

XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

GERMINAÇÃO DE PLÂNTULAS DE ASPIDOSPERMA POLYNEURON *IN VITRO* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS EM MEIO MS

Thais Ferreira da Silva⁽¹⁾; Vera Lucia Araújo Leite⁽²⁾; Cloves Gomes Filho⁽³⁾

(1) Graduando em Licenciatura em Ciências Biológica - IFSULDEMINAS CAMPUS MACHADO; Machado, MG; Tffthais@yahoo.com.br; (2) Dr^a Biotecnologia IFSULDEMINAS CAMPUS MACHADO; Machado, MG; (3) Doutorando em Ciência IFSULDEMINAS CAMPUS MACHADO; Machado, MG.

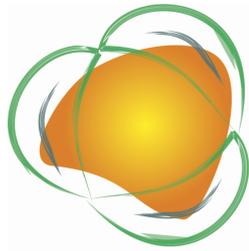
Eixo Temático: Conservação ambiental e produção agrícola sustentável

RESUMO - A *Aspidosperma polyneuron* encontra-se em risco de extinção, devido a sua regeneração irregular e a produção de sementes com pouca viabilidade quando dispersada pela planta. A micropropagação *in vitro* favorece a produção de plântulas saudáveis, modificando o aspecto morfológico da planta. O presente trabalho objetivou estabelecer melhores concentrações de sais do meio MS combinado a fitorreguladores para germinação *in vitro* de *Aspidosperma polyneuron* visando a germinação de plântula *in vitro*. Foi testado o meio MS com as seguintes concentrações de sais: 25%, 50%, 100% com ou sem a presença de fitoreguladores. Os resultados demonstram que, dentro das concentrações analisadas, nos tratamentos com maiores concentrações de sais (4,5 µM de BAP combinados com adição de 100% dos sais) as respostas foram mais satisfatórias o que permitiu uma germinação mais rápida das plântulas.

Palavras-chave: Peroba rosa. Micropropagação. Lenhosa. Espécie nativa.

ABSTRACT - The *Aspidosperma polyneuron* is endangered due to their irregular regeneration and seed production with little viability when dispersed by the plant. The *in vitro* micropropagation favors the production of healthy seedlings by modifying the morphology of the plant. This study aimed to establish better MS culture medium concentrations combined with growth regulators for *in vitro* germination of *Aspidosperma polyneuron* aimed at *in vitro* seedling germination MS medium was tested using the following salt concentrations: 25%, 50%, 100%, with or without the presence of phytohormones. The results demonstrate that, within the concentrations tested, treatments with higher salt concentrations (4.5 µM BAP combined with addition of 100% of salts) responses were more satisfactory allowing a faster germination seedling.

Key words: Peroba rosa. Micropropagation. Woody. native species.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Introdução

A exploração desordenada das florestas nativas e o uso desnecessário de áreas de preservação ambiental, tem posto muitas espécies e, até mesmo populações em risco de extinção, desta forma é essencial estudos que visem à qualidade e aperfeiçoamento para multiplicação em larga escala de espécies nativas para aplicação em plantios de recuperação em áreas degradadas.

Dias et al., 2012 mostrou que o uso de sementes, para produção de plântulas saudáveis vem sendo usado, isto por que normalmente ocorre excesso de contaminação por fungos e bactérias, o que dificulta a utilização direta de todas as sementes. Outra dificuldade enfrentada é a coleta de sementes que são em quantidades insuficientes para produção de novas mudas, muitas espécies produzem quantidades variáveis e em intervalos irregulares ao longo do tempo, aliado ao desconhecimento sobre a fenologia das espécies florestais nativas (Viani & Rodrigues, 2007).

Segundo Santos et al., 2011 As pesquisas favorecendo a utilização de tecnologias para reverter esse quadro de destruição das florestas nativas ainda é muito vago o campo de pesquisa em produção de tecnologias para espécies florestais bastante amplo.

Hoje encontra-se apenas 11,73 % da vegetação original de mata atlântica, e dentro destas a *A. polyneuron* tem grande valor econômico e ambiental, dentre as diversas utilidades deste tipo de planta, as características farmacológicas são citadas por diversos autores.

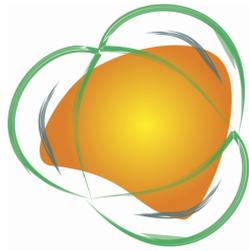
Usada na recuperação de mata ciliar a *A. polyneuron* se adapta a diversos climas e regiões sendo encontrada desde a Paraná até o sul da Bahia, com pouca ocorrência nos estados de Minas Gerais e Mato Grosso (Ribeiro et al. 2009).

Segundo Santos et al., 2011 as pesquisas relacionadas à clonagem de espécies florestais nativas, ainda são escassas. Atualmente, as aplicações da micropropagação de espécies nativas destinam-se, principalmente, aos genótipos considerados de difícil multiplicação pelos tradicionais métodos de propagação. Muitas vezes esses métodos são interrompidos pela ação do homem ou por falta de condição ambiental.

A micropropagação de espécies florestais é realizada via proliferação de gemas axilares, organogênese e embriogênese somática que pode ser feita a partir da calogênese e a formação de plântulas via seminal evitando a contaminação, gerando explantes puros (Xavier et al., 2013).

Com técnicas de culturas de tecidos vegetais, a calogênese é o processo pelo qual as massas celulares, são cultivadas, podendo representar um sistema de produção contínua de substâncias bioativas *in vitro* de maneira sustentável (Andrade, 2002). Tal técnica tem sido amplamente explorada na produção de metabólitos de interesse medicinal de espécies nativas brasileiras (Simões et al, 2012).

A micropropagação vem sendo usada cada vez mais em espécies florestais devido a sua rapidez e importância econômica. Fazendo uso desta técnica encontramos estudos direcionados a várias espécies como o *Pinus*, *Acacia seal*,



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

entre outros, o que tem despertado o interesse de diversos pesquisadores nesta áreas. Entretanto, mesmo com um grande número de pesquisas nesta á relatos de estudos mais detalhados sobre a *Peroba rosa* ainda são escassos (TONON et al.,2001).

A *Aspidosperma polyneuron* é uma espécie nativa bastante conhecido devido a sua exploração desordenada por madeira, ocorre em Mata Atlântica desde o sul do país abrangendo os estados de São Paulo, Minas Gerais e a Bahia. Apresenta madeira de excelente qualidade utilizada para fabricação de moveis em geral. Esta espécie encontra-se na lista de conservação ex situe e in situ no Brasil e na Venezuela (CARVALHO,1994).

A frutificação desta espécie é irregular, o que dificulta a propagação natural, além disso, o crescimento destas plantas é lento, as mudas que geralmente são plantadas não passam de 2,5 metros de altura. Outro fator é que estas não se propagam por estaquia, sendo necessário a propagação via seminal.

A época de colheita das sementes interfere diretamente na germinação, e favorecem a produção de mudas a partir do final do mês de outubro e começo de novembro. Não é recomendado o armazenamento das sementes de *A.polyneuron* por mais de 3 meses pois, estas perdem sua capacidade de germinação em longo prazo.

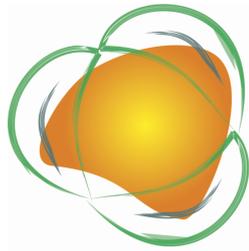
A propagação da maioria das espécies florestais é realizada via seminal, na maioria das espécies é uma forma de estabelecer plântulas livres de microrganismos patógenos que impedem o cultivo (Dias et al., 2012) favorecendo os menores custos de produção que o método tradicional. No entanto, há problemas quanto à propagação seminal de várias espécies florestais nativas devido à baixa porcentagem de germinação, que muitas vezes é decorrente da dormência das sementes (Ferrari et al., 2004).

Sobrosa & Corder, 2003 afirmam a escolha de explantes, é o principal fator que definirá o sucesso ou não da micropropagação pois os diferentes trabalhos publicados de micropropagação das espécies florestais brasileiras restringem apenas às primeiras fases da micropropagação, que incluem o estabelecimento e a multiplicação in vitro. Criando novos protocolos que levam ao sucesso da multiplicação.

Desta forma estabelecer um protocolo para a produção de *Aspidosperma polyneuron* torna-se um fator de importância tanto econômica quanto ambiental e ainda pode abrir possibilidades para processos em outras lenhosas que também encontram-se em processo de extinção.

Tipos de concentrações meios MS

Os protocolos de cultivo de plântulas normalmente são trabalhados com meios de cultura já consolidados, como os meios MS (Murashige e Skoog, 1962), Muitas vezes o uso do meio de cultura MS em determinadas espécies é feito sem há necessidade de suplementação do meio com sacarose. Em outras pesquisas pode ser que ao se adicionar sacarose ao meio de cultura, para manter a plântula in vitro por um período de tempo maior (Souza 2003).



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Os meios utilizados para formação de plântulas necessitam de uma adição de hormônios, podendo ser as auxinas, giberélicas, citocininas, etileno, ácido abscísico entre outros. O melhor desenvolvimento de plântulas está ligado a combinação desses hormônios gerando o melhor ambiente para a plântula em seu meio *in vitro*.

Material e Métodos

Sementes de *Aspidosperma Polyneuron* foram obtidas por de uma propriedade privada localizada na cidade de Carvalhopolis (Minas Gerais, Brasil). As sementes foram germinadas *in vitro*. O processo de assepsia foi realizado em pré limpeza com sabão neutro. Para o processo de desinfecção as sementes foram colocadas por 10 minutos em água corrente, posteriormente imersas em hipoclorito de sódio a 2,5% por 20 minutos. Após este período foram lavadas em água destilada estéril e posteriormente inoculadas em tubos de ensaio contendo 30 ml de meio de cultura.

Um fator que influencia diretamente na germinação *in vitro* é a presença de compostos fenólicos, que dificultam a germinação levando as sementes a sofrerem processo de oxidação. Para o controle de oxidações e contaminações foi adicionado ao meio PVP (polivinilpirrolidona) a 4,5% de concentração.

Para a indução de germinação de plântulas sadias foram utilizados das combinações de meio MS e fitorreguladores: MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30g.L⁻¹ de sacarose combinado ao fitorregulador BAP (benzilaminopurina) 1mg/L¹ nas seguintes concentrações (0, 2,5 3,5 4,5 µM).

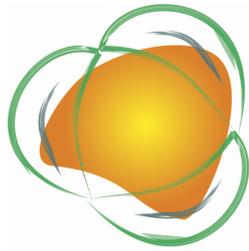
Utilizou-se também da auxina combinada ao meio MS com variações na concentração de sais do mesmo nas seguintes concentrações: MS¹ (25%), MS² (50%), MS³ (100%) em concentrações totais de sais.

Os meios foram solidificados com 7,5 g.L⁻¹ de ágar, com pH ajustado em 5,8 e a esterilização ocorreu em autoclave horizontal a 121°C por 15 minutos. Os experimentos foram organizados em esquema fatorial 4x6 e a avaliação dos foi realizada pela porcentagem de germinação após 30 dias de inoculação.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento a 27°C, no escuro nos primeiros 7 dias, e depois com fotoperíodo de 16 horas. A cada 30 dias, o material foi sub - cultivado em meio de cultura com a mesma composição e transferido para frascos maiores. Após 60 dias de cultivo, as plântulas permaneceram em sala de crescimento. Avaliando melhor desenvolvimento quanto ao meio cultivado.

Resultados e Discussão

Em todos os tratamentos utilizados as sementes germinaram produziram raiz primária, onde foram observados a coloração do explante, oxidação e contaminação variando de bege a marrom claro. Os explantes foliares, em sua maioria, abriram após 10 dias de cultivo, aparentemente com desdiferenciação em seus tecidos.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Dentre os meios testados meio MS 100% + BAP em 4,5 μM foram os que proporcionaram maior germinação. Quando considerado apenas a formulação nutritiva, o meio MS com 100% de sais resultou em maior crescimento das plântulas.

O uso do meio MS 100%+ 4,5 μM BAP possibilitou uma germinação mais rápida onde a auxina induz a germinação rápida dos explantes permitindo a obtenção de plântulas em grande escala (tabela 1). O percentual de germinação se manteve nos primeiros 30 dias de cultivo, usando o fito hormônio BAP em maior concentração no meio de cultura. O uso de BAP tem apresentado resultados favoráveis a germinação de espécie arbórea, uma vez que foram encontrados resultados significativos empregando o BAP em outras culturas (SANTOS et al., 2008; LOPES et al., 2012; PASA et al., 2012), uma vez que esta citocinina atua diretamente na germinação de sementes.

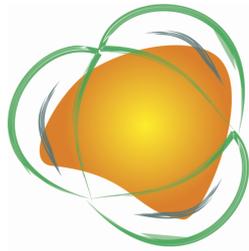
Apesar da germinação acontecer, há uma grande dificuldade em relação a produção de plântulas saudáveis e sem contaminação, devido a presença de compostos fenólicos liberados pelo explante.

Tabela 1: Germinação em diferentes concentrações de sais e hormônios.

TRATAMENTO S	MEIO DE CULTURA	FITORREGULADOR (BAP) μM	GERMINAÇÃO (%)	Nº BROTOS POR TRATAMENTO	OXIDAÇÃO (%)
T1	MS 25%	2,5 μM	30%	<1	70%
T2	MS 50 %	3,5 μM	40%	<3	60%
T3	MS 100%	4,5 μM	90%	>6	10%

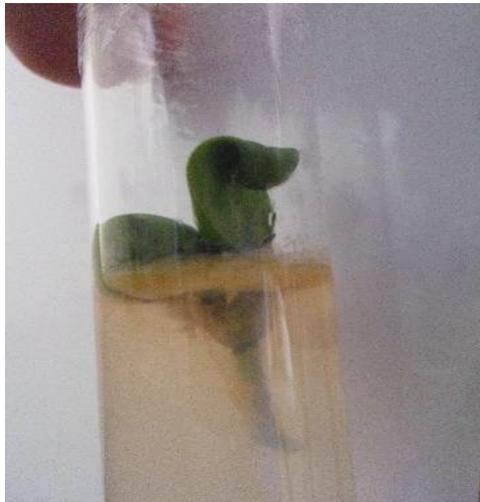
Em tratamentos com maiores concentrações de sais as respostas foram mais satisfatórias, isto em função de maior Concentração de nutrientes que permitiu uma germinação mais rápida. No tratamento 3 (T3) com a presença de 4,5 μM de BAP combinados com adição de 100% dos sais obteve-se melhores resultados.

Mesmo com a utilização de agente antioxidante (PVP) ocorreu oxidação em parte dos explantes (figura 1), possivelmente pela reação dos compostos fenolíticos liberados pela planta em contato com o meio de cultura e o oxigênio.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016



100%

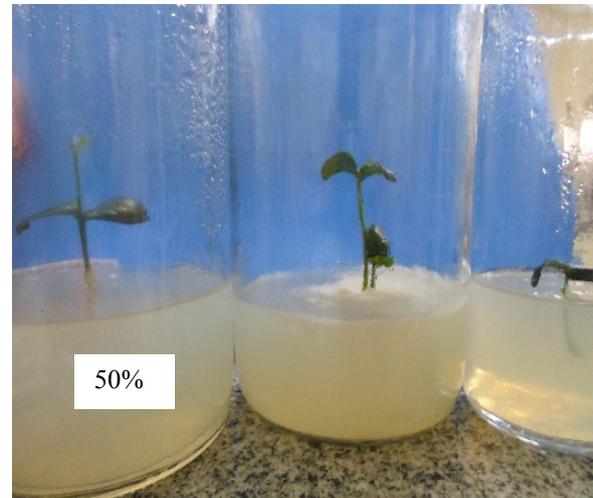


Figura 1: Explantes com crescimento após 30 dias de germinação em diferentes concentrações de sais em meio MS. Presença de oxidação na primeira imagem.

Conclusões

Outras formas de germinação das sementes de peroba é para que possa obter explantes livres de contaminação que irão contribuir para multiplicação de explantes de forma mais complexa sem contaminações e oxidações.

Atualmente existe poucos estudos na produção *in vitro* de *Aspidosperma polyneuron*, sendo escasso de referencial. Os estudos em espécies nativas ainda são escassos e necessitam de novos estudos para a recuperação para formação de novos reflorestamentos de espécies nativas.

A utilização de maiores concentrações de sais 100%, combinado a hormônio (4,5 μ M de BAP) resultaram em respostas mais satisfatórias.

Agradecimentos

Agradeço ao IFSULDEMINAS CAMPUS MACHADO pela disponibilização da bolsa de fomento interno para realização deste trabalho.

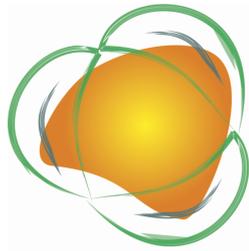
A todos que me apoiaram e estiveram ao meu lado durante cada etapa.

Aos meus professores que tornaram este trabalho possível.

Referências

ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Planaltina: Embrapa, 2002. 14p. Documento 58. Disponível em: http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/versaomodelo/html/2002/doc/doc_58.shtml acesso em 02/01/2016.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, v. 32, p. 72, p. 453-462, 2012.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, v. 32, p. 72, p. 453-462, 2012.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de espécies florestais. Colombo: Embrapa Floresta, 2004. 22 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 94).

LOPES, L. C.; MACHADO, I. S.; MAGOGA, E. C.; ANDRADE, J. G. de; PENNA, H. C.; MORAES, L. E. F. Cultura de embrião e indução de brotos in vitro para micropropagação do pinhão-manso. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 47, n. 7, p. 900-905, 2012.

PASA, M. da S.; CARVALHO, G. L.; SCHUCH, M. W.; SCHMITZ, J. D.; TORCHELSEN, M. de M.; NICKEL, G. K.; SOMMER, L. R.; LIMA, T. S.; CAMARGO, S. S. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento in vitro da amoreira-preta 'Xavante'. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, 2012.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, v.142, n.6, p.1141-1153, 2009.

SANTOS, J. P.; DAVIDE A. C.; TEIXEIRA, L. A. F.; MELO, A. J. S.; MELO, L. A. Enraizamento de estacas lenhosas de espécies florestais. *Cerne*, Lavras, v. 17, n. 3, p. 293-301. 2011.

SANTOS, M. D. M.; RIBEIRO, D. G.; TORRES, A. C. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 43, n. 9, p. 1115-1120, 2008.

SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in vitro. *Floresta e Ambiente*, Seropédica, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2003.

SOUZA, A. V. de. Propagação in vitro e aspectos anatômicos de arnica [*Lychnophora pinaster* (Mart.)]. 2003. 126 p. Dissertação (mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

VIANI, R. A. G.; RODRIGUES, R. R. Sobrevivência em viveiro de mudas de espécies nativas retiradas da regeneração natural de remanescente florestal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 42, n. 8, p. 1067-1075, 2007.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.