

PRODUÇÃO DE PLÂNTULAS *in vitro* A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTES DE SEMENTES DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc vaugh)

KIKUCHI, Tatiani Yuriko Pinheiro.¹; NUNES, Henriqueta da Conceição Brito.²; MOTA, Milton Guilherme da Costa.³; RIBEIRO, Sidney Itauran.⁴; VIEIRA, Irenice Maria Santos.⁵

INTRODUÇÃO

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) é uma espécie frutífera com potencial econômico por apresentar um alto teor de Ácido Ascórbico (vitamina C). O interesse pelo seu cultivo tem aumentado nos últimos anos devido a divulgação de técnicas de plantio, identificação de pragas e enfermidades, e as possibilidades de industrialização (Vilachica, 1996). Normalmente a propagação do camu-camu é feita por sementes, o que segundo Falcão *et al.* (1989) tem levado a uma desuniformidade na produção dos frutos. Buscando solucionar este problema, bem como desenvolver outros métodos de propagação e produção de mudas para o camu-camu, iniciou-se em junho/2000 no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia Vegetal da FCAP, trabalhos para a micropropagação "in vitro" de camu-camu.

As técnicas de biotecnologia têm apresentado novas alternativas para o melhoramento genético vegetal, principalmente para aquelas espécies cujo melhoramento convencional, por si só, não tem avançado. Esta técnica permite a multiplicação rápida de genótipos superiores, resgate de embriões de híbridos raros, conservação de germoplasma *in vitro*, produção de plantas transgênicas, dentre outras, porém o processo de regeneração de plantas *in vitro* é a maior limitação para sua aplicação (Emons *et al.* 1993). A micropropagação tem sido a principal aplicação prática das técnicas de cultura de tecidos de plantas. O uso tem viabilizado a propagação clonal em massa de plantas de bananeira (Cronauer & Krikorian, 1984) e de várias outras espécies frutíferas e ornamentais. Entretanto, um dos aspectos fundamentais para desenvolvimento de protocolos visando a micropropagação é a utilização de explantes assépticos.

Souza, *et al* (1997) avaliando fontes de explantes assépticos para o desenvolvimento de técnicas de propagação *in vitro* de Quina (*Quassia amara* L.) observou que as sementes com tegumento tratadas com álcool puro por quinze minutos, em seguida com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 20 minutos, posteriormente sem tegumento tratados em álcool a 70% durante 5 segundos, em seguida em NaOCl a 2% por 2 minutos e cultivadas em meio MS com a metade das concentrações dos sais minerais suplementado com 4,33M de Ácido Giberélico (AG₃) e ausência deste obteve-se 100% de germinação e nenhuma contaminação. Sabá, *et al* (1997) desenvolvendo a partir de germinação *in vitro* plantas assépticas de urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) conseguiram uma eficiência de 95,46 e 86,37% para 24 e 72 horas de imersão, respectivamente com desinfecção com álcool 70% por 30 segundos a 1% (NaOCl) por 15 minutos sob agitação, lavagem três vezes com água estéril e imersas em meio líquido MS com adição de sulfato de Streptomina (100. Mg. L⁻¹) e Benlate (200 mg. L⁻¹) a 40 rpm por 24 e 72 horas.

Este trabalho teve por objetivo avaliar os melhores tratamentos de assepsia para a produção de plantas assépticas a partir de sementes de camu-camu cultivadas *in vitro* com vista à estabelecer protocolos para iniciar a micropropagação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta dos frutos foi feita no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental, os quais foram levados para o Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da FCAP, onde foram lavados, despulpados e feita a retirada do endocarpo da semente em água corrente. Em seguida as sementes receberam os seguintes tratamentos de assepsia (Tabela 1).

Após a imersão das sementes em NaOCl, todos os tratamentos receberam sob câmara de fluxo laminar de três a cinco lavagens com água autoclavada. Posteriormente as sementes foram inoculadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com a metade das concentrações dos sais minerais, contendo 1% de Sacarose, 0,2 % de Phytigel e o pH do meio foi ajustado para 5,8. Após a inoculação os tubos foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16h / luz / dia e temperatura de 25° ± 2°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tubos de ensaio/tratamento, totalizando 80 tubos, e cada tubo representou uma repetição.

¹ Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/FCAP- Acadêmica do 7º Semestre do curso de Engenharia Agrônoma

² Engenheira Agrônoma - Aluna de Mestrado em Agronomia/Biologia Vegetal Tropical da FCAP.

³ Orientador - Prof. Dr. DBVF/FCAP

⁴ Pesquisador M. Sc. da Embrapa Amazônia Oriental CP. 48- CEP: 66095-100

⁵ Prof. Dr. Departamento de Química e Tecnologia-DQT/FCAP.

Depois de estabelecido o melhor tratamento de assepsia para sementes de camu-camu foi feito um outro experimento para germinação de plantas *in vitro* de diferentes explantes a partir de sementes de camu-camu. Os frutos foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em seguida levados para o Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da FCAP onde foram despulpados e lavados e feita a retirada do endocarpo da semente em água corrente, imersas em detergente durante 15 minutos e em seguida lavados com água destilada. Sob câmara de fluxo Laminar as sementes foram imersas em uma solução de NaOCl a 1% durante trinta minutos. Posteriormente, foram inoculados em meio MS, com cinco concentrações de Ácido Giberélico (AG₃): 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 M ou mgL⁻¹, sendo os explantes utilizados: Sementes inteiras; Sementes inteiras com corte no lado oposto ao embrião; Embrião + 50% de endosperma; Embrião + 25% de endosperma e Embrião isolado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 X 5 com 25 tratamentos (Tabela 2) com 10 repetições cada, totalizando 250 tubos de ensaio.

Tabela 1: Tratamentos de assepsia em camu-camu (*Myrciaria dubia*)

- A₁: Sem tratamento de assepsia (Testemunha);
 A₂: Termoterapia a 40°C/30' e Detergente Líquido/15' e NaOCl a 2%/30';
 A₃: Detergente Líquido/15' e NaOCl 2%/30';
 A₄: Detergente/15' e NaOCl 1%/30';
 A₅: Álcool Puro/1' e NaOCl 2%/15';
 A₆: Álcool Puro/1' e NaOCl 1%/15';
 A₇: Álcool Puro/10' e NaOCl 2%/10';
 A₈: Álcool Puro/10' e NaOCl 1%/10'.

Tabela 2: Diferentes tratamentos para produção *in vitro* de plântulas assépticas de camu-camu em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x5.

AG ₃ M ou mgL ⁻¹	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0
*C ₁	T ₁	T ₆	T ₁₁	T ₁₆	T ₂₁
C ₂	T ₂	T ₇	T ₁₂	T ₁₇	T ₂₂
C ₃	T ₃	T ₈	T ₁₃	T ₁₈	T ₂₃
C ₄	T ₄	T ₉	T ₁₄	T ₁₉	T ₂₄
C ₅	T ₅	T ₁₀	T ₁₅	T ₂₀	T ₂₅

* C₁: Sementes inteiras; C₂: sementes inteiras com corte na parte oposta ao embrião; C₃: Embrião + 50% de endosperma; C₄: Embrião + 25% de endosperma; C₅: Embrião isolado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

-Assepsia em sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia*): após 30 dias de cultivo *in vitro* foi observado que as sementes sem tratamento de assepsia (A₁) apresentaram 90% de contaminação por fungos. Enquanto que nos tratamentos (A₂, A₃, A₅ e A₇) utilizando NaOCl a 2% em diferentes tempos de imersão, observou-se que houve uma queima (oxidação) do tecido vegetal culminando em morte do embrião. As sementes imersas em álcool puro por 10' (A₇ e A₈) oxidaram em 70% dos tubos. No tratamento A₄ as sementes iniciaram o processo de germinação.

Após 60 dias de cultivo "in vitro" no tratamento A₄ ocorreu a formação de seis plântulas e quatro sementes apresentavam o embrião entumescido. Enquanto que nos demais tratamentos não houve respostas.

-Germinação de sementes de camu-camu *in vitro*: Os resultados para o experimento são ainda parciais. Até o presente verificou-se que a partir do 13º dia de cultivo *in vitro* nos embriões das sementes de alguns tratamentos houve indução de radícula, e após 30 dias de cultivo emissão do caulículo. A germinação das sementes de camu-camu pelo processo convencional ocorre aos 36 dias (KIKUCHI *et al*, 1998).

Os tratamentos T₄, T₉, T₁₄, T₁₉ e T₂₄ após 80 dias de cultivo os embriões apresentavam-se entumescidos e ressecados ou oxidados. O AG₃ é utilizado para quebrar a dormência das sementes e para acelerar o processo germinativo (FERRI, 1979), entretanto nesse experimento observou-se que o AG₃ influenciou a produção de plantas somente na concentração de 2,0 mgL⁻¹.

CONCLUSÃO

O tratamento mais eficiente para assepsia de sementes de camu-camu é a imersão em detergente líquido por quinze minutos, seguida da imersão em NaOCl a 1% por trinta minutos.

A produção de plântulas de camu-camu *in vitro* é influenciada na presença do meio MS implementado com 2 mgL⁻¹ de AG₃ a partir de explantes de sementes inteiras e sementes inteiras com corte no lado oposto do embrião.

BIBLIOGRAFIA

- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. Rapid multiplication of musa of bananas and plantains by in vitro shoot tip culture. **Hort Science**, Alexandria, v. 19, p. 324-325, 1984.
- EMONS, A. M. C.; SAMELLO-DOPPERS, A.; VAN DER TOOR, C. The influence of sucrose, mannitol, l-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of zea mays L. from suspension cultures. *Journal Plant Physiology*, v. 142, p. 597-604, 1993.
- FALCÃO, M.A.; FERREIRA, S.A.N.; FLORES, W.B.C.; CLEMENT, C.R. Aspectos fenológicos e ecológicos do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc. Vaugh) na terra firme da Amazônia central. **Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 10, Fortaleza, sbf. 1989. p.59-64.
- FERRI, M.G. *Fisiologia Vegetal 2*. SP: EPU, 1979,1985.
- KIKUCHI, T. Y. P.; ARAÚJO, J. M. F. de; SILVA, S. P. G. da; MOTA, M. G. da C; VIEIRA, I. M. S. Velocidade e Percentagem de germinação de sementes de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc. Vaugh.) em diferentes populações. In: VIII Seminário de Iniciação Científica da FCAP. **Resumos**. Belém, p. 166. 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures **Physiology Plantarum**, V.15, p.473-497, 1962.
- SABÁ, R. T; OLIVEIRA, R. de S. *et al.* Germinação *in vitro* de sementes de Urucu. II Reunião dos Botânicos da Amazônia. Sociedade Botânica do Brasil Sellicional da Amazônia 07 a 12 de dezembro de 1997- hotel solar, Salinópolis- PA. Resumos-MPEG.
- SOUZA, M. C.; LAMEIRA, O. A. GOMES, A. P do R.; BEM-BOM, L.S.P.; *et al.* Germinação *in vitro* de sementes de Quina. II Reunião dos Botânicos da Amazônia. Sociedade Botânica do Brasil Sellicional da Amazônia 07 a 12 de dezembro de 1997- hotel solar, Salinópolis- PA. Resumos-MPEG.
- VILACHICA, H. *Frutales y Hortalizas promisorios de la Amazonia*. Tca. Lima. 1996