

OBTENÇÃO DE MATRIZES ASSÉPTICAS DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke) ATRAVÉS DA GERMINAÇÃO IN VITRO DE SEMENTES

Soami Fernanda Caio Deccetti^a; Monique Inês Segeren^b; Analú Vicentin^c

RESUMO

Considerando a influência das plantas matrizes utilizadas sobre o sucesso na definição de um sistema de micropropagação, este trabalho teve como objetivo desenvolver metodologias para a germinação *in vitro* de sementes de Pau-rosa visando à produção de plântulas assépticas que fornecerão explantes com características mais adequadas para as fases posteriores do cultivo *in vitro*. Foram utilizadas sementes próximas ao estágio de maturação e testados diferentes tratamentos quanto à formulação do meio de cultura e à concentração de sacarose no meio visando maximizar o processo de germinação. Os resultados demonstraram que o aumento na concentração de sacarose do meio de cultura reduz a germinação das sementes. A utilização de sacarose sob concentração reduzida (10 g.l⁻¹) possibilitou a germinação de uma porcentagem maior de sementes (80%) e favoreceu o crescimento *in vitro* das plântulas de Pau-rosa. De maneira geral, a formulação do meio MS também demonstrou ser mais satisfatória para a germinação e o crescimento das plântulas de Pau-rosa, quando comparado ao meio WPM. As metodologias de germinação *in vitro* testadas neste estudo possibilitaram a obtenção de matrizes assépticas em 75 dias.

^a Coordenadora Projeto PIPE – FAPESP (FASE I) / ProClone
Rua das Caneleiras, 90. Bairro Jardim. Santo André - SP
deccetti@yahoo.com.br

^b Diretora ProClone Comércio de Mudanças Matrizes – ME
Rua dos Girassóis, 70. Centro. Holambra - SP
proclone@proclone.com.br

^c Bolsista Projeto PIPE – FAPESP (FASE I)

INTRODUÇÃO

A utilização das técnicas de micropropagação pode constituir uma alternativa eficiente para contornar os obstáculos que atingem a propagação convencional do Pau-rosa, viabilizando a produção em escala de mudas, o cultivo racional e a exploração sustentável desta espécie, que se encontra em risco de extinção, para a produção comercial de seu óleo essencial, uma nobre essência aromática cobiçada nos mercados internacional e nacional. (May & Barata, 2004).

A fase de estabelecimento *in vitro*, que antecede as fases do cultivo *in vitro* propriamente dito, é fundamental para o sucesso no desenvolvimento de um sistema de micropropagação, principalmente para espécies lenhosas nativas. A utilização de material vegetal (explante) proveniente de matrizes obtidas por germinação de sementes *in vitro*, ao invés de árvores adultas no campo, constitui uma estratégia importante para reduzir os problemas com contaminação, muito freqüente em função da pressão de doenças em ambientes tropicais (Braga, Caldas e Habe, 1997), e garantir o fornecimento de material vegetal com características mais adequadas para o cultivo *in vitro*, rejuvenescido e com maior potencialidade regenerativa, além de reduzir a ocorrência de oxidação fenólica *in vitro* (Rasai et al., 1995).

Diversos fatores ambientais externos e intrínsecos à semente influenciam o processo de germinação, havendo a necessidade da ocorrência de um conjunto de condições favoráveis para que a mesma se complete satisfatoriamente. No entanto, através do cultivo *in vitro* de sementes, condições ambientais fundamentais, como disponibilidade de água, temperatura adequada, luminosidade e composição atmosférica apropriada, podem ser fornecidas e controladas para que o processo de germinação ocorra.

Em função da necessidade da disponibilização de mudas matrizes como fonte de explantes para o desenvolvimento de um sistema de micropropagação, o presente trabalho teve como objetivo definir metodologias para a germinação *in vitro* de sementes e a obtenção de plântulas assépticas de Pau-rosa.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório da empresa. Frutos de Pau-rosa próximos ao estágio de maturação, coletados em árvores adultas sob plantio na Reserva Florestal Ducke, Manaus-AM, foram utilizados para a obtenção das sementes. Após a extração manual da polpa, as sementes foram mantidas em água corrente por 72 horas. À seguir, foram lavadas com detergente e submetidas ao processo de desinfestação, em câmara de fluxo laminar, através da imersão em álcool 70% (v/v) por 5 minutos, seguido pela imersão em solução fungicida 1% (v/v - Derosal 500 CC) por 15 minutos, em associação com a imersão em solução de formaldeído comercial 50% (v/v) por 20 minutos. Após a tríplice lavagem para a eliminação do excesso de soluções desinfestantes, as sementes foram imediatamente inoculadas em recipientes de cultivo (frascos) contendo apenas água deionizada e autoclavada. Após um período de 30, as sementes que não apresentaram contaminação e oxidação fenólica foram consideradas estabelecidas *in vitro*.

As sementes intactas (sem danos causados pelo ataque de larvas de insetos) estabelecidas *in vitro* foram submetidas a diferentes tratamentos para acelerar o processo de germinação e a obtenção de plântulas assépticas. Com este objetivo, as sementes foram transferidas para frascos contendo 30 ml de meio MS (Murashigue e Skoog, 1962), com metade da concentração de sais, ou WPM (Lloyd & McCown, 1982), solidificado com 0,6% de ágar e suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 30 e 50 g.l⁻¹), combinado com 375 mg.l⁻¹ de carvão ativado (antioxidante). O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0 (MS) ou 6,2 (WPM) antes da autoclavagem. Após a inoculação, os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento, 15 dias no escuro e 30 dias sob fotoperíodo de 16 horas. Após 45 dias avaliou-se o número de sementes germinadas em cada tratamento e o comprimento médio da parte aérea e do sistema radicular. A germinação expressa em porcentagem, foi detectada com a protusão da radícula.

O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, sendo que cada recipiente de cultivo continha um explante (semente). O programa SISVAR 4.3 (Ferreira, 1999), da Universidade Federal de Lavras, foi utilizado para a análise de

variância dos dados não transformados e dos testes para comparação dos contrastes entre médias. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos resultados apresentados na tabela 1 pode-se observar que as maiores porcentagens de germinação foram obtidas utilizando o meio MS na ausência de sacarose (75%) ou sob concentração reduzida (80%). Nas duas formulações de meio de cultura (MS e WPM) o aumento na concentração de sacarose tende a reduzir a germinação das sementes e, provavelmente até inibir o processo. Essa inibição é decorrente da regulação osmótica do meio de cultura, visto que concentrações elevadas de sacarose fazem com que o meio de cultura não possua água disponível para a embebição das sementes (George, 1996). Essa condição seria interessante para impedir a germinação precoce de embriões imaturos, porém impossibilita o início do processo de germinação de embriões maduros ou próximos ao estágio de maturação.

De maneira geral o meio MS demonstrou ser mais satisfatório para a germinação das sementes de Pau-rosa, quando comparado ao meio WPM. O meio WPM possui em sua formulação baixas concentrações de sais inorgânicos, sendo comumente utilizado para espécies lenhosas devido à sensibilidade destas aos nutrientes minerais. Entretanto, ao utilizarmos o meio MS com a metade da concentração de seus sais também reduzimos a toxicidade dos nutrientes do meio de cultura sobre a semente, promovendo melhores resultados. O menor pH do meio MS (6,0) também pode ter influenciado os resultados, favorecendo a germinação.

Quanto ao crescimento das plântulas *in vitro*, os resultados demonstram que a maior disponibilidade de nutrientes no meio MS e a presença da sacarose sob baixa concentração (T2), favorece o crescimento das plantas após a germinação. As plântulas obtidas na ausência de sacarose (T1) apresentam menor crescimento e devem ser transferidas para outro meio de cultura contendo concentrações mais elevadas de sacarose, em função da necessidade de fonte exógena de carboidrato para o seu desenvolvimento. Nas

plântulas cultivadas sob meio WPM o crescimento também é favorecido pela adição de 10 g.l⁻¹ de sacarose.

Tabela 1. Efeito de diferentes composições do meio de cultura sobre a germinação de sementes e o crescimento *in vitro* de plântulas de Pau-rosa.

	Tratamentos	Germinação (%)	Comprimento Parte aérea (cm)	Comprimento Radícula (cm)
T1	MS ½ sem sacarose 375 mg.l ⁻¹ carvão ativ.	75 b	0,7 c	2,1 b
T2	MS ½ 10 g.l ⁻¹ sacarose 375 mg.l ⁻¹ carvão ativ	80 a	2,0 a	3,0 a
T3	MS ½ 30 g.l ⁻¹ sacarose 375 mg.l ⁻¹ carvão ativ.	40 d	-	3,0 a
T4	MS ½ 50 g.l ⁻¹ sacarose 375 mg.l ⁻¹ carvão ativ.	33 e	-	1,5 c
T5	WPM sem sacarose 375 mg.l ⁻¹ carvão ativ.	33 e	-	0,5 d
T6	WPM 10 g.l ⁻¹ sacarose 375 mg.l ⁻¹ carvão ativ	17 f	1,0 b	3,0 a
T7	WPM 30 g.l ⁻¹ sacarose 375 mg.l ⁻¹ carvão ativ.	50 c	-	0,5 d
T8	WPM 50 g.l ⁻¹ sacarose 375 mg.l ⁻¹ carvão ativ	15 g	-	0,5 d

Médias seguidas por letras distintas, em cada coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A adição de 375 mg.l⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura pode ter favorecido a germinação e o crescimento por adsorver parte dos compostos tóxicos (fenóis) liberados no meio de cultura pelos explantes. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que as condições *in vitro* proporcionam uma germinação expressiva, quantitativamente, rápida e uniforme de sementes de Pau-rosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAGA, M.F.; CALDAS, L.S.; HABE, M.H. Estabelecimento de acerola (*Malpighia glabra* L.) *in vitro*: efeito do clone e do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.19, n.3, p.335-346, 1997.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 – Sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 1999.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**: part 1 – the technology. 2 ed. Edington: Exegetics limited, 1996. 1574p.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v.15, (abst. 321), p. 416, 1980.
- MAY, P.H.; BARATA L. E. S. Rosewood Exploitation in the Brazilian Amazon: Options for Sustainable Production. **Economic Botany**, v.58, n.2, p. 257–265, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- RASAI, S.; GEORGE, A.P.; KANTHARAJAH, A.S. Tissue Culture of *Annona* spp. (Cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): a review. **Scientia Horticulturae**, v.62. p.1-14, 1995.