombreamento. *Revista Árvore* 27(6):753-758.
- Silva, R.L., Oliveira, M.L., Monte, M.A. & Xavier, A. 2010. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. *Agronomia Costarricense* 34(1):99-104.
- Sobral, M. & Jarenkow, J.A., Brack, P., Irgang, B.E., Larocca, J. & Rodrigues, R.S. 2006. Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande Do Sul, Brasil. Rima/Novo Ambiente, São Carlos. 350 p.
- Sousa, H.U., Ramos, J.D., Pasqual, M. & Ferreira, E.A. 2002. Efeito do ácido giberélico sobre a germinação de porta-enxertos cítricos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(2):496-499.
- Stein, V.C., Paiva, R., Soares, F.P., Nogueira, R.C., Silva, L.C., & Emrich, E. 2007. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. *Ciência e Agrotecnologia* 31(6):1702-1708.
- Streit, N.M., Canterle, L.P., Canto, M.W. & Hecktheuer, L.H.H. 2005. As clorofilas. *Ciência Rural* 35(1):748-755.
- Vicente, M.A.A., Almeida, W.A.B. & Carvalho, Z.S. 2009. Multiplicação *in vitro* e aclimatação de *Vernonia condensata* Baker. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 11(2):176-183.
- Xavier, A., Wendling, I. & Silva, R.L. 2009. Silvicultura clonal: princípios e técnicas. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 272 p.