

Germinação e crescimento de plântulas *in vitro* de *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) submetida a diferentes meios de cultivo

Francisco Roberto Pierine¹, Patrícia Franco Gianini¹, Cristiano Pedroso-de-Moraes²

¹ Centro Universitário Hermínio Ometto, Rua Maximiliano Baruto, 500, CEP 13600-000, Jardim Universitário, Araras, SP, Brasil.

² Centro Universitário da Fundação Educacional Guaxupé, Av. Dona Floriana, 463, Centro, CEP 37800-000, Guaxupé, MG, Brasil.
cpmoraes@gmail.com

Recebido em 09.IX.2016

Aceito em 04.IV.2019

DOI 10.21826/2446-82312019v74e2019002

RESUMO – Avaliou-se a germinação e crescimento de *Muntingia calabura* L. em meios de cultivo MS ½ macronutrientes, Hyponex® e Kristalon laranja®. A semeadura foi feita em quatro frascos por tratamento, mantidos em incubadora. Após 45 dias, foram avaliados: germinabilidade, índice de velocidade de germinação, os comprimentos: total da plântula, da parte aérea, da raiz axial e da maior folha, a massa fresca total e a massa seca total. O meio de cultura MS ½ macronutrientes mostrou maior eficiência para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *M. calabura*. Tal eficiência é devida às concentrações intermediárias de sais nitrogenados em relação aos demais meios de cultivo e maiores concentrações de P e K em relação ao meio KR e menores em relação ao HY. O meio de cultura à base de KR proporcionou valores intermediários de crescimento das plântulas em relação ao meio MS com ½ macronutrientes e ao HY.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, micropropagação, produção vegetal

ABSTRACT – *In vitro* germination and seedling growth of *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) in different culture medium. This study evaluated the germination and growth of *M. calabura* L. seedlings in culture medium MS ½ macronutrients, Hyponex® and Kristalon laranja®. Seeding was carried out in four flasks per treatment, and were kept in B.O.D. After 45 days, we evaluated germination, germination speed index, total seedling length, shoot length, length of axial root and of larger leaf, total fresh weight and total dry matter. The the culture media MS ½ macronutrients proved to be the most efficient for the *in vitro* development of *M. calabura* seedlings. This efficiency is due to intermediate concentrations of nitrogen salts in relation to other culture medium and larger contractions of P and K in relation to the KR and smaller for HY. The culture medium based on KR yielded intermediate values of seedling growth in relation to MS ½ macro nutrients and HY.

Keywords: *in vitro* culture, micropropagation, plant production

INTRODUÇÃO

Muntingia calabura L. (Muntingiaceae), conhecida como Calabura ou Cereja-das-Antilhas (Lopes *et al.* 2002), é uma espécie arbórea nativa das Américas (Bayer *et al.* 1998), mas exótica (não invasora) à flora brasileira e foi introduzida no Brasil em 1962 em programas de reflorestamento de matas mesófilas, principalmente, nas regiões sudeste e sul (Souza & Lorenzi 2005). Apesar da espécie não ser utilizada na medicina popular em território nacional, na América Central, as flores da espécie são tradicionalmente usadas como antiespasmódicas e antissépticas e, alguns compostos isolados de suas raízes podem ser usados para controle de crescimento celular maligno (Kaneda *et al.* 1991). O início da frutificação de *M. calabura* é precoce, com a mesma entrando em maturidade reprodutiva dois anos após o plantio e se mantendo produtiva por toda primavera e verão, com declínio de produtividade no outono e inverno. Os frutos contêm muitas sementes pequenas e são apreciados pela avifauna, morcegos e peixes, sendo a espécie comumente utilizada para a ornamentação

do entorno de corpos d'água periurbanos, servindo como fonte de alimento para os animais viventes nestas áreas. Seu fruto, quando maduro, apresenta sabor suave e doce, exibe alto valor nutricional, apresentando vitamina C, pró-vitamina A, carboidratos, proteínas, fibras, cálcio, ferro, fósforo e flavonoides (Germek 1975/1976). O porte de 9-13 m de altura da espécie proporciona boa sombra durante o ano todo (Lorenzi *et al.* 2003). Fibras de celulose são obtidas a partir de sua madeira de baixa densidade, a qual é própria para a fabricação de pequenos tonéis ou caixotes e engradados de embalagens de frutos (Lopes *et al.* 2002). Com relação a germinação em viveiro, a literatura indica dificuldade na obtenção de plantas por meio desta forma de propagação (Lopes *et al.* 2002). Também, não são encontradas informações a respeito da propagação por meio de estacas.

Técnicas de propagação *in vitro* propiciam a produção em massa de indivíduos com características genéticas desejáveis e com alto padrão de sanidade das mudas (Xavier *et al.* 2007). Sob tal aspecto, a biotecnologia empregada para espécies tropicais florestais aumenta a disponibilidade

de madeiras em áreas manejadas, reduzindo a pressão de degradação nas florestas nativas (Merkle & Nairn 2005). Para que semeadura *in vitro* não seja onerosa é possível a simplificação dos meios de cultivo, como por exemplo, somente pelo uso de fertilizantes como base para tais substratos nutritivos (Stancato *et al.* 2001). Durante a germinação e desenvolvimento *in vitro*, as soluções de sais e açúcares, que compõem os meios de cultivo, não exercem efeito somente nutritivo, mas também influenciam osmoticamente o crescimento celular e a morfogênese. Assim, a concentração de tais substâncias no meio influencia a absorção de água durante a fase inicial de embebição (Fermino Jr & Scherwinski-Pereira 2012).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a germinação e crescimento de plântulas de *M. calabura* em meios de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho, 50 frutos de cinco indivíduos de *Muntingia calabura* foram coletados em setembro de 2013, no Arboreto do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, Araras, SP. Logo após, os frutos maduros foram levados a Laboratório para a extração das sementes. Foram preparados três tipos de meios de cultivo: sendo o primeiro constituído da metade da concentração de macronutrientes do meio MS (Murashige & Skoog 1962), o qual foi usado como controle. Os outros dois meios constituídos de Hyponex® Scotts (NPK 6,5-9-19) ou Kristalon laranja® Yara (NPK 6-12-36) a 2 g.L⁻¹. Todos os meios foram acrescidos de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, 30 g.L⁻¹ de sacarose com pH ajustado para 5,8 antes da adição de 7 g.L⁻¹ de ágar. Logo após, 50 mL de cada meio de cultivo foram vertidos em quatro frascos de 250 mL e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 20 minutos (Arditti & Ernst 1992). Para a germinação *in vitro*, as sementes coletadas foram lavadas em água corrente, homogeneizadas, imersas em álcool etílico a 70% por 2 min e, posteriormente, desinfestadas em hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 min (Fermino Jr

& Scherwinski-Pereira 2012) sob agitação em tubos para centrífuga *Eppendorf*®. Posteriormente, os tubos foram mergulhados em álcool 70% e levados à câmara de fluxo laminar, onde as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada e depositadas nos frascos contendo os meios de cultivo. A semeadura foi feita em quatro frascos por tratamento, sendo inoculadas 250 sementes por recipiente (Brasil 2009). Os frascos semeados foram fechados com tampa plástica transparente e mantidos durante 90 dias em incubadora, à temperatura de 25°C, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de aproximadamente 116 µmol.m⁻².s⁻¹. Após 45 dias, foram avaliadas a germinabilidade (G%), índice de velocidade de germinação (IVG) (Maguire 1962, Labouriau 1983), o comprimento total da plântula (CTP), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz axial (CRA) e da maior folha (CMF), a massa fresca total (MFT) e a massa seca total (MST), obtida colocando-se o material em temperatura de 65°C até atingir massa seca constante. As medidas foram obtidas utilizando-se paquímetro digital e balança analítica. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste de Liliefors para normalidade dos resíduos da análise de variância. Como essa pressuposição foi atendida, todas as medidas foram submetidas ao teste de Tukey ($\alpha=0,05$) (Sokal & Rohlf 1995) utilizando o aplicativo BioEstat 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação e desenvolvimento *in vitro* de *Muntingia calabura* ocorreram em todos os meios de cultivo. Os resultados demonstraram que as plântulas de *M. calabura* cultivadas em meio MS ½ macronutrientes apresentaram as maiores médias para todas as variáveis analisadas (95,5%). O meio de cultura à base de Kristalon laranja (KR) proporcionou valores intermediários de crescimento (84,3%) das plântulas em relação ao meio MS com metade da concentração de macronutrientes e ao Hyponex (HY), com este último apresentando os menores valores médios para as variáveis analisadas (72,9) (Tab. 1).

Tabela 1. Valores médios para germinabilidade (G%), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento total da plântula (CTP), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz axial (CRA), comprimento da maior folha (CMF), massa fresca total (MFT) e massa seca total (MST) de *Muntingia calabura* após 45 dias de cultivo *in vitro* nos meios de cultivo MS ½ macronutrientes (MS), Hyponex® (HY) e Kristalon laranja® (KR). CV = Coeficiente de Variação.

Meios de Cultivo	G%	IVG	CTP (cm)	CPA (cm)	CRA (cm)	CMF (cm)	MFT (g)	MST (g)
MS	96.5A ¹	6.43A	4.45A	3.61A	3.54A	3.13A	1.69A	0.81A
HY	72.9C	3.11C	2.11C	2.23C	1.45C	0.96C	0.83C	0.21C
KR	84.3B	4.51B	2.18B	3.18B	2.57B	1.81B	1.19B	0.52B
CV(%)	8.2	12.3	17.1	7.4	15.4	14.6	12.1	17.6

¹Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

Com relação à G% e IVG de *M. calabura* (Tab. 1), resultado semelhante ao deste trabalho foi obtido para *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae) (Nogueira *et al.* 2004) e *Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith

(Fermino Jr. & Scherwinski-Pereira 2012) (Fabaceae) para as quais, o meio de cultivo ½ MS promoveu a maior G% e IVG. O meio MS é muito efetivo como substrato nutritivo para espécies arbóreas, tais como: *Derris*

urucu (Killip et Smith) Macbr (Conceição *et al.* 2000), *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich. (Nery *et al.* 2008) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Castro *et al.* 2009), pois apresenta altos níveis de nitrogênio e potássio em concentrações superiores a dos outros meios utilizados neste trabalho, além de ser o único a possuir nitrogênio em forma de nitrato de amônio. Contudo, para muitas espécies lenhosas, o meio MS integral não se mostra satisfatório, com composições mais diluídas dos sais apresentando melhor desempenho (Grattapaglia & Machado 1998). Tais constatações são corroboradas pela observação de que menores concentrações dos íons nitrato e amônia do meio MS tem logrado êxito para a micropropagação de espécies arbóreas (Pasqual 2001). Sob este aspecto, o efeito do uso de diferentes composições, integrais ou parciais, de meios de cultivo demonstra resposta específica (Fermino Jr & Scherwinski-Pereira 2012). O meio de cultivo à base de Hyponex® apresenta maior concentração de nitrogênio nítrico em relação aos meios Krystalon laranja® e MS ½ macronutrientes. Dessa forma, a redução pela metade das concentrações dos sais nitrogenados no meio MS ½ macronutriente e a presença de nitrogênio amoniacal, foram os responsáveis pelo bom desenvolvimento tanto da parte área quando radicular encontrada para as variáveis CPA, CRA e CMF em *M. calabura* (Tab. 1). O aumento nas concentrações de potássio e o consumo de nitrato por células vegetativas promovem incrementos em características fitotécnicas, pois, a absorção de um dado nutriente pode ser influenciada pela concentração de outro (Figueiredo *et al.* 2008), como o observado neste trabalho, para a matéria fresca e seca (Tab. 1). Além disso, pode-se relacionar o aumento no valor médio obtidos para estas características à concentração de K e P (que também foram reduzidas pela metade no meio MS utilizado), pois para o K, propõe-se uma correlação com o fósforo, sendo que sua deficiência no meio de cultivo conduz a hiperidricidade e ao decréscimo na taxa de absorção de fosfato (Pasqual 2001). Altas concentrações de fosfato de sódio, como presente no meio HY, diminuem o crescimento de diferentes espécies vegetais, possivelmente porque o sódio e alguns microelementos são precipitados na solução ou sua absorção é reduzida. Os valores intermediários obtidos para as características fitotécnicas para o meio KR, são também corroboradas pelo fato de que os sais contendo K e P assumem, neste meio, concentrações mais baixas e mais elevada, respectivamente, em relação àquelas observadas nos meios MS ½ macronutrientes e HY. Ainda, em várias espécies, a taxa de absorção de íons fosfato é dependente da concentração de sais de potássio presentes no meio, que é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura (Chen *et al.* 2000). Tais resultados demonstram que meios de cultivo devem ser determinados para cada espécie e que o uso de fórmulas nutritivas mais apropriadas pode otimizar a qualidade da planta produzida *in vitro* (Rego-Oliveira & Faria 2005). Contudo, salienta-se que é possível germinar eficientemente a espécie investigada nos meios constituídos de soluções

nutritivas comerciais, principalmente à base de Kristalon Laranja, o que diminuiria custos de produção e facilitaria a produção dos meios de cultivo por parte de pequenos produtores, em comparação ao uso do meio MS.

Para as variáveis analisadas, o meio de cultura MS ½ macronutrientes mostrou ser o mais eficiente para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Muntingia calabura*. Tal eficiência pode dever-se às concentrações intermediárias de sais nitrogenados em relação aos demais meios de cultivo e maiores concentrações de P e K em relação ao meio KR e menores em relação ao HY, que permitiram incremento em todas as variáveis relacionadas à G%, IVG, e parte área das plântulas devido à influência direta das concentrações nas relações osmóticas e mobilidade de nutrientes entre o meio de cultivo e as plântulas em desenvolvimento. Também se salienta presença, na formulação do meio MS, de nitrato de amônio, o qual influencia diretamente as variáveis fitotécnicas relacionadas ao sistema radicular. Contudo, mediante os resultados obtidos, como forma de diminuir custos de produção e facilitar a produção de meios de cultura, o uso de meios de cultivo à base de fertilizantes, principalmente, de Kristalon laranja, podem ser ampla e eficientemente utilizados para a propagação seminal da espécie via micropropagação.

REFERÊNCIAS

- Arditti, J. & Ernest, R. 1992. Micropropagation of orchids. John Wiley & Sons, New York. 682p.
- Bayer, C., Chase, M.W. & Fay, M.F. 1998. Muntingiaceae, a new family of dicotyledons with malvacean affinities. *Taxon* 47:37-42.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Regras para análise de sementes, Brasília. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 399p.
- Castro, A.H.F., Paiva, R., Alvarenga, A.A. de & Vitor, S.M.M. 2009. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. *Ciência e Agrotecnologia* 33:385-390.
- Chen, Y., Chang, C. & Chang, W. 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 36:420-423.
- Conceição, H.E.O. da, Pinto, J.E.B.P., Santiago, E.J.A. de & Gonçalves, A.A.S. 2002. Crescimento e desenvolvimento de *Derris urucu* (Killip et Smith) na ausência de macronutrientes em solução nutritiva. *Ciência e Agrotecnologia* 26:472-479.
- Fermino Jr, P.C.P. & Scherwinski-Pereira, J.E. 2012. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). *Ciência Florestal* 22:1-9.
- Figueiredo, M.A. de, Pasqual, M., Araujo, A.G. de, Junqueira, K.P., Santos, F.C., & Rodrigues, V.A. 2008. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. *Ciência Rural* 38:255-257.
- Germeck, E.B.A. 1975/1976. Introdução de plantas no desenvolvimento da Agricultura. *O Agrônomo* 27/28:365-375.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. 1998. Micropropagação. *In* Cultura de tecidos e transformação genética de plantas (A.C. Torres, L.S. Caldas, J.A. Buso). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília. p. 99-169.
- Kaneda, N., Pezzuto J.M., Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R., Santisuk, T., Tuchinda, P., Udchachon, J. & Reutrakul, V. 1991. Plant anticancer agents: XLVIII. New cytotoxic flavonoids from *Muntingia calabura* roots. *Journal of Natural Products* 54:196-206.

- Labouriau, L.G. 1983. A germinação de sementes. OEA, Washington. 223p.
- Lopes, J.C., Pereira, M.D. & Martins-Filho, S. 2002. Germinação de sementes de calabura (*Muntingia calabura* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 24:59-66.
- Lorenzi, H., Souza, H.M. de, Torres, M.A.V. & Bacher, L.B. 2003. **Árvores exóticas no Brasil:** madeiras, ornamentais e aromáticas. Plantarum, Nova Odessa. 173p.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177.
- Merkle, S.A & Nairn, J. 2005. Hardwood tree biotechnology. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 41:602-619.
- Murashige, T & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nery, M.C., Laene, M.M.C., Oliveira, L.M. de, Nery, F.C. & Silva, D.G. 2008. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. *Cerne* 14:1-8.
- Nogueira, R.C., Paiva, R., Castro, A.H. de, Vieira, C.V., Abbade, L.C., & Alvarenga, A.A. 2004. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Ciência e Agrotecnologia* 28:1053-1059.
- Pasqual, M. 2001. Introdução: fundamentos básicos. *In* CURSO de especialização à distância cultura de tecidos vegetais (CTV) (M. Pasqual). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 97p.
- Rego-Oliveira, L.V & Faria, R.T. 2005. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum Agronomy* 27:1-5.
- Sokal, R.R & Rohlf, F.J. 1995. *Biometry*. Freeman and Company, São Francisco. 776p.
- Souza, V. C & Lorenzi, H. 2005. Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa. 539p.
- Stancato, G.C., Bemelmans, P.F. & Vegro, C.L.R. 2001. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 7:25-33.
- Xavier, A., Otoni, W.C. & Penchel, R.M. 2007. Micropropagação e Enxertia *in vitro* de espécies florestais. *In* Biotecnologia Florestal. (A. Borém). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p. 55-74.