**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* NO RESGATE E CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES ARBÓREAS DA FLORA BRASILEIRA**

Laureen Michelle Houllou(1); Robson Antônio de Souza(2); Sérgio Gregório(3); Paloma de Freitas Cavalcante(4); Idjane Santana de Oliveira(5); Gustavo Rubens de Castro Torres(6)

(1)Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, laurren.houllou@cetene.gov.br; (2)Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, robson.douza@cetene.gov.br; (3)Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, sergio.gregorio@cetene.gov.br; (4)Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, paloma.cavalcanti@cetene.gov.br; (5)Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Campus Vitória, idjane.oliveira@gmail.com; (6) Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, gustavo.torres@cetene.gov.br

**RESUMO –** O trabalho teve como finalidade avaliar o potencial uso de técnicas de cultivo *in vitro* de plantas para indução de germinação *in vitro* de mudas de arbóreas de mata atlântica. Sementes de 11 espécies de arbóreas: Tarumã, Ipê roxo, Ipê rosa, ipê branco, Licurí, Pindoba, Dendê, Suruagí, Pau mulato, Sapucaia e Abricó de macaco foram coletadas em diferentes localidades do estado de Pernambuco. Após a desinfestação e estabelecimento *in vitro* foi observado que cada espécie apresenta resposta específica referente à viabilidade de desenvolvimento *in vitro*. Apesar da presença de contaminação microbiana endofítica, apenas Tarumã e Pau Mulato não foram estabelecidas *in vitro*. O percentual de contaminação por fungo foi maior que por bactéria em oito das espécies estudadas. A sobrevivência dos explantes também variou entre espécies. A maior taxa de sobrevivência foi observada em Sapucaia com cerca de 95% de estabelecimento, nas demais a referida taxa variou de 0 a 72%. As oito espécies estabelecidas *in vitro*, apresentaram respostas satisfatórias, permitindo não apenas o desenvolvimento do embrião como também o alongamento do ápice caulinar e subsequente desenvolvimento da planta. As plantas produzidas *in vitro* de sete espécies enraizaram e foram aclimatizadas com sucesso, demonstrando que a técnica consiste em ferramenta útil no resgate de sementes para a propagação de espécies arbóreas de mata atlântica.

**Palavras-chave**: Cultura de tecidos de plantas. Conservação genética. Essências florestais. Biotecnologia agroflorestal

**Introdução**

 O estabelecimento do cultivo agroecológico na Zona da Mata de Pernambuco, na última década, se expandiu principalmente nas áreas de agricultura familiar. De forma geral, os sistemas agroflorestais possuem diversos arranjos produtivos e no caso da Zona da Mata de Pernambuco os recomendados são: 1. Sistema de produção de Quintais agroflorestais (no qual pode-se fazer reflorestamento, cultivar fruteiras e espécies nativas comerciais), 2. **Sistema de Produção Taungya (n**o qual cultiva-se encostas como método de recuperação de área degradada) e 3. Sistema silvipastoril (combinação natural ou de associação deliberada de um ou mais componentes lenhosos dentro de pastagem e sua utilização com ruminantes e herbívoros) (EMBRAPA, 2012).

 Os estudos de Maia (2006) abordam o manejo como a constante preservação e renovação da base de produção, com o objetivo de perpetuar eternamente a produção. A preocupação que se tem com o manejo sustentável está baseada no sentido de que, preservados os recursos naturais, com um manejo adequado é possível a manutenção da produção agrícola e pecuária sem esgotar ou degradar o ecossistema. Frente ao exposto, a utilização de novas estratégias biotecnológicas como ferramentas auxiliares no resgate e produção de mudas de espécies de arbóreas ameaçadas de extinção pode consistir em alternativa promissora para a preservação de espécies.

O Cultivo *in vitro* de plantas já vem sendo utilizado para a produção de diferentes espécies de arbóreas, de diferentes ecossistemas com sucesso (OLIVEIRA et al., 2013). Neste caso, espécies ameaçadas, cujos períodos de floração e frutificação são curtos, podem ter as sementes resgatadas e utilizadas para a produção de mudas durante todo o ano e estas, produzidas por diferentes linhagens de sementes, podem ser utilizadas em programas de reflorestamento e enriquecimento de mata, associados a sistemas agroflorestais.

**Material e Métodos**

 O trabalho foi conduzido na forma de coleta e levantamento de janeiro de 2014 à janeiro de 2015 no Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica (LAPAB) pertencente ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), em Recife – PE. Primeiramente os frutos foram lavados com água corrente e detergente comercial neutro com auxílio de esponja macia por 5 min. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em solução de álcool a 70% (v:v) por 2 min e em seguida em solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5%) por 10 min e então enxaguados três vezes com água destilada autoclavada. Os frutos foram abertos e as sementes separadas da polpa. Para o estabelecimento *in vitro* das sementes, foram utilizados dois tipos de meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) para lenhosas e o meio Y3 (EEUWENS, 1976) para palmeiras. O meio MS foi composto por macro e micronutrientes de MS padrão acrescido de ágar (6,0 gL-1), sacarose (30,0 gL-1). O meio Y3 foi composto por macro e micronutrientes de Y3 acrescido de ágar (6,0 gL-1), sacarose (30,0 gL-1). O pH foi ajustado para 5,8 e após o ágar ser difundido, 30 mL de cada meio foram distribuídos em tubos de ensaio com capacidade para 50 mL e então autoclavados (121oC por 20 min). Conforme tamanho das sementes, as inoculações foram feitas em tubos de ensaio (com 10 mL de meio/tubo) ou em frascos (com 30 mL de meio/tubo). Após a inoculação de aproximadamente 90 sementes/espécie no meio de cultura, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com controle de luz (40 µmol.m-2.s-1) e temperatura de 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16h luz. O número de sementes inoculadas no meio de cultura variou de acordo com a disponibilidade espécie específica de frutos (Tabela 1). Foram avaliadas as taxas de germinação, contaminação e oxidação. A análise dos dados foi realizada através de médias e percentuais.

**Resultado e Discussão**

O percentual de contaminação dos explantes utilizados (sementes) durante o estabelecimento *in vitro* demonstrou que cada espécie apresenta microbiota endofítica específica e sendo assim, o sucesso no estabelecimento *in vitro* e resgate de sementes pode variar a depender da condição fitossanitária natural das sementes. As maiores percentagens de sobrevivência (acima de 50%) foram observadas em sete espécies, sendo três palmeiras e quatro lenhosas (Tabela 2). Portanto, a utilização do protocolo de desinfestação que consistiu em lavagem dos frutos seguida por desinfestação em álcool 70% e hipoclorito de sódio 2,5% mostrou-se eficiente para os fatores avaliados: percentual de contaminação, menor oxidação e maior sobrevivência independente da espécie ser uma lenhosa ou palmeira. O sucesso da técnica de micropropagação tem como ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento *in vitro* com o maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos (oxidação) e maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica do cultivo *in vitro*. Sendo assim, como o estabelecimento asséptico é essencial ao estabelecimento *in vitro*, no presente trabalho, todas as sementes que apresentaram indícios de contaminação foram descartadas independentemente independente de haver ou não início de germinação. Não foi contabilizado o número de sementes que contaminaram e apresentavam início de germinação (intumescimento, emissão de radícula ou de epicótilo).

 A falta de conhecimento sobre os processos fisiológicos de várias espécies, especialmente de plantas lenhosas, tem dificultado a realização de programas de reflorestamento. Dentre os fatores que podem interferir no potencial germinativo das sementes pode-se destacar presença de micro-organismos (CORDER & BORGES JUNIOR, 1999). As possíveis adequações dos métodos empregados para o estabelecimento *in vitro* das diferentes espécies estudadas (Tabela 2) podem refletir a influência dos diferentes biomas brasileiros no que se refere à composição microbiológica associada às plantas, bem como, às particularidades morfológicas das sementes (rugosidade) que dificultam a eliminação dos microrganismos.

**Tabela 1.** Comparação do percentual de germinação das sementes nas condições de cultivo *in vitro* e o efeito da contaminação sobre a produção de plantas

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Espécie | Nome comum | Percentual |
| Número sementes inoculadas | Germinação *in vitro* | \*Sementes germinadas convertidas em plantas |
| *Astrocarium vulgare* Mart. | Tucumã | 140 | 7,0 | 100 |
| *Tabebuia impetiginosa* Standl. | Ipê roxo | 100 | 60,0 | 90 |
| *Tabebuia roseoalba* Ridl. | Ipê branco | 100 | 25,0 | 60 |
| *Tabebuia heptaphilla* Vell. | Ipê rosa | 100 | 40,0 | 95 |
| *Syagrus coronata* Mart. | Licurí | 120 | 80,0 | 40 |
| *Attalea oleifera* Barb. | Pindoba | 100 | 65,0 | 40 |
| *Elaeis guineensis* Jacq. | Dendê | 60 | 60,0 | 15 |
| *Colubrina glandulosa* Perk. | Suruají | 40 | 70,0 | 70 |
| *Vochysia haenkeana* Mart. | Pau Mulato | 40 | - | - |
| *Copaifera coriacea* Mart. | Sapucaia | 90 | 45,0 | 100 |
| *Couroupita guianensis* Aubl. | Abricó de macaco | 50 | 90,0 | 100 |

\* Percentual de sementes germinadas convertidas em plantas corresponde ao número de sementes que após iniciar a germinação desenvolveram sem problemas o epicótilo e sistema radicular .

**Tabela 2.** Comparação do percentual de ocorrência das contaminações por fungos e bactérias e, do percentual de sobrevivência das sementes nas condições de cultivo *in vitro*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Espécie | Nome comum | Meio de cultura | Percentual | Estabelecido *in vitro* |
| \*\*Fungo | \*\*Bactéria | \*Sobrevivência |
| *Astrocarium vulgare* Mart. | Tucumã | MS | 7,0 | 0,0 | 7,0 | Sim |
| *Tabebuia impetiginosa* Standl. | Ipê roxo | MS | 11,0 | 5,5 | 72,0 | Sim |
| *Tabebuia roseoalba* Ridl. | Ipê branco | MS | 0,0 | 6,2 | 34,0 | Sim |
| *Tabebuia heptaphilla* Vell. | Ipê rosa | MS | 21,5 | 2,0 | 46,0 | Sim |
| *Syagrus coronata* Mart. | Licurí | Y3 | 20,5 | 0,8 | 90,0 | Sim |
| *Attalea oleifera* Barb. | Pindoba | Y3 | 16,0 | 10,0 | 85,0 | Sim |
| *Elaeis guineensis* Jacq. | Dendê | Y3 | 11,0 | 13,0 | 94,0 | **Sim** |
| *Colubrina glandulosa* Perk. | Suruají | MS | 6,0 | 0,7 | 79,0 | Sim |
| *Vochysia haenkeana* Mart. | Pau Mulato | MS | 92,0 | 8,0 | - | **Não** |
| *Copaifera coriacea* Mart. | Sapucaia | MS | 3,5 | 2,5 | 100,0 | Sim |
| *Couroupita guianensis* Aubl. | Abricó de macaco | MS | 2,5 | 0,0 | 100,0 | Sim |

\*Sobrevivência corresponde ao percentual de sementes que se converteram em plantas do total não contaminado *in vitro*. \*\* Fungo e \*\* Bactéria = % de contaminação fúngica e bacteriana respectivamente.

Segundo Couto et al. (2004), espécies arbóreas apresentam particular dificuldade para o estabelecimento *in vitro* devido à diversidade de micro-organismos contaminantes, principalmente se for utilizado material vegetal de indivíduos adultos. Dentre as substâncias de ação antimicrobiana mais utilizadas, destacam-se etanol e compostos à base de cloro. Em alguns casos de acordo com Nascimento et al. (2007), o sucesso na desinfestação eficiente de sementes para eliminação de fungos e bactérias tem sido alcançado associando hipoclorito de cálcio ou de sódio à fungicidas e bactericidas, maximizando o percentual de plântulas germinadas. No presente trabalho, os resultados evidenciam que as substâncias utilizadas no processo de desinfestação se mostraram adequadas a assegurar o estabelecimento *in vitro* de parte das sementes coletadas (Figura 1).

 Apesar dos processos de desinfestação utilizarem substâncias que normalmente promovem a eliminação de contaminantes microbianos da superfície dos explantes, os endofíticos não são eliminados. Desta forma, o sucesso no estabelecimento *in vitro* depende em grande parte da sanidade das sementes e, consequentemente, das matrizes. No presente trabalho os principais contaminantes encontrados foram o *Penicillium* sp, *Fusarium* sp e *Aspergillum* sp. Em estudos com desinfestação de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King), Couto et al. (2004) observaram 89% de contaminação quando as sementes não eram submetidas ao tratamento com substâncias desinfetantes. Outros pesquisadores desinfestaram as sementes de mogno com etanol 70% e hipoclorito de sódio comercial na concentração de 5,5% (VALVERDE-CERDAS et al., 1998). Com *Cedrela fissilis* as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2,5% (NUNES et al., 2002). Tais contaminações, após o processo de desinfestação, podem ser decorrentes da existência de colônias endofíticas dos microrganismos não expostas às substâncias utilizadas na desinfestação.



**SA**

**Figura 1.** Germinação e desenvolvimento *in vitro* de diferentes espécies de essências florestais. A) Ipê branco (IB), Suruaji (SU), Abricó de macaco (AM) e Sapucaia (SA) respectivamente, B) Suruaji *in vitro*, C) Ipê roxo *in vitro*. A barra laranja corresponde a 1 cm.

A germinação *in vitro* das espécies ameaçadas de extinção ou que devem ser introduzidas em sistemas de vegetação nativa, assegura a variabilidade genética das mesmas que podem ser mantidas como matrizes e servem como fonte de explantes primários no processo de micropropagação (GEORGE, 1993). Os resultados observados em seis (Ipê roxo, Ipê rosa, Ipê branco, suruaji, Sapucaia e Abricó de macaco) das 11 espécies estudadas indicam a facilidade e viabilidade do emprego da técnica de cultivo *in vitro* de sementes para a propagação de essências florestais.

A germinação *in vitro* das espécies alvo teve início com 15 dias, como por exemplo a Pindoba, podendo chegar a até 60 dias, a exemplo do Suruaji. Em estudos com germinação *in vitro* de *Amburana acreana* (cerejeira), foi observada a ocorrência de germinação *in vitro* após oito dias de inoculação (FERMINO-JUNIOR et al., 2007). Resultados semelhantes foram descritos por Lopes (2000) e Lemos et al. (1998) em mogno, aonde a germinação das sementes iniciou em período de seis a 10 dias, outras espécies como Pau Rosa (*Aniba roseodora* Ducke) e Sucupira Branca (*Pterodon pubescens* Benth) não são descritas como apresentando boa germinação *in vitro* e, necessitam de mais tempo para germinar (FRANÇA et al., 1997). Ficou evidente no presente estudo que o período necessário para quebra de dormência e iniciar o desenvolvimento *in vitro* pode variar entre espécies. Independentemente do tempo necessário, o início da germinação *in vitro* é um bom indicativo da aplicabilidade da cultura de tecidos para produção de mudas de essências florestais. Segundo Fay (1992), a germinação de sementes de algumas espécies pode aumentar quando são utilizadas técnicas de cultura de tecidos.

 A utilização dos meios MS (lenhosas) e Y3 (palmeiras) conferiram condições osmóticas mais adequadas à germinação *in vitro* das espécies alvo do presente estudo visto que o único fator que interferiu de forma considerável na germinação ou no estabelecimento *in vitro* foi a incidência de contaminação endofítica. A presença de luz durante o processo germinativo pode indicar que a maioria das espécies avaliadas devem ser fotoblasticas positivas. De modo geral, observa-se que a falta de fitorreguladores na etapa de estabelecimento *in vitro*, para as variáveis analisadas, não se mostrou como fator limitante ao desenvolvimento inicial das sementes. No entanto*,* o uso de baixas concentrações de BAP ao meio de cultura pode potencializar o desenvolvimento dos explantes em etapas subsequentes. Na multiplicação de espécies lenhosas como paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) e sucupira branca, a utilização de fitorreguladores se mostrou promissora no desenvolvimento em etapas posteriores (CORDEIRO et al., 2004, PONTE, 1999). Desta forma, a composição do meio de cultura e fatores ambientais podem resultar na intensificação das respostas morfogênicas, bem como em maior número de explantes responsivos (GEORGE, 1993). Os resultados observados neste estudo evidenciaram que, a despeito da diversidade de espécies, os processos de estabelecimento *in vitro* assim como os meios de cultura indicados para arbóreas e palmeiras são adequados ao estabelecimento de uma estratégia massal para resgate e germinação de sementes de essências florestais brasileiras.

**Conclusões**

A utilização de sementes coletadas de frutos no final do desenvolvimento *in vivo* (frutos fechados, com sua abertura e remoção das sementes em ambiente laboratorial), associado à metodologia de germinação *in vitro* se mostrou eficiente para o estabelecimento de nove das 11 espécies de arbóreas, evidenciando que tal metodologia pode ser uma alternativa biotecnológica viável para a produção de mudas de diferentes essências florestais para dar suporte aos sistemas de produção agroecológicos.

**Referências Bibliográficas**

CORDEIRO, I.M.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos in vitro de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v.10, n.1, p.118-124, 2004.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L. & FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de mogno (Swietenia macrophylla King). **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.633-642. 2004.

CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wil. **Ciência Florestal**, v.9, n.2, p.1-7, 1999.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.23- 28, 1976.

FAY, M. F. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. ***In vitro* Cellular and Developmental Biology**, v.28, p.1-4, 1992.

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; PEREIRA, J.E.S.; NAGAO, E.O.; GUEDES, R.S. Calogênese e organogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Sm.) da Amazônia Ocidental: estabelecimento e regeneração de brotos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.13, supl., p.811-815, 2007.

FRANÇA, R.B.; SANTOS, D.S.B.; MOTA, M.G.C.; VIEIRA, I.M.S.; CABRAL, B.L.R. Indução e crescimento de plântulas de pau-rosa (*Aniba roseadora* Ducke) *in vitro*. In: REUNIÃO DOS BOTÂNICOS DA AMAZÔNIA, 2., Salinópolis, 1997. **Resumos**... Belém: Sociedade Botânica do Brasil, 1997.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. 2 d .England: **Exegetics Limited**, v.2, 709p., 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília**: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.43-76.

LEMOS, O.F. Produção de plântulas para micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos**... Águas de Lindóia, p.216. 1998.

LOPES, S.C. Micropropagação de mogno (*Swietenia macrophylla*). 2000. 53p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.

MAIA, GERDA NICKEL, (2006); **Tecnologias Apropriadas para Terras Secas: Manejo Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Semi-áridas no Nordeste do Brasil**; Fundação Konrad Adenauer e GTZ; p.169-172; Fortaleza, CE.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagem, v.15, p.473-479, 1962.

NASCIMENTO, P.K.V.; FRANCO, E.T.H.; FRASSETTO, E.G., Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl. 2, p.141- 143, 2007.

NUNES, E. C., CASTILHO, C. V., MORENO, F. N., VIANA, A. M. In vitro culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.70, n.1, p.259-268, 2002.

PONTE, E.M.D. Micropropagação de *Eucalyptus globulus* sp. Globulus Labill. 1999. 47p. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

SANTOS, JOSÉ ADELMO, (2008); Sistema agroecológico de produção e conservação de forragens na agricultura familiar - a experiência do sertão do pajeú – Pernambuco. **Monografia** do Curso de Especialização o Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Gestão e Manejo Ambiental em Sistemas Agrícolas, 44p. 2008.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. (2013); Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.33, n.76, p.439-453, out./dez. 2013.

EMBRAPA, (2012) [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio\_mata\_sul\_ pernambucana/arv ore/CONT000gx7tnuby02wx7ha0myh2lozpyw5rv.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_mata_sul_%20pernambucana/arv%20ore/CONT000gx7tnuby02wx7ha0myh2lozpyw5rv.html).

SOUSA, P. B. L.; SANTANA, J. R. F.; CREPALDI, I. C. & LIMA, A. R. Germination *in vitro* of seeds of a threatened arboreal specie in the municipal district of Abaíra (BA). **Sitientibus**, n.20, p.89-99. 1999.

VALVERDE-CERDAS, L.; DUFOUR, M.; VILLALOBOS, V. In vitro organogenesis in *Albizia guachapele*, *Cedrella odorata* and *Swietenia macrophylla* (Fabaceae, Meliaceae). **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v.42, p.225-228, 1998.