

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTIFICA

ESTABELECIMENTO IN VITRO DE JATOBÁ (*Hymenaea Coubaril*
L)

BOLSISTA: Vanine Leandro da Silva, Fapeam

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E POS GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIBIC- 2013

ESTABELECIMENTO IN VITRO DE JATOBÁ (*Hymenaea Coubaril*
L)

BOLSISTA: Vanine Leandro da Silva, Fapeam

ORIENTADOR: Eduardo Ossamu Nagao

MANAUS

2014

RESUMO

As sementes do jatobá apresentam dormência do tipo tegumentar, fato que dificulta a penetração da água. Por este motivo, a formação de mudas do jatobá é trabalhosa, havendo baixa percentagem de germinação e grande variação no tempo necessário a germinação. A micropropagação *in vitro* oferece excelentes oportunidades para a propagação comercial de plantas, como também pode auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando, neste caso, grande economia de tempo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinação e definir um protocolo para A multiplicação “*in vitro*” de jatobá (*Hymenaea courbaril* L). Foram avaliados os índices de germinação, considerando germinada ao emitir radícula, nível de contaminação, crescimento e sobrevivência das plântulas. Foram realizados quatro ensaios, o primeiro com 100 sementes divididas em quatro lotes de 25 cada, neste ensaio quatro tratamentos foram utilizados, sendo o primeiro com sementes escarificadas deixadas por 24 horas em água quente, o segundo com sementes intactas deixadas por 24 horas em água quente, o terceiro com sementes escarificadas deixadas por 24 horas em água na temperatura ambiente e o quarto sementes intactas deixadas por 24 horas em água na temperatura ambiente. No segundo ensaio, foi realizada uma tentativa de estabelecer as plântulas sobreviventes do primeiro ensaio *in vitro*, os explantes foram cortados na base media do caule, em relação á protusão radicular, tendo somente a parte aérea inoculada. Para o terceiro ensaio, foram usadas 100 sementes divididas em dois lotes, 50 sementes escarificadas e 50 sementes intactas, no meio de cultura foi adicionado fungicida (Bentate) para tentar conter as infestações fungicas. Já no quarto ensaio foram utilizadas apenas 50 sementes escarificadas, vendo que o desponete auxilia na quebra de dormência, neste ensaio a assepsia foi realizada com álcool 70% acrescido com 23 gotas

de tween 80. Foi possível observar maior índice de germinação nas sementes que sofreram o desponte, porém ao fazer a escarificação com o corte usando a tesoura de poda notou-se um auto índice de contaminação.

ABSTRACT

The seeds of the present dormancy jatobá the cutaneous type, a fact that hinders the penetration of water. For this reason, the formation of seedlings jatobá is laborious, with low germination percentage and wide variation in the time required germination. The *in vitro* micropropagation offers excellent opportunities for commercial propagation of plants, but can also assist in breeding programs, enabling, in this case, great timesaver. This study aimed to evaluate the germination and establishing a protocol for the "*in vitro*" jatoba (*Hymenaea*. L) multiplication. The germination rates, considering the issue germinated radicle, level of contamination, growth and seedling survival were evaluated. Four trials, the first with 100 seeds divided into four batches of 25 each, this test four treatments were used, the first with scarified seeds left for 24 hours in warm water, the second with intact seeds left for 24 hours in water were performed hot scarification with the third left for 24 hours in water at room temperature and left intact seeds in water for 24 hours at room temperature. In the second experiment, an attempt to establish the surviving seedlings of the first *in vitro* assay was performed, the explants were cut at the base of average stem, root protrusion in the relationship, having only the inoculated shoots. For the third test, 100 seeds were divided into two batches 50 and 50 scarified seeds intact seeds were used, the culture medium was added to the fungicide (Bentate) to contain fungal infestations. In the fourth trial were used only 50 scarified seeds, seeing that lopping assists in breaking dormancy in this essay the sterilization was performed with 70% ethanol supplemented with 23 drops of Tween 80. Was possible to observe a higher rate of germination in seeds that have suffered the lopping, however in doing scarification by cutting using the pruning shears was noted a self contamination rate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1-Temperatura da água vs escarificação -----	12
Tabela 2- Estabelecimento de ápice de plântulas de jatobá in vitro -----	13
Tabela 3- Sementes com escarificação vs fungicida-----	13
Tabela 4- Sementes escarificadas vs assepsia de álcool 70% e tween 80 -----	14

SUMÁRIO

1- Introdução-----	8
2- Metodologia do Trabalho-----	10
3- Resultados e Discussão-----	11
4- Conclusões -----	15
5- Referencias -----	16

1-INTRODUÇÃO

O jatobá (*Hymenaea courbaril*) é uma espécie arbórea muito vistosa, pertencente à família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Caesalpinoideae. É encontrada por toda América. O jatobá além da importância ecológica apresenta potencial agrônomo para utilização do caule e dos frutos. DESENVOLVIMENTO (LORENZI e MATOS, 2002; FERREIRA e SAMPAIO, 2000).

As sementes do jatobá apresentam dormência do tipo tegumentar, fato que dificulta a penetração da água. Por este motivo, a formação de mudas do jatobá é trabalhosa, havendo baixa percentagem de germinação e grande variação no tempo necessário a germinação. O cultivo de espécies que apresentam sementes dormentes torna-se um problema devido ao tempo demorado de germinação que atrasa o desenvolvimento das mudas e principalmente, ao fato, de que, após a semeadura, quando em muito tempo no solo, as sementes ficam suscetíveis à ataques de fungos (SANTOS et al., 2004).

Em espécies que apresentam dificuldade de propagação por essas vias, como é o caso do jatobá, a micropropagação é uma ferramenta importante para a multiplicação dessa espécie. A cultura de tecidos consiste no cultivo de órgãos, células ou tecidos vegetais em meio nutritivo apropriado, em condições ambientais assépticas. A propagação vegetativa *in vitro* ou clonagem *in vitro*, também denominada micropropagação, é a técnica de cultura de tecidos de maior impacto e tem mostrado enorme importância prática e potencial nas áreas agrícola, florestal e hortícola (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; KERBAUY, 1998; BORGATTO e HAYASHI, 2002).

A dormência das sementes de leguminosas é uma característica hereditária, atribuída à camada de células em paliçada, cujas paredes celulares são espessas e recobertas externamente por uma camada cuticular cerosa. Em condições naturais, essa

impermeabilidade se reduz gradualmente, de modo que certa proporção de sementes germina a cada período.

Por este motivo, a formação de mudas de jatobá é trabalhosa, havendo baixa percentagem de germinação e grande variação no tempo necessário a germinação, fato que dificulta a reprodução da espécie em sementeiras. A propagação de espécies florestais normalmente é via sementes, com exceção de algumas espécies que podem ser multiplicadas via estaquia de material juvenil. Técnicas baseadas na micropropagação de plantas podem ser empregadas com sucesso para a propagação massal de genótipos selecionados, visando à conservação e melhoramento genético.

A micropropagação *in vitro* oferece excelentes oportunidades para a propagação comercial de plantas, como também pode auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando, neste caso, grande economia de tempo. Facilita a obtenção de grande número de plantas, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; TORRES et al, 2001). Nesse sentido, a cultura de tecidos destaca-se entre os métodos clássicos de propagação vegetativa, por necessitar de menor espaço físico e pelo fato de poder ser desenvolvida em qualquer época do ano.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a germinação e definir um protocolo para a multiplicação “*in vitro*” de jatobá (*Hymenaea courbaril* L).

2-METODOLOGIA DO TRABALHO

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal da Universidade Federal do Amazonas. No primeiro ensaio foram utilizadas 100 sementes, separadas em quatro lotes, e todas passaram por um processo de assepsia em que foram lavadas com detergente por 15 minutos, água sanitária 20 minutos. E neste ensaio foi realizado quatro tratamentos, sendo o primeiro com vinte e cinco sementes escarificadas colocadas em água quente, o segundo com vinte e cinco sementes intactas colocadas em água quente, o terceiro com vinte e cinco sementes escarificadas colocadas em água na temperatura ambiente e o quarto com vinte e cinco sementes intactas colocadas em água na temperatura ambiente, todas foram deixadas por um tempo de 24 horas, após esse período as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo papel filtro. O segundo ensaio foi feito para o estabelecimento das plântulas obtidas no primeiro experimento. Os explantes foram cortados na base média do caule em relação à protusão radicular, somente a parte apical foi inoculada. Foram utilizados frascos contendo meio de cultura com Agar, para proporcionar melhores condições aos explantes.

Para o terceiro ensaio foram usadas 100 sementes divididas em dois lotes com cinquenta sementes escarificadas com o auxílio de tesoura de poda esterilizada, e cinquenta sementes intactas. Todas as sementes passaram por um processo de assepsia, com detergente há 15 minutos e água sanitária há 20 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada dentro da câmara de fluxo laminar. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com algodão ao fundo, contendo 10 ml de meio de cultura líquido acrescido com fungicida (Benlate), com a tentativa de evitar uma infestação fúngica.

No quarto ensaio foram usadas apenas cinquenta sementes escarificadas, estas foram lavadas com detergente e deixadas em um béquer com água sanitária há 70% por 20

minutos, e foram lavadas com água destilada em abundância. Em seguida foram levadas para dentro da câmara de fluxo laminar, onde sofrerão um despolimento na área proximal e na distal em relação ao local de protrusão da radícula, após o corte as sementes foram novamente lavadas com água destilada e 5 gotas de tween 80, e deixadas em um recipiente com álcool 70% acrescido de 23 gotas de tween 80 por 20 minutos. Passado esse tempo as sementes foram inoculadas em frascos contendo algodão autoclavado e meio de cultura líquido.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio foi possível notar maior índice de germinação nos tratamentos 1 (semente com corte e água quente) e 2 (semente intacta e água quente), em seguida do tratamento 3 (semente com corte e água na temperatura ambiente), o pior tratamento foi o 4 (semente intacta e água na temperatura ambiente). Por apresentar menor índice de germinação e de sobrevivência. Porém, apesar de a escarificação se mostrar eficiente, houve grande quantidade de contaminação devido ao despolimento.

Temperatura da água VS Escarificação

Tabela1

Tratamento		Contaminação	Germinação	Sobrevivência
1	H2O Quente Semente c/ corte	13 = 52%	19 =76%	12=48%
2	H2O Quente Semente intacta	17 = 68%	13 =52%	12=48%
3	H2O a temperatura ambiente semente c/ corte	8 = 32 %	11 =44%	6=24%
4	H2O a temperatura ambiente semente intacta	16 = 64 %	9 =36%	3=12%

Das plântulas sobreviventes do primeiro ensaio, foi realizada uma tentativa de estabelecimento in vitro. Foram inoculadas 30 explantes, de onde 17 contaminarão e 13 germinaram.

Estabelecimento do ápice das plântulas de jatobá in vitro

Tabela 2				
TOTAL	Contaminação	Germinação	Sobrevivência	Cont. Final
30	17=57%	13=43%	8=27%	22=73%

No terceiro ensaio notou-se que a escarificação realmente se faz eficiente para a quebra de dormência das sementes, e para tentar solucionar o problema de contaminação foi feito o uso de fungicida acrescido ao meio de cultura. Entretanto os números de contaminação nos testes ainda foram elevados, mesmo após a germinação, as sementes continuaram a fungar.

Sementes com escarificação vs Fungicida

Tabela 3					
TOTAL	Tratamento	Contaminação	Germinação	Sobrevivência	Cont. Final
50	Sementes com corte	27=54%	23=46%	17=34%	33=66%
50	Sementes sem corte	33=66%	17=34%	10=20%	40=80%

Do quarto ensaio, em que todas as sementes sofreram um despolimento, pode ser observado que metade das sementes obtiveram sucesso de germinação. E com uma média de sobrevivência alta comparada aos tratamentos anteriores.

Tabela 4 **escarificadas vs assepsia de álcool 70% e tween 80**

TOTAL	Contaminação	Germinação	Sobrevivência	Cont. Final
50	25=50%	25=50%	23=46%	27=54%

4-CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos o ensaio quatro com o desponte da semente e assepsia feita com álcool 70% acrescido de 23 gotas de tween 80, é o mais indicado para germinação e descontaminação das sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril* L). Comparado com o tratamento quatro do primeiro ensaio em que as sementes foram mantidas intactas e deixadas em água a temperatura ambiente.

5-REFERENCIAS

BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A. de; KLUGE, R.A. (org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-254.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R. C.; CODER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Willd.), **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 004, p. 493 – 497, 2004.

CID, L. P. B. et al. Micropropagation of *Miconia* sp., a woody Melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.1, p.21-25, 1997.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H; **Handbook of Seed Germination for Genebanks**. Rome: IBPGR, 1985. p. 211-667.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T. Efeito do ANA e BAP na calogênese de organogênese de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 92-96, 2007.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. p. 183-260.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 2, p. 519 – 531.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. DE A. *Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002. 512 p.

MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology . Plant**, v.41, p.602-619, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.1, p.437-497, 1962.