



Assepsia de Sementes e Segmentos Nodais de *Jatropha Gossypiifolia* L. para a Iniciação do Cultivo *in Vitro* desta Espécie Medicinal Amazônica

VIEIRA, Carlos dos Reis ^[1], MALOSSO, Milena Gaion ^[2]

VIEIRA, Carlos dos Reis; MALOSSO, Milena Gaion. **Assepsia de Sementes e Segmentos Nodais de *Jatropha Gossypiifolia* L. para a Iniciação do Cultivo *in Vitro* desta Espécie Medicinal Amazônica.** Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 03, Ed. 07, Vol. 07, pp. 20-30, Julho de 2018. ISSN:2448-0959

Resumo

A *Jatropha gossypiifolia* L. é uma espécie da família Euphorbiaceae cuja ocorrência estende-se da região Norte à Nordeste do Brasil. É uma espécie bastante utilizada na medicina popular pelas suas inúmeras propriedades terapêuticas contra carcinomas e antileucêmica devido, respectivamente à jatrofona e a jatropona, comumente encontrada em suas raízes, o que a torna uma ferramenta no combate ao câncer. O pinhão-roxo já apresenta um grande potencial como fitoterápico, no entanto, não pode ainda ser utilizada pela indústria farmacêutica, uma vez que ainda não existe um protocolo para a produção de biomassa vegetal desta planta capaz de suprir a produção em larga escala de um fármaco por ela composto, e a coleta indiscriminada dos acessos no meio ambiente levaria esta espécie à extinção. Assim, o objetivo de iniciar o cultivo *in vitro* desta espécie medicinal é uma proposta eficaz para a produção de biomassa vegetal como fonte de matéria-prima para a indústria farmacêutica, além da conservação e da manutenção de sua variabilidade genética, uma vez que os acessos podem ser inseridos em bancos de germoplasma. Para isso, foram realizados os experimentos de assepsia, iniciados com a imersão das sementes e dos segmentos nodais, isoladamente, em solução de Benomil 1% (m/v) por 1 hora sob agitação constante a 100 rpm. Em seguida, os explantes foram imersos em álcool 70% durante 1 minuto e depois mergulhados, respectivamente, nas soluções de 0,1; 0,5 e 1,0% (v/v) de hipoclorito de cálcio por 30 minutos, sob a mesma agitação. Posteriormente ao processo de assepsia, os explantes foram lavados 4 vezes com água destilada estéril e então, inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS diluído pela metade. A contaminação dos explantes foi avaliada durante 30 dias, sendo que os dados foram coletados a cada 3 dias. A assepsia mais eficiente para a desinfestação de sementes desta espécie foi a de 1,0 mg/L de hipoclorito de sódio, que proporcionou 100% de plantas germinadas e apenas 10% e

contaminação fúngica e 26,67% de contaminação fúngica. Já para os testes realizados com segmentos nodais, fica também indicado o tratamento de 1,0 mg/L de hipoclorito de sódio com a adição de 5,0 mg/L de ácido ascórbico no meio de cultura visando evitar a produção de compostos fenólicos, que induziu 100% de explantes vivos e apenas 3,33% de contaminação bacteriana e 30% de contaminação fúngica. Com isso, deu-se o primeiro passo para a iniciação de uma cultura *in vitro* do pinhão-roxo de modo que se possa, posteriormente, realizar a rápida multiplicação *in vitro* desta espécie medicinal brasileira, evitando a sua erosão genética e possível extinção.

Palavras-chave: Desinfestação, Micropropagação, Banco de Germoplasma, Pinhão-roxo.

Introdução

No que se diz respeito às ações de conservação de plantas medicinais, a adoção de técnicas biotecnológicas é de extrema importância, visto que estas são capazes de multiplicar e conservar plantas em laboratórios, de modo que se torna desnecessário o uso de grandes áreas de solo para conservar a variabilidade genética de uma espécie vegetal (ZANONI & FERMENTE, 2011).

Dentre as estratégias utilizadas para a conservação, existem duas formas de preservação permanente: conservação *ex vitro* e *in vitro* (BENSUSAN, 2008). A primeira é realizada no habitat natural da espécie, em áreas de preservação permanente e a segunda se faz com o estabelecimento de banco de germoplasma, onde os propágulos são cultivados em meio de cultura estéril em laboratórios (AHUJA & JAIN, 2017).

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é uma técnica de grande importância prática para as áreas agrícola e florestal e também para as áreas científicas, tal como a biologia de plantas, onde aparece como umas das técnicas mais amplamente utilizadas (FLÔRES et al., 2011). E, por isso, Pinhal et al. (2011) afirmam que várias técnicas de cultura de tecidos podem ser utilizadas para diversos objetivos, tais como a técnica de micropropagação para a multiplicação de material genético em larga escala e em curto período de tempo, a de banco de germoplasma para a conservação, troca e avaliação de germoplasma, entre outras.

A micropropagação é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro transparente, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂ (SILVA et al., 2014), e esta técnica de cultura de tecido vegetal é amplamente utilizada na conservação de espécies vegetais. No entanto, o estabelecimento da cultura *in vitro* depende da eficiência do processo de assepsia, pois é nesse processo que eliminará todos os patógenos (bactérias, fungos filamentosos, leveduras etc.) que possam vir a comprometer a qualidade sanitária das plantas assim produzidas (PALÚ et al., 2011; PEREIRA et al., 2015) e da adaptação dos explantes ao meio de cultura, por isso, os meios de cultura são elaborados a partir das exigências das plantas inteiras, quanto aos nutrientes minerais (MARTENDAL et al., 2013). Entretanto, algumas modificações podem ser realizadas para atender as necessidades específicas da condição de cultivo *in vitro* (SASSAMORI, 2016).

A conservação de acessos geneticamente distintos em banco de germoplasma é muito importante, uma vez que são unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro, onde ocorrem a introdução e o descarte de acesso quando necessários (VETTORAZZI, 2017). Portanto, o desenvolvimento de protocolos de assepsia de sementes e de segmentos nodais, torna-se uma ferramenta importante para iniciação de desenvolvimento de protocolos de micropropagação e de estabelecimento de banco de germoplasma para serem inseridas em programas de conservação, principalmente quando a

espécie em estudo, apesar de não domesticada, já apresenta uso potencial como fitoterápico, sendo assim, estratégias importantes para minimizar o processo de erosão genética das espécies.

A conservação de plantas medicinais da Amazônia em banco de germoplasma é uma estratégia importante para garantir a sobrevivência das espécies endêmicas, bem como conservar a sua variabilidade genética, além de possibilitar a reintrodução dessas espécies em seu habitat natural (SOUZA, 2011).

A *J. gossypifolia* é uma espécie que está exposta à erosão genética provocada pela coleta indiscriminada e pelos freqüentes desmatamentos provocados pelo homem nas áreas de ocorrência natural, além de ser uma espécie bastante coletada, já que é utilizada na medicina popular pelas suas inúmeras propriedades de interesse farmacológico.

Esta espécie apresenta um grande potencial como fitoterápico, uma vez que apresenta em suas raízes a jatrofona e a jatropona, que apresentam atividade contra carcinomas e antileucêmica (MARIZ et al, 2010), respectivamente, o que a torna uma ferramenta no combate ao câncer mas ainda não pode ser incluída em programas de produção em larga escala de fitomedicamentos, uma vez que ainda não há estudos fitotécnicos que permitam a rápida multiplicação desta espécie e, conseqüentemente, a produção de biomassa vegetal suficiente para uso como fonte sustentável de princípios ativos empregados pela indústria farmacêutica.

Considerando a gravidade desse problema, no momento em que toda a humanidade está preocupada em conservar a biodiversidade do planeta, avaliar diferentes protocolos de assepsia de sementes e de segmentos nodais provenientes de genótipos da Amazônia de *Jatropha gossypifolia* L., visando a proposta de estudar técnicas de propagação a partir de métodos biotecnológicos, objetivando dar início protocolos de multiplicação e de conservação de em banco de germoplasma *in vitro* de indivíduos representativos da diversidade desta espécie, é uma atitude concreta de preservação para a utilização dessa espécie medicinal da Amazônia brasileira.

Metodologia

Local de Realização dos Experimentos

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Coari - AM.

Material vegetal

Foram coletados frutos e ramos de galhos de *J. gossypifolia* em residências situadas na Rua Praça Ribeiro Junior do bairro Espírito Santo e na Rua Capitão Silva do Bairro Tauá-Mirim, no Município de Coari – AM.



Figura 1: Coletas em vários lugares do Município de Coari – AM. Fonte: Souza, M. P. F., 2013.

Seleção dos explantes

Após a coleta de *Jatropha gossypifolia* L., 90 sementes foram retiradas dos frutos e os galhos tiveram seus segmentos nodais cortados em regiões específicas da posição 1 (apical), 2 (segmento nodal localizado logo abaixo da posição 1) e posição 2 (segmento nodal localizado logo abaixo da posição 2) obtendo-se 180 explantes destes tipo, para serem utilizados no experimento.

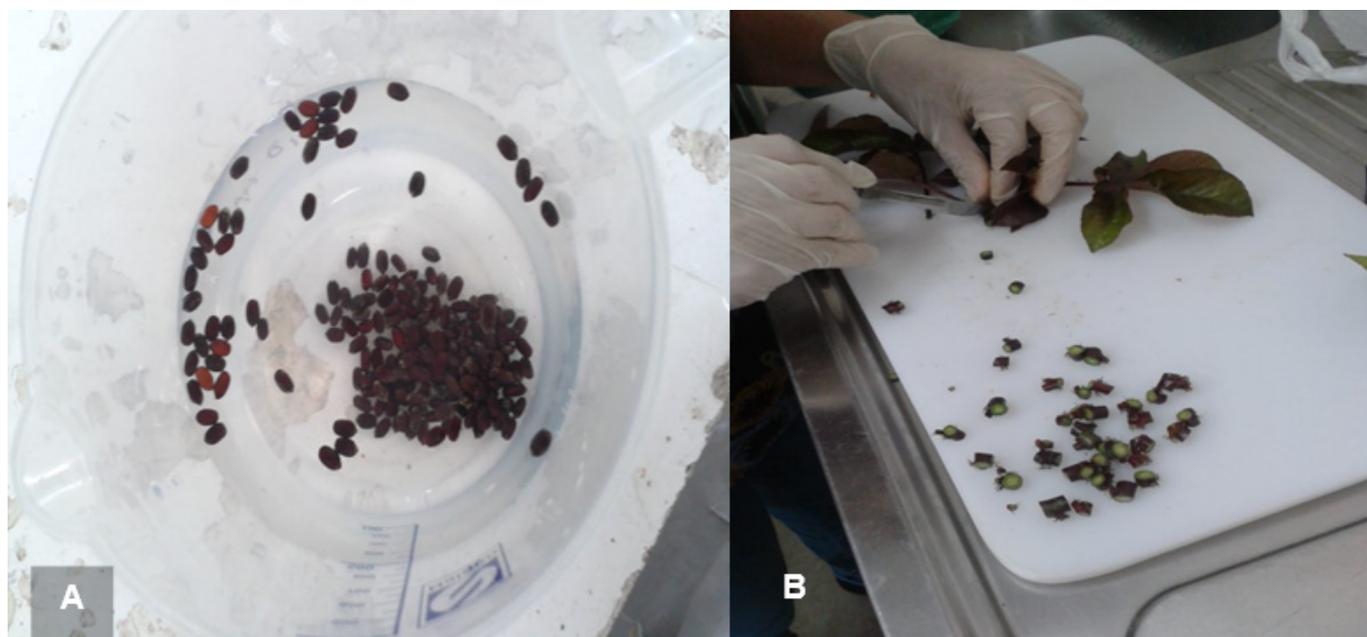


Figura 2: A- Sementes de pinhão-roxo; B- Obtenção de segmentos nodais de pinhão-roxo. Fonte: Souza, M. P. F., 2013.

Técnicas laboratoriais

Composição do meio de cultura

O preparo do meio procedeu da seguinte maneira: para cada litro solução estoque do meio de cultura MS comprado da Sigma Aldrich[®], diluído pela metade, foram adicionados 30,0 g de sacarose e o pH foi aferido para 6,0. Em seguida, foram adicionadas 8,0 g/L de ágar, e então distribuído em 180 tubos de ensaio com aproximadamente 5,0 mL de meio de cultura. Na sequência, foram autoclavados por 20 minutos a 20° C e 1 ATM visando a esterilização do material.

Procedimento de assepsia

O procedimento de assepsia foi iniciado com separação dos explantes da planta matriz. Foram utilizados 3 Erlenmeyers de 500 mL contendo 30 explantes cada, que foram imersos em 100 mL de solução de Benomil 1% (m/v) por 1 hora sob agitação constante a 100 rpm. Em seguida, os explantes foram imersos em álcool 70% durante 1 minuto e depois mergulhados em solução de 0,1; 0,5 e 1,0% (m/v) de hipoclorito de cálcio, respectivamente, por 30 minutos, também sob a mesma agitação. Posteriormente ao processo de assepsia, tanto as sementes como os segmentos nodais foram lavados 4 vezes com água destilada estéril e então, inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS diluído pela metade.

O experimento acima descrito foi repetido para os explantes do tipo segmento nodal, no entanto estes foram agora inoculados em meio de cultura MS/2 acrescido de 5,0 mg/L de ácido ascórbico.

As sementes e segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento e 30 dias após a inoculação, quando então foram avaliadas quanto à presença e/ou ausência de microrganismos. A taxa de germinação foi avaliada com 90 dias.

Os resultados destes experimentos foram expressos em porcentagem simples.

Resultado e discussão

Para se estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* de uma espécie, a fase de assepsia que antecede os experimentos de multiplicação é de fundamental importância, pois é nessa fase que se elimina todo e qualquer tipo de patógeno que possa vir a comprometer a qualidade fitossanitária das plântulas produzidas *in vitro* (BRONDANI *et al.*, 2009).

Tabela 1: Assepsia de sementes de *Jatropha gossypifolia* L.

CONCENTRAÇÃO DE
HIPOCLORITO DE
CÁLCIO (%)