

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE PAU-ROSA (*Aniba rosaeodora* DUCKE)

Lúcia Handa¹, Paulo de Tarso Barbosa Sampaio² & Regine Quisen³
¹Aluna do curso de Pós-graduação em Ciências florestais INPA/FUA. ²Pesquisador do CPST/INPA.
³Pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental. E-mail: lhanda@bol.com.br

INTRODUÇÃO

O pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) é uma espécie de notável valor econômico na região amazônica, no que se refere a produção de óleo, do qual é extralido o linalol, essencial largamente empregado como fixador de perfumes pelas indústrias de perfumarias de âmbito nacional e internacional.

A inclusão do pau-rosa na lista de espécie em risco de extinção, justifica-se pelo fato de que o processo tradicional de exploração na floresta, que consiste no corte raso de árvores adultas, acabou provocando a redução de suas populações naturais e impossibilitando a regeneração natural da espécie.

A propagação da espécie seja via sementes, estacas ou mudas de regeneração natural, apresentam determinados fatores limitantes, tais como: a produção irregular de sementes, a dificuldade de acesso às populações remanescentes, a predação dos frutos por pássaros e a baixa porcentagem de germinação das sementes (Araújo, 1987; Alencar & Araújo, 1980; Rosa et al., 1993; Sampaio, 1988).

O desenvolvimento de técnicas de reprodução, a exemplo da cultura de tecidos, pode contribuir para a reposição e aumento da produtividade de populações naturais através da multiplicação de genótipos superiores. A aplicação desta técnica em diversas espécies florestais, tem demonstrado a possibilidade de obtenção num curto espaço de tempo, de grandes quantidades de novas plantas a partir de um único explante em subcultivos periódicos.

O desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* de pau-rosa, além de possibilitar a produção de uma maior quantidade de mudas a ser disponibilizadas aos produtores, pode contribuir para a sua reposição através de plantas, contribuindo para a conservação da espécie e diminuindo assim a pressão sobre as populações naturais.

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer metodologia para a assepsia dos explantes de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) que possa viabilizar a cultura *in vitro* desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no Km 29 da Rodovia AM-010, Manaus, AM.

Os explantes e processos de assepsia utilizados estão descritos na tabela 1.

TABELA 1. Experimentos de desinfestação de explantes de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke)

Experimento	Tipo de Explante	Méio de cultura	Pré-tratamento Campo-laboratório	Assépsia dos explantes na câmara de fluxo laminar
01	Apice	MS	Campo: benomyl (1000mg/L) laboratório: benomyl (300 mg/L/16 horas)	Pré-tratamento com imersão em Benomyl (300 mg/L) por 15 h. Etanol 70% + 2-3 gotas de Tween 20/100 mL de solução por 1 minuto a 30 segundos. Seguindo do processo de assepsia em câmara de fluxo laminar com os tratamentos consistindo de combinação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0, 10, 15% com diferentes tempos de exposição (0, 10, 20 min) dos explantes às soluções. Lavagem 3 vezes em água destilada e autoclavada.
02	Segmento do nodal	MS	Campo: benomyl (1000mg/L)	Pré-tratamento com imersão em Benomyl (300 mg/L) por 15 h. Etanol 70% + 2-3 gotas de Tween 20/100 mL de solução por 1 minuto e 30 segundos. Seguindo do processo de assepsia em câmara de fluxo laminar com os tratamentos consistindo de combinação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0, 10, 15% com diferentes tempos de exposição (0, 10, 20 min) dos explantes às soluções. Inoculação em meio MS com suplementação de sacarose a 3% e ágar a 0,7%. Lavagem 3 vezes em água destilada e autoclavada.
03	Rebrota	MS	Campo: benomyl (1000 mg/L) laboratório: benomyl (400 mg/L/16 horas)	Imersão em Benomyl (400 mg/L) por uma noite como pré-tratamento. Imersão em Agriquina nas seguintes concentrações (0, 300, 400 e 500 mg/L) por 1 h e mantidas em etanol a 70% por um minuto e trinta segundos e hipoclorito de sódio a 10% por 10 minutos prosseguindo-se com as lavagens em água destilada e autoclavada e inoculadas em meio MS com suplementação de sacarose a 3% e ágar a 0,7%.
04	Rebrota	MS	Campo: benomyl (1000mg/L) laboratório: benomyl (400 mg/L/48 horas)	Pré-tratamento com imersão por 48 h em Benomyl (400 mg/L). Tratamento com bomba a vácuo a 180 mmHg por 30 segundos, pela combinação entre Agriquina (0,200, 500 mg/L) e Ampicilina (0, 300, 500 mg/L) e desinfestação com etanol a 70% com Tween-20, seguida de hipoclorito a 20% por 10 minutos e as lavagens, contendo ainda, com 7 tratamentos com 10 repetições por tratamento. O meio aséptico foi o MS com suplementação de sacarose a 3% e ágar a 0,7%.
05	Limbo foliar	MS + BAP (0,05 mg/L) + ANA (0, 1, 2 mg/L)	Campo: benomyl (1000mg/L) laboratório: benomyl (300 mg/L/48 horas)	Pré-tratamento com imersão em Benomyl (300 mg/L) por 48 h. Assépsia com imersão em etanol a 70% com Tween-20 por 1 minuto e 30 segundos, hipoclorito de sódio a 20% por 15 minutos, seguido das três lavagens em água destilada e autoclavada. Tratamentos consistiram na combinação dos reguladores de crescimento BAP 10, 0,5 mg/L e ANA (0, 1, 2 mg/L) no meio MS.
06	Embrão	MS + água de côco + PVP	Campo: benomyl (1000 mg/L) laboratório: benomyl (300 mg/L/16 horas)	Pré-tratamento com imersão por uma noite em Benomyl (300 mg/L). Assépsia em etanol a 70%, seguida de hipoclorito de sódio a 50% por 10 minutos e três lavagens em água destilada e autoclavada. Material inoculado em meio MS com 0,5 g/L de antioxidante PVP (Polivinilpirrolidona), 1,5 g/L de tioglicol, água de côco (0, 10, 20 mL) e sacarose nas concentrações de 0,5, 10, 15, 20%. *OBS: material de contaminação, transferido para meio MS a avaliação de ANA.

Após inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (25 °C), intensidade luminosa (25 mol.m⁻².s⁻¹) e fotoperíodo de 16 horas por 30 dias.

RESULTADOS

As culturas de ápices caulinares, segmentos nodais e discos foliares apresentaram 100% de contaminação por fungos e bactérias, sendo portanto os tratamentos aplicados ineficazes para a desinfestação destes explantes na cultura *in vitro* de pau-rosa.

Quanto ao processo de assepsia dos ápices advindos de rebrota, observou-se que a menor porcentagem de contaminação foi obtida com 33% de contaminação fúngica e 29% de contaminação bacteriana mediante a imersão por 1 hora em solução contendo Agriquina a 300 mg/L, evidenciando que a adição de sulfato de estreptomina foi eficaz no estabelecimento *in vitro* das rebrotas de mudas. Entretanto são necessários novos testes envolvendo combinações de concentrações e tempos de exposição com outros fungicidas e/ou bactericidas para melhoria deste processo.

Os tratamentos da desinfestação dos embrões de pau-rosa apresentaram diferenças significativas na contaminação fúngica, oxidação e sobrevivência destes explantes (Tabela 2).

TABELA 2. Efeito da concentração de hipoclorito de sódio a 50% por 10 minutos em diversas concentrações de sacarose e água de côco na desinfestação de embrões de Pau-rosa.

Tratamento	NaOCl (%)	Tempo (min)	Sacarose (%)	Água de côco (mg/L)	Contaminação (%)		Oxidação (%)		Sobrevivência (%)	
					Fungo	Bactéria	2abc	72 abc	3abc	90 abc
1	50	10	0	0	28 abc	0 a	2 abc	72 abc		
2	50	10	0	10	10 bc	0 a	3 abc	90 abc		
3	50	10	0	20	0 c	0 a	4 abc	100 a		
4	50	10	5	0	19 bc	3 e	0 c	71 abc		
5	50	10	5	10	30 abc	4 e	1 bc	70 abc		
6	50	10	5	20	20 bc	0 a	7 a	60 abc		
7	50	10	10	0	58 abc	3 e	1 bc	42 abc		
8	50	10	10	10	38 abc	3 e	0 ab	62 abc		
9	50	10	10	20	69 abc	5 e	1 bc	31 bc		
10	50	10	15	0	19 bc	0 a	2 abc	81 abc		
11	50	10	15	10	56 abc	6 e	4 abc	41 abc		
12	50	10	15	20	69 abc	7 e	0 c	11 c		

Méio regulador de crescimento não diferiu entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A sobrevivência do tratamento 3 foi de 100%, indicando que a desinfestação das sementes com hipoclorito de sódio a 50% por 10 minutos foi satisfatória na assepsia de embrões de pau-rosa.

Resultados similares foram observados por Gomes *et al.* (1997), que trabalhando com embrões de *Cedrela odorata* obtiveram 100% de germinação com assepsia em hipoclorito de sódio (2%) e adição de 1% de sacarose em meio de cultura, enquanto que sementes e embrões de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) tratados com temperatura (40°C por 30 minutos) e hipoclorito de sódio por 30 minutos obtiveram 95% de embrões assépticos (Souza *et al.*, 1997). Em embrões imaturos de *Coffea* sp., a utilização de 0,5% de bicloreto de mercúrio proporcionou 100% de embrões assépticos. (Raghuramulu, 1989 *apud* Andrade, 1998).

O controle da oxidação em explantes cultivados *in vitro* é um fator de fundamental importância para o sucesso da cultura. Observa-se pela Tabela 2 que existem diferenças significativas entre as médias, pelo teste de Tukey. Os tratamentos mais eficientes para reduzir a oxidação dos explantes de pau-rosa foram o 4 e o 12, indicando que nestes tratamentos ocorreu uma menor liberação de fenóis no momento da inoculação.

Aos 45 dias, os explantes isentos de contaminação foram avaliados quanto a porcentagem de germinação, existindo diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan (Tabela 3). O melhor tratamento foi o n^o4, com suplementação de 20 mg/l de água de côco, induzindo 53% de germinação. Os explantes avaliados apresentavam liberação dos primórdios foliares e a formação de radícula em alguns tratamentos, como 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, evidenciando que as concentrações de sacarose e de água de côco são fundamentais no estabelecimento de embrões de acordo com o estágio de desenvolvimentos dos mesmos.

TABELA 3. Porcentagem de germinação de embrões de Pau-rosa.

Tratamento	Sacarose (%)	Água de côco (mg/L)	Germinação (%)
T1	0	0	8 c
T2	0	10	9 c
T3	0	20	25 abc
T4	5	0	53 a
T5	5	10	25 abc
T6	5	20	48 ab
T7	10	0	42 ab
T8	10	10	18 bc
T9	10	20	18 bc
T10	15	0	34 abc
T11	15	10	19 bc
T12	15	20	10 c

Méio regulador de crescimento não diferiu entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Após a avaliação, os embrões germinados foram transferidos para meio MS acrescidos de reguladores de crescimento ANA (0, 1; 0, 6) e BAP (0, 1; 0, 5), para dar continuidade ao processo de estabelecimento desta cultura. Após 30 dias, observou-se o início de indução de formação de calos em determinados tratamentos (tratamentos 4 e 5) e a germinação a partir de embrões, indicando a possibilidade da propagação a partir de embrões por embriogênese somática.

Os resultados obtidos neste trabalho, demonstraram a necessidade de maior aprimoramento nos processos de desinfestação de explantes para o estabelecimento *in vitro* de pau-rosa e que, a cultura de embrões zigóticos constituem uma fonte promissora para a cultura de tecido e da espécie, inclusive como ponto de partida de sua embriogênese somática.

BIBLIOGRAFIA

- ANDRADE, M. C. O. 1988. Caracterização de técnicas de cultura de tecidos para o castaño. Livro UFLA. 83p. (Dissertação de mestrado).
ALENCAR, G. C., Araújo, V. C. de. 1980. Comportamento de espécies florestais amazônicas quanto à luminosidade. *Acta Amazonica*, Manaus: INPA (198): 436-444.
ARAÚJO, V. C. de. 1987. Sementes germinadas de *Aniba* (Lauraceae) L. A. *Acta Amazonica* (Pau-rosa) Botânica. Manaus: INPA, 23 p. (Boletim do INPA).
GOMES, A. P. de R., Landino, D. A., Lopes, S. de C., Mendes, C., Lobo, N. V. M. 1997. Germinação de sementes de castaño (Castanea coccinea) submetidas a diferentes concentrações de sacarose em relação à luminosidade. In: *Seminário de Iniciação Científica do FCAV-7*, *Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental*, 1. Manaus: Belém: FCAV p. 275-276.
RAGHURAMULU, V. 1989. Antibiotic and endospore culture of *Coffea*. *Journal of Research*, 19(2): 71-81.
SOUZA, K. S. de, Nunes, H. de C.B., Silva, S.P.G. de, Viana, L.M.S., Moura, M. S. de. 1997. Produção *in vitro* de plântulas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). An. *Seminário de Iniciação Científica do FCAV-7*, *Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental*, 1. Manaus: Belém: FCAV, p. 371-373.
ROSA, L. S., Oshadi, S. T., Sampaio, J. A. S., Oliveira, F. A. 1993. Estágio atual de contaminação sobre a formação de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). In: *1º Congresso Florestal Brasileiro*, Anais. Curitiba: SBREF, p. 761.
SAMPAIO, P. T. S. 1988. Propagação vegetativa de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) pelo método da estaca. Manaus: INPA. 112p. (Dissertação de mestrado).

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO

Embrapa

GOVERNO
FEDERAL
Trabalhando em todo o Brasil

Apoio Financeiro: Fundação O. Botânico de Proteção à Natureza