

## Efeitos das auxinas na germinação *in vitro* de sementes de porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Stand.) – Cucurbitaceae.

Da Silva, André Luís Lopes<sup>1</sup>; Quoirin, Marguerite<sup>2</sup>; Horbach, Micheli Angélica<sup>3</sup>; Lima, Yohana de Oliveira Ugarelli<sup>1</sup>; Bisognin, Dilson Antônio<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Acadêmicos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFPR, e-mail: clonageinvitro@yahoo.com.br; <sup>2</sup> Professora do Departamento de Botânica da UFPR; <sup>3</sup> Acadêmica do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal da UFSM; <sup>4</sup> Professor do Departamento de Fitotecnia da UFSM.

### INTRODUÇÃO

O porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.) pertence à família Cucurbitaceae. Nos estados do sul do Brasil seu fruto é utilizado para servir o chimarrão (bebida típica dessa região). Pesquisas em cultura de tecidos vegetais exigem o uso de um grande número de explantes, o que geralmente é suprido através da germinação *in vitro* de sementes. Por esta razão é desejada uma alta taxa de germinação. As sementes de cucurbitáceas podem apresentar dormência ou germinação muito lenta (Casali et al., 1982). O processo de fermentação em água à temperatura de 25°C durante 72 horas promove a quebra da dormência e aumenta a qualidade fisiológica das sementes (Bisognin et al., 1997). No entanto, mesmo após esse processo, sementes inteiras de porongo não germinam em meio de cultura sob condições *in vitro*, sendo necessária a remoção do tegumento (Da Silva et al., 2004).

As auxinas promovem a biossíntese de giberelinas e, vice-versa, as giberelinas estão relacionadas com a germinação das sementes em algumas possíveis etapas: na ativação do crescimento vegetativo do embrião, no enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião e que restringe o seu crescimento, além de também permitir a mobilização das reservas energéticas do endosperma (Taiz & Zeiger, 2004). Há muito tempo também se conhece o efeito da auxina na biossíntese do etileno, o qual possui o efeito de quebrar a dormência de sementes e iniciar a germinação em algumas espécies. Consequentemente têm se verificado que o etileno também promove um aumento na taxa de germinação de sementes de diversas espécies (Taiz & Zeiger, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do ácido naftalenoacético (ANA) e do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na germinação *in vitro* de sementes inteiras e nuas de porongo.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos com sementes inteiras e nuas (sem a presença do tegumento). As sementes utilizadas para os experimentos foram fermentadas à 25°C por 72h. na proporção de uma parte de semente e placenta para cinco partes de água (Bisognin et al., 1997).

Sementes inteiras de porongo foram desinfestadas durante 3 minutos em álcool 70%, seguido de três lavagens com água destilada e autoclavada, posteriormente imersas em solução de NaOCl (2-2,5% de cloro ativo) por 40 minutos seguido de cinco lavagens de água destilada e autoclavada. Para a avaliação da germinação *in vitro* das sementes sem tegumento (nuas), o processo de desinfestação foi realizado da seguinte maneira: sementes foram desinfestadas por 1 minuto em álcool 70%, em seguida lavadas com água destilada e autoclavada, posteriormente o tegumento das sementes foi removido mecanicamente e as amêndoas (embrião zigótico e endosperma) foram imersas por 1 minuto em álcool 70%, lavadas com água destilada e autoclavada e imersas em uma solução comercial de NaOCl (2-2,5% de cloro ativo) por 6 minutos e novamente lavadas em água destilada e autoclavada por cinco vezes (Da Silva et al., 2004).

O meio de cultura para a germinação *in vitro* foi o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de agar. O pH foi ajustado para 5,7. Os tratamentos consistiram das concentrações de 0; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA) ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Foram avaliadas a percentagem de sementes germinadas e a percentagem de calogênese em sementes germinadas ou não. A avaliação da percentagem de germinação e de calogênese foram realizadas após 22 e 60 dias de cultivo *in vitro*, respectivamente.

Todos os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 16h, sob intensidade luminosa de aproximadamente 20 μM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtidas por lâmpadas fluorescentes brancas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições de 10 sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão ao nível de 5% de probabilidade de erro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes inteiras não germinaram na presença do 2,4-D e nem na presença de ANA. Possivelmente a causa desta inibição da germinação das sementes com tegumento *in vitro* esteja relacionada à persistência de uma dormência residual, a qual não é totalmente eliminada durante o processo de fermentação em água por 72 horas (Bisognin et al., 1997). Tal dormência pode estar ligada à presença de substâncias inibidoras da germinação, presentes no tegumento, pois foi observado nas sementes e no meio de cultivo uma coloração escura típica daquela produzida pela oxidação de compostos fenólicos. Essas substâncias contidas no tegumento, quando cultivadas *in vitro* podem ter dificuldade de difusão no meio de cultura sólido e permanecer associadas ao embrião, impedindo a germinação, visto que as mesmas sementes fermentadas começam a germinar a partir de quatro dias em condições *ex vitro* (Bisognin et al., 1991).

A presença de ANA favoreceu a germinação *in vitro* de sementes nuas. A maior percentagem de germinação foi na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, atingindo 27% após 22 dias de cultivo *in vitro*, cerca de 4 vezes mais do que na ausência de ANA (Figura 1). Resultados semelhantes foram encontrados em *Carica papaya* L. onde a maior percentagem de germinação ocorreu na presença de 5 μM de ANA, atingindo 80% de germinação *in vitro* (Bhattacharya & Khuspe, 2001). O ANA pode induzir a expressão de lipoxigenases, algumas destas enzimas produzem oxilipinas que parecem ser importantes moléculas sinalizadoras, que induzem respostas a estresses, tais como as provocadas por ataque de insetos, por infecções de fungos ou bactérias e por ferimentos causados por danos mecânicos. As oxilipinas podem influenciar a biossíntese do ácido jasmônico, o qual aumenta a habilidade da planta de responder a situações de estresse (Wang et al., 1999). A remoção mecânica do tegumento da semente frequentemente causa ferimentos nos tecidos, gerando estresse, o qual pode ser responsável pela baixa taxa de germinação *in vitro*. Os resultados da suplementação do ANA no meio de cultura demonstraram um percentual de germinação superior à testemunha, o que sustenta esta hipótese.

Na presença do ANA, nem todas as sementes produziram plântulas completas. Foram observadas, em todos os tratamentos, 50% de plântulas completas, as outras 50% apenas não apresentaram formação de raízes. Este resultado pode estar associado ao fato da auxina induzir a biossíntese do etileno, o qual é um inibidor do crescimento de raízes (Taiz & Zeiger, 2004).

O 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é uma auxina sintética extremamente eficiente, pois não é tão rapidamente metabolizada pela planta quanto é o AIA (ácido indol-3-acético) (Taiz & Zeiger, 2004). O 2,4-D produziu um efeito semelhante ao ANA na germinação *in vitro* das sementes, proporcionando um aumento na percentagem de germinação das sementes (Figura 1). As sementes germinadas na presença do 2,4 D não produziram apenas plantas inteiras, sendo observadas muitas plantas sem raízes.

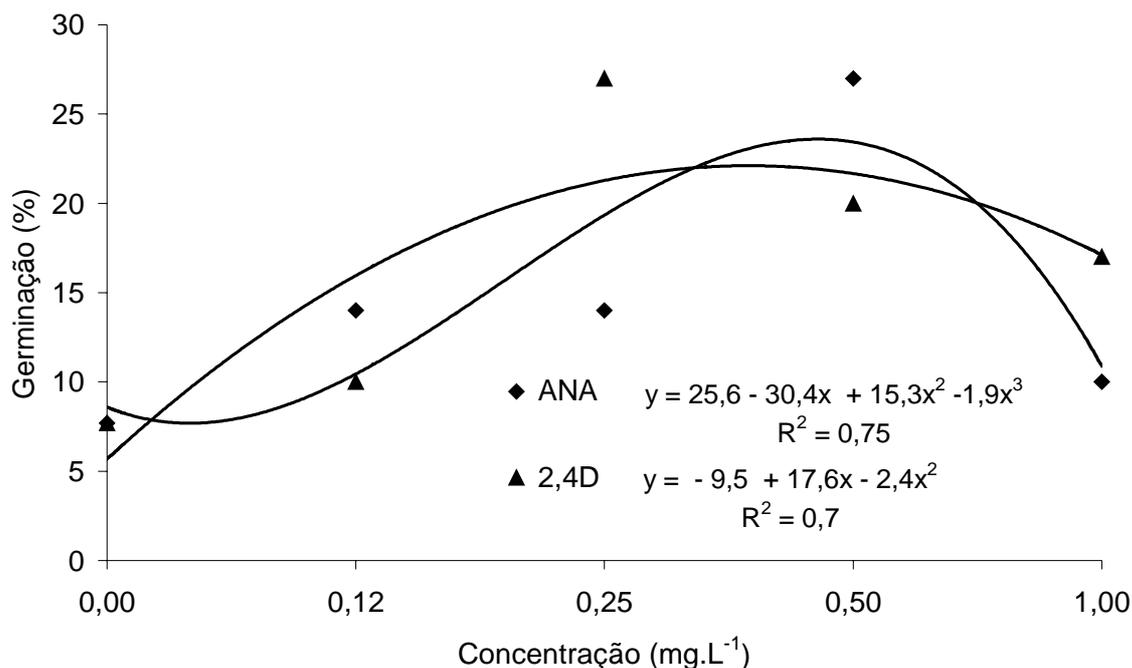


Figura 1. Efeitos do ANA e o do 2,4 D na germinação *in vitro* de porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl.) 22 dias após a sementeira *in vitro*.

A presença de ANA ou 2,4 D no meio de cultura não produziu nenhuma resposta de diferenciação ou desdiferenciação nos tecidos das sementes desprovidas de tegumento que não germinaram após 60 dias de cultivo *in vitro*. Não houve a indução de calos e não ocorreu embriogênese somática. Porém resultados diferentes foram observados em *Carica papaya*, onde concentrações de 1 a 20  $\mu$ M de 2,4-D promoveram o desenvolvimento de calos em embriões desprovidos de tegumento (Bhattacharya & Khuspe, 2001).



Figura 2. Indução de calogênese em hipocótilos de plântulas de *Lagenaria siceraria* originadas de sementes nuas após 50 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Após 50 dias de cultivo foi observada a calogênese nos hipocótilos das plântulas originadas das sementes nuas cultivadas tanto em ANA, quanto em 2,4-D (Figura 2). Este fato representa uma grande contribuição para a produção de calos em hipocótilos, abrindo perspectivas para o uso desta metodologia em estudos de morfogênese *in vitro* para esta espécie.

## CONCLUSÕES

O ANA e o 2,4 D na concentração de 0,1 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> não favorecem a germinação *in vitro* de sementes inteiras em meio de cultura. O ANA e o 2,4 D nas concentrações de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> proporcionam um aumento na taxa de germinação *in vitro* de sementes nuas de porongo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. In vitro and in vivo germination of Papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulture**, v. 91, p. 39-49, 2001.

BISOGNIN, D. A.; IRIGON, D. L.; MARTINAZZO, A. A. Teste de germinação em porongo – *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 159-167, 1991.

BISOGNIN, D. A.; MENEZES, N. L.; BELLÉ, R. A. et al. Efeito do tamanho de fruto e do método de extração na qualidade fisiológica de sementes de porongo. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.27, n.1, p.13-19, 1997.

CASALI, V. W. D.; SATURNINO, H. M.; PEDROSA, J. F. Botânica e origem das cucurbitáceas. In: EPAMIG. As cucurbitáceas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 8, n. 85, p. 22-23, 1982.

DA SILVA, A. L. L.; BISOGNIN, D. A.; RITTER, C. E. L.; BANDINELLI, M. G.; MÜLLER, D. R.; RAMPELOTTO, M. V. Propagação *in vitro* de porongo – *Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl. – Cucurbitaceae. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, suplemento CD-ROM, 2004.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p719.

WANG, C.; JÄRLEFORS, U.; HILDEBRAND, D. F. Regulation and subcellular localization of auxin-induced lipoxygenases. **Plant Science**, v. 148, p. 147-153, 1999.

## PALAVRAS-CHAVES

Calogênese; hipocótilo; tegumento; amêndoa.