



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

## XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

### Multiplicação *in vitro* de *Ziziphus joazeiro*

**Rafael Lima Oliveira<sup>1</sup>; José Raniere Ferreira de Santana<sup>2</sup>**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

[rafaeloliveira131@yahoo.com.br](mailto:rafaeloliveira131@yahoo.com.br)

2. José Raniere Ferreira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas / Horto Florestal, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [jose.raniere@gmail.com](mailto:jose.raniere@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Ziziphus joazeiro*; Estabelecimento *in vitro*; Micropropagação.

### INTRODUÇÃO

O *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae) é uma espécie endêmica da Caatinga, conhecida popularmente como juazeiro, juá e laranjeira-de-vaqueiros. A espécie é utilizada na fabricação de cosméticos, xampus anticaspa e creme dental (LORENZI & MATOS, 2002). Nos períodos de seca é principalmente utilizada na alimentação de animais, sendo também utilizada no tratamento de gastrites, gripes, contusões e ferimentos (LIMA, 2000).

Apesar do reconhecimento de suas potencialidades e importância ambiental, a espécie enfrenta dificuldades por parte de programas eficientes que possam contribuir para sua conservação (MONIZ, 2008). Dessa forma são necessárias técnicas que possibilite a produção de mudas uniformes para atender ao mercado, sem desligar-se da preservação e conservação da espécie. Nesse sentido, a micropropagação é uma alternativa, pois possibilita uma elevada produção de mudas uniformes em curto período de tempo.

O sucesso de um protocolo de micropropagação é dependente do explante, composição do meio de cultivo, reguladores vegetais, luz e temperatura. Dentre os reguladores vegetais empregados nas técnicas de cultura de tecidos, as auxinas e citocininas se destacam (MORAIS et. al, 2014). Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos de multiplicação *in vitro* para *Z. joazeiro*.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana.

#### Material vegetal e meio de cultura

As sementes de *Z. joazeiro* coletadas na Unidade Experimental Horto Florestal da UEFS tiveram sua mucilagem retirada e por seguinte mantidas em local arejado para secagem, e por fim foram armazenadas em saco plástico sob temperatura ambiente. Utilizou-se o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade das concentrações salinas (MS ½), suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, distribuído em tubos de ensaio (25x150mm). O pH foi ajustado para 5,7 e a esterilização do meio foi realizada em autoclave a 120°C por 15 minutos.

### **Experimento I: Multiplicação *in vitro* de *Z. joazeiro***

Para este experimento foram utilizados como explantes cortes transversais de segmentos internodais oriundos de plantas matrizes germinadas *in vitro*, com 60 dias de inoculação. Cada explante foi inoculado em tubo de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura (MS ½) com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina - BAP (0,00; 2,22; 4,44; 8,88; 17,76 µM) e ácido naftaleno acético - ANA (0,00; 1,34; 2,68 µM). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 5x3 (cinco concentrações de BAP e três de ANA), totalizando 15 tratamentos com 13 repetições por tratamento.

Decorrido 60 dias da inoculação foram realizadas as avaliações referentes a porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos (%ERB), número de brotos por explante (NB) organogênese direta (OD).

### **Experimento II: Multiplicação de explantes oriundos do hipocótilo de *Z. joazeiro***

Explantes provenientes de cortes transversais de plantas matrizes germinadas *in vitro* a 60 dias foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura (MS ½) com diferentes concentrações de BAP (0,00; 2,22 µM) e ANA (0,00; 2,68; 5,36; 10,72 µM). Foi realizado o delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2x4 (duas concentrações de BAP e quatro concentrações de ANA), totalizando 8 tratamentos com 14 repetições por tratamento.

Após 60 dias da inoculação foram realizadas as avaliações referente a porcentagem de explante responsivos à formação de calo (%ERC).

### **Análise Estatística**

Utilizou-se o programa estatístico SISVAR 5.6 para submeter os dados à análise de variância e as médias foram analisadas por regressão ou comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Multiplicação *in vitro* de *Z. joazeiro***

A análise de variância apontou que os reguladores BAP x ANA não apresentaram interação significativa para nenhuma das variáveis analisadas, no entanto, houve efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) para o uso dos reguladores de forma isolada. O uso do BAP quando avaliado de forma isolada, demonstrou efeito significativo para porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos (%ERB), número de brotos (NB) e organogênese direta (OD).

Mesmo na ausência do regulador, os explantes responderam as variáveis analisadas. Resultados similares foram encontrados em experimento com *Eugenia pyriformis*, onde Nascimento (2008) não verificou diferença para número médio de gemas formadas, porém todos os tratamentos testados responderam com formação de brotos, mesmo na ausência do regulador BAP.

As concentrações 8,88 e 17,76 µM da citocinina promoveu média estatisticamente superior as obtidas na concentração 2,22 µM e ausência do regulador para as variáveis %ERB e NB (Tabela 1). Resultados diferentes foram encontrados por Silva (2019) onde na presença do BAP os explantes de juazeiro não apresentaram diferença significativa para a variável NB. Os tratamentos obtiveram altas taxas de formação de brotos por via da organogênese direta, sendo que a concentração 8,88 µM de BAP promoveu 69% de resposta dos explantes, diferindo estatisticamente da concentração 2,22 µM (38%) e ausência do regulador (33%).

Tabela 1. Variáveis porcentagem de explantes responsivos à formação de brotos (%ERB), número de brotos por explante (NB) e organogênese direta (OD) em função de diferentes concentrações de BAP em segmentos internodais de *Ziziphus joazeiro*.

BAP $\mu\text{M}$	%ERB	NB	OD (%)
0,00	33 b	0,64 b	33 b
2,22	38 b	0,85 b	38 b
4,44	56 a b	1,28 a b	56 a b
8,88	72 a	1,74 a	69 a
17,76	67 a	1,28 a b	64 a b

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A auxina ANA indicou efeito isolado significativo ( $p \leq 0,05$ ) para as variáveis %ERB, NB e OD. A variável %ERB apresentou maior resposta na ausência de ANA, a qual promoveu uma taxa de 75%. Para o número de brotos por explante, a resposta dos segmentos foi estatisticamente maior na ausência do regulador, registrando uma média de 2,06 brotos. A maior média para organogênese direta também foi observada no tratamento na ausência da auxina (74%). Os resultados demonstram que a utilização do ANA não tem um efeito desejável sob a promoção de brotações e estímulo da organogênese direta (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis explantes responsivos à formação de brotos (ERB), número de brotos (NB) e organogênese direta (OD) em função de diferentes concentrações de ANA em segmentos internodais de *Ziziphus joazeiro*.

ANA $\mu\text{M}$	%ERB	NB	OD (%)
0,00	75 a	2,06 a	74 a
1,34	51 b	0,85 b	49 b
2,68	34 b	0,57 b	34 b

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

### Multiplicação em explantes oriundos do hipocótilo de *Z. joazeiro*

A análise de variância demonstrou que as concentrações testadas dos reguladores ANA e BAP não apresentaram interação dupla significativa ( $p \leq 0,05$ ) para a variável porcentagem de explantes responsivos à formação de calo (%ERC). Apenas concentrações de ANA avaliadas de forma isolada tiveram efeito significativo. Os segmentos do hipocótilo responderam apenas com formação de calos, sem diferenciação, aos estímulos dos reguladores. Foi observado que os calos formados apresentavam coloração bege, amarronzada e esverdeada, independentemente do tipo ou concentração dos reguladores testados. Para %ERC foram obtidas altas taxas na presença da auxina ANA, cujas médias diferiram estatisticamente do tratamento na ausência deste regulador (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de explantes responsivos à formação de calo (%ERC), em função de diferentes concentrações de ANA em segmentos de hipocótilo de *Ziziphus joazeiro*.

ANA $\mu\text{M}$	%ERC
0	7,14 b
2,68	78,57 a
5,36	92,86 a
10,72	85,71 a

\*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A adição do regulador ANA na concentração de 2,68  $\mu\text{M}$  já foi suficiente para induzir o aumento da calogênese nos explantes de *Z. joazeiro*. Resultados contrários foram observados por Landa et al. (1999), onde explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.), sob estímulo de 10,74  $\mu\text{M}$  de ANA não obtiveram diferença significativa em relação ao controle.

Os resultados obtidos sugerem que o balanço hormonal da espécie necessita de uma suplementação externa de auxina para estimular a produção de calos nesse tipo de segmento. A adição de auxina estimula a produção de calos, mas a associação com a citocinina pode intensificar a proliferação (TISSERAT, 1985). Os segmentos do hipocótilo não contêm gemas para receber o estímulo do regulador e emitir brotos por meio da organogênese direta. Os efeitos na divisão celular e controle dos processos de crescimento e alongação celular justificam o amplo uso das auxinas (NOGUEIRA et al., 2007).

## CONCLUSÃO

A concentração de 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP é indicada para multiplicação *in vitro* via organogênese direta a partir de explante do segmento internodal de *Ziziphus joazeiro*.

A concentração de 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA é suficiente para induzir formação de calos em segmentos do hipocótilo de *Ziziphus joazeiro*.

## REFERÊNCIAS

- LANDA, F. de S.L. et al. 1999. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras.
- LIMA, R.B. 2000. A família Rhamnaceae no Brasil: diversidade e taxonomia. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo. 292p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum. 512p.
- MONIZ, K. L. de A. 2008. Caracterização morfológica de sementes e frutos e estudos da germinação da espécie *Ziziphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae).
- MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. 2014. Reguladores de crescimento vetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas, v.16, n.2, supl 1, p.350-355.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Plant Physiology, v.15, p. 473-479.
- NASCIMENTO, A. da C. et al. 2008. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeitos do BAP e AIB. Revista Verde, Mossoró, v. 3, n. 2, p. 20-26.
- NOGUEIRA, R.C. et al. 2007. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Ciência e Agrotecnologia, v. 31, n. 2, p. 366-370.
- SILVA, H. F. de J. 2019. Diversidade genética, multiplicação e conservação *in vitro* de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) e amburana (*Amburana cearensis* [Allemão] AC Smith).
- TISSERAT, B. 1985. Embryogenesis, organogenesis na plant regeneration. In: DIXON, R. A. (ed.) Plant cell culture, a practical approach. Oxford: IRL Press. p.79-105.