

## ASSEPSIA E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *ADENIUM OBESUM*

Rogério Greique Machado Junior<sup>1</sup>  
Dayane Ávila Fernandes<sup>2</sup>

### RESUMO

A rosa-do-deserto (*Adenium obesum* (Forssk.) tem sido bastante utilizada no paisagismo, porém faltam estudos científicos para definir uma melhor técnica de propagação que proporcione resultados satisfatórios. Neste contexto, objetivou-se avaliar doses de hipoclorito na assepsia de sementes de rosa-do-deserto inoculadas *in vitro*. O experimento foi realizado no laboratório de Biotecnologia do UNIVAG – Centro Universitário, localizado em Várzea Grande-MT, no período de novembro a dezembro de 2016. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos compostos pelas doses de hipoclorito (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) com 20 repetições. As avaliações iniciaram a partir do terceiro dia após a inoculação diariamente durante 30 dias. As variáveis avaliadas foram; germinação (%) e número de sementes contaminadas por fungos e/ou bactérias. De acordo com os resultados não houve diferença significativa entre os tratamentos. Não houve contaminação por microrganismos, porém a germinação foi baixa, sugerindo que os produtos utilizados na assepsia podem ter influenciado nesse comportamento.

**Palavras-chave:** flor do deserto, micropropagação, inoculação.

### ABSTRACT

The desert rose (*Adenium obesum* (Forssk.) has been widely used in landscaping, but scientific studies are lacking to define a better propagation technique that provides satisfactory results. In this context, the objective was to evaluate hypochlorite doses in asepsis of rose seeds. The experiment was carried out in the biotechnology laboratory of UNIVAG - Centro Universitario, located in Várzea Grande, state of Mato Grosso, in the period from november to december 2016. The treatment was completely randomized with five treatments composed of doses of hypochlorite (0; 0,5; 1,0; 1,5 and 2,0%) with 20 replicates. The evaluations started from the third day after inoculation daily for 30 days. The variables evaluated were: germination (%) and number of seeds contaminated by fungi and / or bacteria. There was no contamination by microorganisms, but the germination was low, suggesting that the products used in asepsis may have influenced this behavior.

**Keywords:** desert flower, micropropagation, inoculation.

<sup>1</sup> Discente do curso de Agronomia do Univag Centro Universitário. Email: junior.greique@gmail.com

<sup>2</sup> Docente do curso de Agronomia do Univag Centro Universitário. Email: dayavila1@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A floricultura empresarial brasileira vem adquirindo notável desenvolvimento e se caracteriza já como um dos mais promissores segmentos da horticultura intensiva dos agronegócios nacionais. Nesse novo panorama estão sendo geradas inúmeras novas oportunidades de negócios e de inserção comercial competitiva, eficiente e sustentável para os polos emergentes de produção distribuídos por todo o País (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

A sustentação econômica essencial da atividade é garantida pelo vigor do mercado interno, visto que as exportações, ainda que conquistando sucessivos recordes observados ao longo da presente década, ainda pouco ultrapassa a cifra de U\$ 35 milhões em vendas anuais, ou o equivalente a 2,7% do valor total da produção, com crescentes embarques para a Holanda, EUA, Japão, Espanha, França e mais outros 30 diferentes destinos em todo o mundo (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

A rosa do deserto (*Adenium obesum* (FORSSK) ROEM; SCHULT.) é uma Apocynaceae. Esta família é composta por herbáceas, arbustos, árvores e lianas, geralmente latescentes. Espécie suculenta de aspecto escultural, *Adenium obesum* é bastante utilizada no paisagismo. Caracteriza-se por sua ramagem espessa e base caular dilatada. Apresenta folhas de tom verde escuro e flores grandes de coloração rósea, vermelha, branca ou amarela, além de exemplares variegados. De crescimento lento, pode ser propagada por sementes e estacas (ROMAHN, 2012). Apesar de sua presença crescente nos jardins brasileiros, ainda faltam estudos científicos sobre os métodos mais adequados de propagação e produção comercial de mudas (SOUZA; LORENZI, 2012).

A propagação da rosa do deserto pode ser feita através de sementes ou estacas. A primeira opção não é confiável devido à baixa produção de sementes, resultado de problemas de polinização e possíveis flores estéreis masculinas e femininas (McLAUGHLIN; GAROFALO, 2002). O método de propagação mais fácil é por estaquia, porém as plantas obtidas por este método não são bem aceitas no mercado ornamental, pois produzem caules subterrâneos e não apresentam a mesma exuberância das plantas propagadas via sementes,

estudos relatando o cultivo *in vitro* de plantas do gênero *Adenium* são escassos na literatura (KANCHANAPOOM et al., 2010).

Portanto, a propagação *in vitro* de plantas tem apresentado algumas vantagens, como possibilitar maior controle sobre a sanidade do material propagado e também possibilitar a obtenção de várias plantas, a partir de um único explante inicial, independentemente de condições climáticas; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; melhores condições sanitárias por meio do cultivo de meristemas previamente tratados por termoterapia, para eliminação de doenças; reprodução do genótipo da mãe, geralmente com fidelidade durante multiplicação e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (CARVALHO et al., 2006).

O estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação. Os meios de cultura são ricos em compostos orgânicos como açúcares, aminoácidos e vitaminas, os quais proporcionam condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias e fungos (GEORGE, 1993). A efetividade da desinfestação do explante é dependente do tipo e idade do material utilizado, do tipo e concentração do desinfetante e do tempo de exposição do explante ao agente (SMITH, 2000).

A presença de fungos e bactérias é um fator que pode reduzir tanto a capacidade germinativa quanto o vigor das sementes. Uma forma de evitar contaminantes é a utilização de desinfetantes ou alvejantes domésticos, como o hipoclorito de sódio (RIBEIRO et al., 2009). Em fitopatologia, compostos a base de cloro são utilizados na eliminação de contaminantes superficiais de material vegetal e de ambientes (COUTINHO et al., 2000).

Neste contexto, objetivou-se avaliar doses de hipoclorito na assepsia de sementes de rosa-do-deserto inoculadas *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no no laboratório de Biotecnologia do UNIVAG-Centro Universitário, localizado em Várzea-Grande – MT, no período de novembro a dezembro de 2016.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos relativos às doses de hipoclorito (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) com quatro repetições, compostas por cinco frascos de vidro com três sementes cada.

As sementes de *Adenium obesum* foram obtidas através de loja virtual especializada em sementes de rosa do deserto com sede em Divinópolis-SC (20° 08' 20'' S) e (44° 53' 02'' W) com uma altitude média de 712 metros em relação ao nível do mar.

Os recipientes utilizados para inocular as sementes foram frascos cilíndricos de vidro com capacidade de 250 ml, diâmetro externo de 68 mm e altura de 100 mm. Em cada frasco foi adicionado 20 ml de meio de cultura MS, formulado por Murashige e Skoog (1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 3 ml L<sup>-1</sup> de BAP, solidificado com 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup> e pH ajustado em 5,8 ±0,2. Após o preparo, os frascos foram levados para a esterilização em autoclave, em temperatura de 120°C e 1 kgf cm<sup>-2</sup> de pressão, por 20 minutos. Na sequência foram retirados da autoclave, armazenados em estante na sala de repicagem para resfriar em temperatura ambiente e solidificar o meio de cultura.

Foram separados cinco frascos de vidro contendo 20 sementes cada que posteriormente foram utilizadas para compor as repetições. Estas sementes foram lavadas com detergente Tween 20<sup>®</sup> (3 ml L<sup>-1</sup>) diluído em água destilada, mexendo por três minutos e enxaguadas três vezes com água destilada. Na sequência foram adicionados 20 ml de álcool 70% (v/v) em cada frasco com as sementes que foram agitadas por três minutos, seguido por três enxágues em água destilada. Em seguida, as sementes foram embebidas por 10 minutos em soluções contendo as doses de hipoclorito de sódio 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (v/v) de cloro ativo, com subsequentes três enxágues em água destilada e autoclavada.

Para finalizar a assepsia foram então colocadas em sacos plásticos (15x27 cm) contendo 0,5 ml do fungicida Vitavax-thiram<sup>®</sup> (1% m/v carboxina + 1% m/v tiram) e homogeneizadas por fricção até a cobertura total das sementes pelo produto. A determinação da dose foi feita de acordo com a quantidade adequada para cobertura das sementes e não foi realizado mais nenhum enxágue. Os tratamentos com 0,0% de hipoclorito das três matrizes

passaram apenas pela limpeza com detergente Tween 20<sup>®</sup>, álcool etílico 70% (v/v) e contato com o fungicida.

Após a desinfestação as sementes foram então inoculadas nos frascos contendo meio de cultura previamente preparado em câmara de fluxo laminar previamente homogeneizada com álcool 70% e as pinças utilizadas para colocar as sementes em contato com o meio de cultura dentro dos frascos foram esterilizadas em autoclave. Para cada frasco inoculado, as pinças passaram por flambagem com álcool 95% e as foram utilizadas frias para evitar injúrias ao tecido vegetal.

Para cada tratamento foram semeados cinco frascos (subamostras) por repetição com três sementes cada. Os frascos foram então identificados de acordo com os tratamentos, vedados com plástico filme para evitar possíveis contaminações, e levados para uma sala de crescimento, onde foram dispostos aleatoriamente em uma prateleira de metal. A temperatura média desta sala foi de  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas, sendo a intensidade luminosa de  $25 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

As avaliações iniciaram no terceiro dia após a inoculação, seguindo assim diariamente durante 30 dias e consistiu na observação e contagem individual das sementes contaminadas por bactérias e/ou fungos (%) e a germinação (%). Foram consideradas germinadas às sementes que apresentaram emissão de raiz (cerca de 2 mm). Na contaminação por bactérias a porcentagem foi obtida pela expressão:  $X(\%) = N \cdot 100 / 15$ , em que N = número de sementes contaminadas. A germinação foi calculada a partir da expressão:  $G(\%) = N/A \cdot 100$ , em que: N = número de sementes germinadas; A= número total de sementes colocadas para germinar.

Os dados coletados foram submetidos à análise da variância. Para germinação (%) foram transformados em arco seno. As médias foram comparadas por regressão polinomial.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, não houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados para as variáveis analisadas. A germinação de sementes foi baixa e não houve contaminação por bactérias e/ou fungos.

A assepsia superficial visa evitar o crescimento de microrganismos, pois a disputa por nutrientes no meio de cultura pode inviabilizar a técnica levando a perda do material vegetal. A maior dificuldade nesta etapa está em obter o tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Provavelmente a ausência de contaminação pode ser explicada pela sucessão de produtos utilizados para a assepsia das sementes. O etanol é uma das principais substâncias utilizadas para desinfestação de explantes na reprodução *in vitro* (WILLADINO; CÂMARA, 2010).

Algumas substâncias com ação germicida são recomendadas para realizar a limpeza, sendo os mais comuns o etanol e compostos à base de cloro, tais como hipoclorito de cálcio e sódio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PASQUAL et al., 2010). Pressupõe-se que há uma combinação entre o cloro com a proteína da membrana dos microrganismos que formam compostos tóxicos, levando à inibição de enzimas essenciais (DONINI et al., 2005).

Por isso a importância em adaptar a dose adequada e tempo de exposição visando à manutenção da viabilidade dos tecidos. A variabilidade genética entre espécies e dentro da mesma espécie sugere o ajuste da metodologia para cada material genético, tornando o processo demorado, e em certas ocasiões, oneroso (WENDLING et al., 2006).

Além disso, o tratamento das sementes com o fungicida Vitavax-Thiram 20 SC, que tem em sua composição os ingredientes ativos carboxin e Tetramethylthiuram disulfide (THIRAM), também podem ter contribuído para a não presença de patógenos. Alguns pesquisadores já observaram eficiência no uso de carboxin+THIRAM, no controle de fungos em sementes.

O uso de fungicidas pode ser recomendado tanto para a desinfestação superficial dos tecidos, quanto, para ser adicionado ao meio de cultura (TORRES et al., 1998), quando há contaminação microbiana proveniente de infecções sistêmicas das plantas matrizes (WENDLING et al., 2006). A escolha do fungicida deve ser baseada no seu amplo espectro de ação, que seja pouco tóxico (PASQUAL et al., 2010).

Segundo Mudrovitsch (2007) o uso desses ingredientes ativos no tratamento de sementes de amendoim apresentaram resultados eficientes no controle de fungos, e ainda segundo Combuca (2011) o THIRAM apresenta efeito bactericida, o que pode ter contribuído ainda mais para a redução de patógenos de sementes de *Adenium obesum* em reprodução *in vitro*.

## CONCLUSÃO

Não houve contaminação por microrganismos em sementes de *Adenium obesum*, porém a germinação foi baixa, sugerindo que os produtos utilizados na assepsia podem ter influenciado nesse comportamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BITTENCOURT, S.R.M. Eficiência do fungicida carboxin + thiram no tratamento de sementes de amendoim. **Revista brasileira de sementes**, Londrina, v.29 n.2, 2007.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão. Documento 148. Campina Grande, PB. 2006.

COUTINHO, W.M.; PEREIRA, L.A.A. SILVA, O.F.; PENA, R.C.M.; MAGALHÃES, F.H.L. Efeito de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por semente. **Revista Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.3, p. 552- 555, 2000.

DONINI, L.P.; FERREIRA-MOURA, I.; GUISSO, A.P.; SOUZA, J.A.; VIÉGAS, J. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517-522, 2005.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington, v.1, p.1-555, 1993.

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.183-260.

JUNQUEIRA, A. H. E PEETZ, M. S. Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007: recorde e novos desafios para o Brasil - Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil no período de janeiro a dezembro de 2007. São Paulo, 2008. Disponível em: [http://www.hortica.com.br/artigos/Balanc\\_Floricultura\\_2007.pdf](http://www.hortica.com.br/artigos/Balanc_Floricultura_2007.pdf) Acesso em 15 nov.2016.

KANCHANAPOOM, K.; SUNHEEM, S. *In vitro* propagation of *Adenium obesum* (Forsk.) Roem. and Schult. **Notulae Botanicae Horticulturae Agrobotanici**, Cluj-Napoca, v.38, n.3, p.209-213, 2010.

MCLAUGHLIN, J.; GAROFALO, J. **The Desert Rose (*Adenium obesum*)**. Miami-Dade: Miami-Dade County/University of Florida cooperative extension service, 2002. 66p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-97, 1962.

PASQUAL, M.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, A.G.; PEREIRA, A.R. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (editor técnico). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, p.61-161.

ROMAHN, V. **Enciclopédia ilustrada das plantas e flores: suculentas, samambaias e aquáticas**. São Paulo: Editora Europa, 2012.

SILVA JUNIOR, R. C. **Desenvolvimento de um método de análise por injeção em fluxo (fia) para determinação de dissulfeto de tetrametiluram (tiram) utilizando reagente imobilizado em reator de fase sólida (rfs)**. São José do Rio Preto, Unesp, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: 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.11-20.



ISSN 1980-7341

WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas.** Colombo: Embrapa Florestas. 2006. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).

WILLADINO, L; CAMARA, T. Cultivo *in vitro* de vegetais. Cultura de Tecidos Vegetais. UFRP set de 2007. Disponível em <HTTP: [www.dq.ufepe.br/culttec.htm](http://www.dq.ufepe.br/culttec.htm). Acesso em: 06 dez.2016.