

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEMENTES DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* Ducke) VISANDO À OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS ASSÉPTICAS

Soami Fernanda Caio Deccetti¹; Monique Inês Segeren²; Paulo de Tarso Barbosa Sampaio³; Lauro Euclides Soares Barata⁴, Analú Vicentin⁵; Aline Segeren Fonseca⁶

¹Coordenadora Projeto PIPE-FAPESP (FASE I) - ProClone, e-mail: deccetti@yahoo.com.br; ²Coordenadora CNPq-RHAE, ³Pesquisador/Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus – AM; ⁴Instituto Química - UNICAMP ⁵Bolsista Projeto PIPE – FAPESP (FASE I); ⁶ProClone Biotecnologia e Produção de Mudanças Matriz de Laboratório proclone.com.br.

INTRODUÇÃO

Diante da dificuldade de produção de mudas de Pau-rosa por métodos convencionais para viabilizar o cultivo racional da espécie e a produção comercial do seu óleo essencial, uma nobre essência aromática cobiçada no mercado internacional, torna-se fundamental investir no desenvolvimento de tecnologias alternativas para a sua propagação (May & Barata, 2004). Em diversas espécies, o uso da micropropagação tem possibilitado a obtenção de grande quantidade de mudas livres de doenças e mais homogêneas, em tempo e espaço físico reduzidos, em comparação aos métodos de propagação convencionais (Grattapaglia & Machado, 1998).

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. Em função da pressão de doenças nos ambientes tropicais, o estado da planta matriz que fornecerá material vegetal (explante) para o cultivo *in vitro* pode ser um dos fatores limitante no estabelecimento de explantes. Explantes provenientes de matrizes de campo, geralmente apresentam muitos problemas de contaminação e uma das alternativas para diminuir a infestação é cultivar sementes *in vitro*, selecionando daí as plântulas assépticas, de onde serão obtidos os explantes (Braga, Caldas e Habe, 1997).

Em adição, o cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, como o Pau-rosa, quando comparado ao de espécies herbáceas, geralmente é mais difícil, e se agrava à medida que se utiliza material menos juvenil, uma vez que a restauração da competência para a regeneração de órgãos diminui ao aproximar-se da fase adulta (Rasai et al., 1995). Dessa maneira, a utilização de material vegetal proveniente de matrizes obtidas por germinação de sementes *in vitro*, ao invés de árvores adultas no campo, também constitui uma estratégia importante para 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*.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo definir metodologias para o estabelecimento *in vitro* de sementes de Pau-rosa visando, posteriormente, à obtenção de plantas matrizes assépticas, como

primeira etapa no desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a espécie (Fonte Financiadora: FAPESP, processo 05/50912-0).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório da empresa ProClone e objetivou-se desenvolver uma metodologia satisfatória para a assepsia de sementes imaturas de Pau-rosa, provenientes de frutos verdes coletados em árvores adultas sob plantio na Reserva Florestal Ducke, Manaus-AM, e acondicionados úmidos em sacos plásticos transparentes, sob temperatura ambiente e no escuro, até a realização dos experimentos (15 dias).

Após a retirada manual da polpa dos frutos, as sementes foram lavadas com detergente e submetidas a um pré-tratamento através da manutenção das mesmas em água corrente por 48 horas. A seguir, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas a diferentes tratamentos de assepsia 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 ou 20 minutos em associação à imersão em solução de formaldeído comercial 50% (v/v) por 15 ou 20 minutos.

Após a realização do processo de assepsia e a tríplice lavagem para eliminação do excesso de soluções desinfestantes, as sementes foram inoculadas em recipientes plásticos, contendo apenas água deionizada e autoclavada, e mantidas em sala de crescimento no escuro durante 15 dias. Após esse período foram transferidas para fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1 °C por mais 15 dias. Em intervalos de 07 dias foi avaliado o número de sementes contaminadas, sendo os resultados expressos em porcentagem de contaminação.

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

Os resultados obtidos durante o período de avaliação estão apresentados na figura 1. No período considerado crítico (até 15 dias após a inoculação), no qual a contaminação geralmente é mais expressiva, pode-se observar em todos os tratamentos, como era esperado, o aumento progressivo na contaminação das sementes. A menor porcentagem de contaminação (28,6%) foi obtida no tratamento 2 (T2).

Entretanto, quando se considera o período todo de avaliação, o T2 não mantém sua eficiência (71,4%) e os melhores resultados (56,2% e 50%) são obtidos utilizando-se solução de fungicida por 15 minutos em associação a solução de formaldeído por 15 minutos (T1) ou 20 minutos (T3), respectivamente. Por outro lado, somente nos tratamentos que utilizam a combinação de tempos diferentes de exposição às duas soluções desinfestantes, a porcentagem de contaminação se mantém estável a partir do

21º dia, em 71,4% (T2) e 50% (T3), indicando o estabelecimento *in vitro* das sementes submetidas a esses tratamentos. Nos demais tratamentos, que utilizam o mesmo tempo de exposição às soluções desinfestantes (T1 e T4), podem ser observados o aumento progressivo na contaminação das sementes.

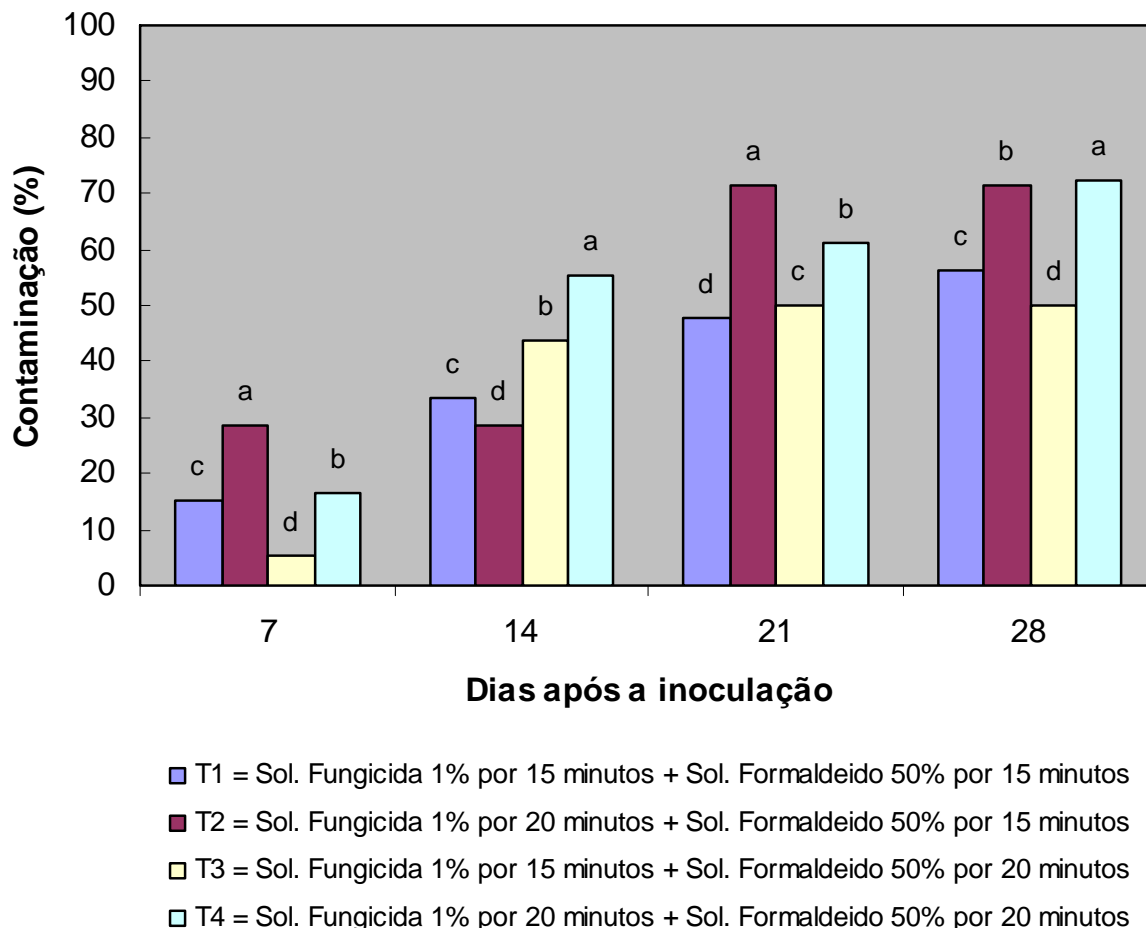


Figura 1. Efeito de diferentes tratamentos de assepsia sobre a contaminação *in vitro* de sementes de Pau-rosa. Os valores representam a média de 20 repetições. Em cada data de avaliação, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Considerando o efeito dos tratamentos sobre o controle da contaminação ao longo do período de avaliação e o tempo necessário para o estabelecimento *in vitro* das sementes, podemos concluir que a utilização de solução fungicida por 15 minutos associada à solução de formaldeído por 20 minutos (T3) apresenta superioridade em relação aos demais tratamentos, visto que em 21 dias promoveu o estabelecimento de 50% das sementes. A maior eficácia desse tratamento pode estar associada ao seu efeito sobre diferentes estádios de desenvolvimento dos patógenos presentes na superfície das sementes.

Embora tenha sido definida uma metodologia para o controle da contaminação das sementes que permaneceram armazenadas por um período de 15 dias, as altas porcentagens de contaminação observadas de maneira geral nessas sementes (50-72,2%) podem estar associadas à intensa

proliferação de microorganismos (fungos) na superfície das sementes durante o período de armazenamento sob alta umidade, necessário para evitar a perda de viabilidade das mesmas, e podem indicar que esse tipo de material não é adequado para o estabelecimento *in vitro* da espécie.

Em adição, a intensa infestação das sementes por larvas de insetos, muito freqüente na espécie (Spironello et al., 2004), provavelmente influenciou os resultados obtidos, contribuindo para aumentar a contaminação *in vitro*. Neste contexto, a utilização de sementes intactas e recém - coletadas pode reduzir a probabilidade de contaminação, aumentar a eficiência dos tratamentos de assepsia e constituir uma estratégia importante para o estabelecimento *in vitro* do Pau-rosa.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que a combinação de tempos diferentes de exposição das sementes às duas soluções desinfestantes testadas exerce influência significativa sobre o estabelecimento *in vitro* do Pau-rosa. Novos estudos deverão ser conduzidos posteriormente para maximizar o controle da contaminação, considerando a influência do uso de sementes atacadas por larvas de insetos e/ou mantidas armazenadas por determinado período sobre o estabelecimento *in vitro* da espécie.

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.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. ed. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1998, p. 331-353.
- 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.
- 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.
- SPIRONELLO, W.R.; SAMPAIO, P.T.B.; RONCHI-TELES, B. Produção e predação de frutos em *Aniba rosaeodora* Ducke var. *amazônica* Ducke (Lauraceae) em sistemas de plantio sob floresta de terra firme na Amazônia Central. **Acta Bot. Bras.** v.18, n.4, p. 801-807, 2004.