

Germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de *Ruta graveolens* L. sob influência de fenantreno e benzo[a]pireno¹

In vitro germination and post-seminal development of *Ruta graveolens* L. under the influence of phenanthrene and benzo[a]pyrene

Siomara Dias da Costa Lemos^{2*}, Thiago José Jesus Rebello², Juliana Lyra Queiroz Pinto³, Marcia Marques² e Norma Albarello²

RESUMO - A exposição a contaminantes orgânicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos tem atraído considerável atenção devido aos efeitos dessas substâncias sobre a saúde humana, o ambiente e o desenvolvimento vegetal. O presente estudo objetivou avaliar a influência do fenantreno e do benzo[a]pireno sobre a germinação e o desenvolvimento pós-seminal *in vitro* de *R. graveolens*. Sementes comerciais descontaminadas foram inoculadas em tubos de ensaio com meio MS suplementado com 0 (controle); 1,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de fenantreno e 0 (controle); 0,001; 0,01 e 0,1 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno. Foram avaliados a porcentagem de sementes germinadas, o índice de velocidade de germinação e a entropia. Após dois meses, avaliou-se o comprimento da parte aérea e radicular e contabilizou-se o número de folhas desenvolvidas. Durante o primeiro mês, a presença do fenantreno não alterou o processo germinativo, enquanto que o benzo[a]pireno na concentração de 0,01 mg L⁻¹ proporcionou aumento significativo da germinação ($p \leq 0,05$). Durante o segundo mês, as concentrações de 5,0 mg L⁻¹ de fenantreno e de 0,001 mg L⁻¹ benzo[a]pireno resultaram em desenvolvimento radicular significativamente superior. Não foram detectadas diferenças significativas quanto à fitomassa, ao desenvolvimento da parte aérea e número de folhas por plântulas. Tais resultados sugerem potencial para o cultivo de *R. graveolens* em áreas contaminadas, nos níveis investigados.

Palavras-chave: Arruda. Bioindicador. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

ABSTRACT - Exposure to organic contaminants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons, has attracted considerable attention due to the effects of these substances on human health, the environment and plant development. This study aimed to evaluate the influence of phenanthrene and benzo[a]pyrene on the germination and post-seminal *in vitro* development of *R. graveolens*. Decontaminated commercial seeds were inoculated in test tubes with an MS medium supplemented with 0 (control), 1.0, 5.0 and 10.0 mg L⁻¹ phenanthrene and 0 (control), 0.001, 0.01 and 0.1 mg L⁻¹ benzo[a]pyrene. The percentage of germinated seeds, germination speed index and entropy were evaluated. After two months, shoot and root length were all evaluated, and the number of developed leaves was counted. During the first month, the presence of phenanthrene did not alter the germination process, whereas benzo[a]pyrene at a concentration of 0.01 mg L⁻¹ gave a significant increase in germination ($p \leq 0.05$). During the second month, the concentrations of 5.0 mg L⁻¹ phenanthrene and 0.001 mg L⁻¹ benzo[a]pyrene resulted in significantly greater root development. No significant differences were found in biomass, shoot development or number of leaves per seedling. Such results suggest the potential for growing *R. graveolens* in contaminated areas at the levels studied.

Key words: Rue. Bioindicator. Polycyclic aromatic hydrocarbons.

*Autor para correspondência

DOI: 10.5935/1806-6690.20160088

¹Recebido para publicação em 31/08/2015; aprovado em 15/03/2016

Parte da Tese de Doutorado em Ciências Ambientais da primeira autora apresentada à Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ

²Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ, Rua São Francisco Xavier, 524, Bairro Maracanã, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 20.550-900, lemos.sdc@uerj.br, thiagojrebello@hotmail.com, marciam@uerj.br, albarellon@gmail.com

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro/IFRJ, Rua Pereira de Almeida, 88, Praça da Bandeira, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 20.260-100, julianalyra.queiroz@gmail.com

INTRODUÇÃO

A resposta vegetal a diferentes contaminantes orgânicos, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, tem atraído considerável atenção devido a exposição a estas substâncias estarem relacionadas a efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (AHAMMED *et al.*, 2012; ALKIO *et al.*, 2005; MEIRE *et al.*, 2007). Estas substâncias são produzidas pela combustão incompleta de combustíveis fósseis ou em decorrência de acidentes envolvendo petróleo e derivados. Dentre os vários hidrocarbonetos policíclicos aromáticos descritos na literatura, o fenantreno é considerado “composto modelo” para estudos de degradação ambiental por não ser mutagênico ou carcinogênico, sendo encontrado em altas concentrações em amostras ambientais contaminadas por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. As suas características químicas são semelhantes a outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que são carcinogênicos (GARCÍA; DORANTES, 2008), como o benzo[a]pireno, lipossolúvel e rapidamente absorvido pelo organismo, o qual foi descrito como passível de metabolização em culturas *in vitro* de diferentes espécies vegetais (LUTTRELL; THOMAS, 2007).

Sabe-se que a resposta fitotóxica a um xenobiótico é, em linhas gerais, caracterizada como uma resposta de estresse que envolve processos de reconhecimento de sinais moleculares para proteção, reparo e tolerância (AHAMMED *et al.*, 2012; ALKIO *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2012). Sendo assim, as pesquisas geobotânicas e a triagem de espécimes vegetais expostas aos xenobióticos são necessárias à identificação de espécies potenciais (AHAMMED *et al.*, 2012; DIÉZ LÁZARO *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2010); (AHAMMED *et al.* 2012). Ensaios sob condições controladas, como ocorre sob condições *in vitro*, demonstram que as respostas vegetais podem ser exclusivas da espécie em estudo, anulando os efeitos das variações sazonais e favorecendo a produtividade de plantas e substâncias de interesse (REYNOSO-CUEVAS *et al.*, 2008; SINGH; CHATURVEDI, 2012). Além de visar respostas morfogênicas específicas, os sistemas *in vitro* também são indicados nos estudos relacionados à avaliação da capacidade de as células vegetais tolerar, detoxificar e armazenar/imobilizar substâncias orgânicas contaminantes, sendo possível estudar os fitormônios ativos sob tais condições, viabilizando a realização de testes de toxicidade com contaminantes orgânicos, em concentrações controladas (DEBIANE *et al.*, 2008). Dentre os estudos de desenvolvimento vegetal *in vitro*, a germinação tem se mostrado uma estratégia importante visto que a própria composição do meio pode influenciar no início do processo e no estabelecimento *in vitro* de plantas (LENCINA *et al.*, 2014), alterando parâmetros

morfológicos e fisiológicos (VICTÓRIO; LAGE, 2009). Os estudos de germinação e desenvolvimento pós-seminal *in vitro* têm se mostrado de relevância também para o conhecimento de exigências fisiológicas das espécies, sobretudo as de interesse medicinal, viabilizando o fornecimento de material juvenil em condições assépticas para estudos biotecnológicos (CASTRO *et al.*, 2014).

Ruta graveolens L., conhecida por arruda, é uma planta mencionada em farmacopeias de 28 países, cujo uso medicinal deve-se à presença de metabólitos secundários, com destaque para flavonoides (quercitina e rutina), cumarinas (psoraleno e bergapteno), ácidos orgânicos (ácido anísico e caprílico), terpenoides (limoneno e pineno), lactonas e várias classes de alcaloides (BENZARTI *et al.*, 2008; FAISAL *et al.*, 2005; KUZOVKINA *et al.*, 2009). A presença dessas substâncias confere a essa espécie propriedades estimulante, diurética, anti-inflamatória e antitumoral, além de ter seu uso investigado no tratamento de dermatoses, como psoríase e vitiligo (DIWAN *et al.*, 2012; MASSOT *et al.*, 2000; OLIVA *et al.*, 2002).

Tendo em vista a carência de estudos sobre o efeito dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em espécies vegetais sob condição *in vitro* (KUMMEROVÁ *et al.*, 2010), este trabalho objetivou avaliar a germinação e o desenvolvimento pós-seminal sob condições *in vitro* de *R. graveolens* em meio de cultura contaminado artificialmente com fenantreno e benzo[a]pireno.

MATERIAL E MÉTODOS

A germinação *in vitro* foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), *Campus* Maracanã da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), de junho de 2013 a fevereiro de 2014.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 8 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,8. Após esterilização por autoclavagem à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm por 15 min, o meio de cultura foi suplementado com fenantreno ou benzo[a]pireno, ambos com 98% de pureza (Sigma Aldrich® Brasil) e dissolvidos em diclorometano (Tedia grau HPLC) (REYNOSO-CUEVAS *et al.*, 2008). As concentrações de fenantreno utilizadas foram: 1,0 mg L⁻¹ (FEN1); 5,0 mg L⁻¹ (FEN2); 10,0 mg L⁻¹ (FEN3). E para benzo[a]pireno foram: 0,001 mg L⁻¹ (B[a]P1); 0,01 mg L⁻¹ (B[a]P2); 0,1 mg L⁻¹ (B[a]P3). Para cada substância (fenantreno ou benzo[a]pireno), foram realizados dois controles: (i) meio MS sem nenhuma

suplementação (MS0) e (ii) meio MS contendo apenas diclorometano (MSDCM). A adição do contaminante em tubos de ensaio (15 cm x 2,5 cm) com 10 mL de meio de cultura foi realizada em capela de fluxo laminar. Os tubos vedados com folha dupla de papel alumínio e selados com filme plástico foram mantidos em sala climatizada a 26 ± 2 °C, com 16 h de fotoperíodo por três dias para garantir a ausência de contaminação microbiana.

Sementes adquiridas comercialmente (ISLA®) foram lavadas em água corrente (5 min), imersas em solução de água/detergente comercial (10%), sob agitação (10 min), cujo processo de descontaminação em condições estéreis seguiu o protocolo de Figueiredo *et al.* (2001). Após secas em papel de filtro estéril, as sementes descontaminadas foram inoculadas em tubos de ensaio e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente.

O processo germinativo foi avaliado semanalmente, durante quatro semanas, em dias alternados, sendo registrado o número de sementes germinadas em cada tratamento. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão da radícula e avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de sementes germinadas, índice de velocidade de germinação e a entropia (índice de sincronização). O índice de velocidade de germinação foi calculado através da fórmula (Equação 1):

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n} \quad (1)$$

onde: G_1 , G_2 e G_n correspondem ao número de sementes germinadas nos dias 1, 2 e n, respectivamente, e o N_1 , N_2 e N_n correspondem ao número de dias após a semeadura (MAGUIRE, 1962).

A entropia do processo germinativo foi calculada segundo as fórmulas (2) e (3).

$$Entropia = \sum_{i=1}^K f_i \cdot \log_2(f_i) \quad (2)$$

onde: f_i corresponde à frequência relativa da germinação e,

$$f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^K n_i} \quad (3)$$

sendo: n o número de sementes germinadas nos dias analisados, e K corresponde ao último dia de observação da germinação (LABOURIAU; AGUDO, 1987).

O desenvolvimento pós-seminal foi avaliado após dois meses, quando as plântulas foram retiradas do meio de cultura, onde permaneceram por este período, e pesadas em balança analítica eletrônica de precisão (Toledo Brasil modelo AR2140). Foram avaliados os comprimentos das partes aérea e radicular com

régua milimétrica e contabilizado o número de folhas desenvolvidas.

O experimento foi delineado em seis tratamentos e quatro controles, cada um com quatro repetições e 80 sementes/tratamento, sendo inteiramente casualizados. Os resultados foram processados utilizando o software Microsoft® Office Excel, interpretados estatisticamente por meio da análise de variância utilizando o programa IBM SPSS Statistics 20® e as médias comparadas pelo teste DMS (Diferença Mínima Significativa) ao nível de 95% ($p \leq 0,05$), indicado para comparar a precisão experimental de experimentos com médias semelhantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças significativas para o parâmetro porcentagem de germinação em relação à exposição das sementes ao fenantreno, porém houve aumento nas taxas de germinação no tratamento com MSDCM e B[a]P1 (Tabela 1). Da mesma forma, a presença da mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, em concentrações variando entre 500 mg kg⁻¹ e 5000 mg kg⁻¹, não promoveu a alteração da germinação de cinco espécies de gramíneas em meios de cultura contaminado (REYNOSO-CUEVAS *et al.*, 2008).

Não houve variação no parâmetro índice de velocidade de germinação nas concentrações de fenantreno e benzo[a]pireno testadas, porém houve alteração do equilíbrio da germinação (entropia) de *R. graveolens* no tratamento FEN2 (Tabela 1). Este índice é um marcador de vigor, sendo que a germinação lenta pode ser interpretada como uma resposta ao estresse ambiental e, através deste parâmetro, pode-se avaliar a sensibilidade e qualidade das sementes às condições adversas (MENESES *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2010; RIGON *et al.*, 2012). O valor reduzido da entropia reflete a organização eficiente dos fenômenos para a germinação, assim como a sincronia do sistema vegetal neste momento (LOPES; FRANKE, 2011; PEREIRA *et al.*, 2010).

A análise do desenvolvimento radicular das plântulas revelou que no início do processo (7 dias), os tratamentos com fenantreno mostraram resultados equivalentes, enquanto que o uso de benzo[a]pireno resultou num comportamento diferenciado (Tabela 2). Aos 21 dias, o tratamento FEN2 proporcionou melhor desenvolvimento radicular, diferenciando-se estatisticamente aos 28 dias, do tratamento em MS0 (Figuras 1A e 1B, respectivamente). Na exposição ao benzo[a]pireno, aos 7 dias, as sementes do tratamento MSDCM (Figura 1C) resultaram em plântulas que apresentaram o melhor desenvolvimento radicular. Ao

final de quatro semanas, não apresentaram diferença significativa em relação à exposição ao B[a]P1 (Figura 1D). O desenvolvimento radicular das plântulas de *R. graveolens* obtidas por germinação na presença dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos demonstra que a espécie tem um comportamento distinto de várias espécies citadas na literatura. Plântulas de *Brassica*

rapa e *Cucumis sativus* expostas ao fenantreno sob condições *in vitro* apresentaram inibição do desenvolvimento radicular (AHAMMED *et al.*, 2012), assim como plântulas de *Cichorium intybus* expostas a diferentes concentrações de antraceno sob condições *in vitro* apresentaram redução do tamanho radicular (DEBIANE *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e entropia de sementes de arruda (*Ruta graveolens* L.) germinadas em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno (FEN) e benzo[a]pireno (B[a]P). O *ni* representa o número de sementes germinadas em cada substrato após quatro semanas

Contaminante	Tratamento*	<i>ni</i>	Média da germinação	Germinação (%)	IVG	Entropia
Fenantreno (FEN)	MS0	73	18 ± 1,0	91,3 a	2,52 ± 0,51 a	2,10 ± 0,29 a
	MSDCM	66	17 ± 1,3	82,5 a	2,18 ± 0,46 a	1,98 ± 0,26 ab
	FEN1	73	18 ± 1,5	91,3 a	2,53 ± 0,28 a	1,72 ± 0,34 ab
	FEN2	66	17 ± 0,6	82,5 a	2,51 ± 0,17 a	1,62 ± 0,29 b
	FEN3	73	18 ± 1,7	91,3 a	2,55 ± 0,28 a	1,88 ± 0,24 ab
Benzo[a]pireno (B[a]P)	MS0	44	11 ± 1,4	55,0 b	0,90 ± 0,15 a	2,28 ± 0,34 a
	MSDCM	58	15 ± 0,6	72,5 a	1,64 ± 0,13 a	2,00 ± 0,28 a
	B[a]P1	59	15 ± 1,0	73,8 a	1,55 ± 0,15 a	1,91 ± 0,29 a
	B[a]P2	57	14 ± 0,5	71,3 ab	1,42 ± 0,12 a	2,16 ± 0,10 a
	B[a]P3	50	13 ± 3,0	62,5 ab	1,23 ± 0,39 a	2,06 ± 0,7 a

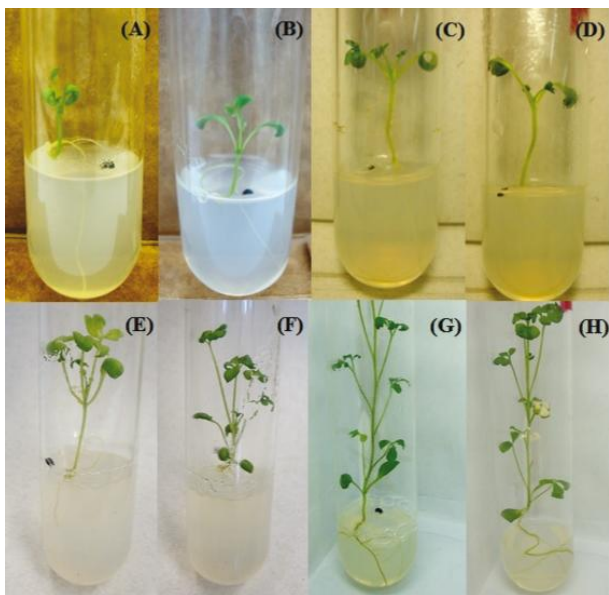
*MS0: MS sem suplementação; MSDCM: MS + 1 µL de diclorometano; FEN1: MS + 1,0 mg L⁻¹ de fenantreno; FEN2: MS + 5,0 mg L⁻¹ de fenantreno; FEN3: MS + 10,0 mg L⁻¹ de fenantreno; B[a]P1: MS + 0,001 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; B[a]P2: MS + 0,01 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; B[a]P3: MS + 0,1 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno. Letras iguais na coluna em cada contaminante não apresentam diferença significativa segundo o teste DMS (p ≤ 0,05) através da comparação das médias de cada tratamento

Tabela 2 - Desenvolvimento radicular de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.) germinadas em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno (FEN) e benzo[a]pireno (B[a]P), durante quatro semanas

Contaminante	Tratamento*	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Fenantreno (FEN)	MS0	0,9 ± 0,1 a	2,1 ± 0,5 ab	2,7 ± 0,6 b	3,6 ± 0,5 b
	MSDCM	0,6 ± 0,2 b	1,8 ± 0,3 b	3,0 ± 0,4 ab	3,9 ± 0,6 b
	FEN1	0,6 ± 0,2 ab	2,2 ± 0,2 a	3,1 ± 0,5 ab	4,0 ± 0,5 ab
	FEN2	0,8 ± 0,3 ab	2,4 ± 0,2 a	3,5 ± 0,4 a	4,8 ± 0,5 a
	FEN3	0,7 ± 0,2 ab	2,2 ± 0,1 a	2,8 ± 0,1 b	3,5 ± 0,3 b
Benzo[a]pireno (B[a]P)	MS0	0,1 ± 0,1 b	1,7 ± 0,6 b	2,9 ± 0,4 c	4,0 ± 0,5 c
	MSDCM	0,3 ± 0,1 a	2,7 ± 0,2 a	3,9 ± 0,3 a	4,7 ± 0,4 a
	B[a]P1	0,2 ± 0,1 ab	2,6 ± 0,3 ab	3,7 ± 0,4 a	4,7 ± 0,6 ab
	B[a]P2	0,1 ± 0,1 ab	2,2 ± 0,7 ab	3,6 ± 0,4 ab	4,6 ± 0,5 b
	B[a]P3	0,1 ± 0,1 ab	2,1 ± 0,2 ab	3,2 ± 0,3 bc	4,1 ± 0,6 c

*MS0: MS sem suplementação; MSDCM: MS + 1 µL de diclorometano; FEN1: MS + 1,0 mg L⁻¹ de fenantreno; FEN2: MS + 5,0 mg L⁻¹ de fenantreno; FEN3: MS + 10,0 mg L⁻¹ de fenantreno; B[a]P1: MS + 0,001 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; B[a]P2: MS + 0,01 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; B[a]P3: MS + 0,1 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno. Letras iguais na coluna em cada contaminante não apresentam diferença significativa segundo o teste DMS (p ≤ 0,05) através da comparação das médias de cada tratamento

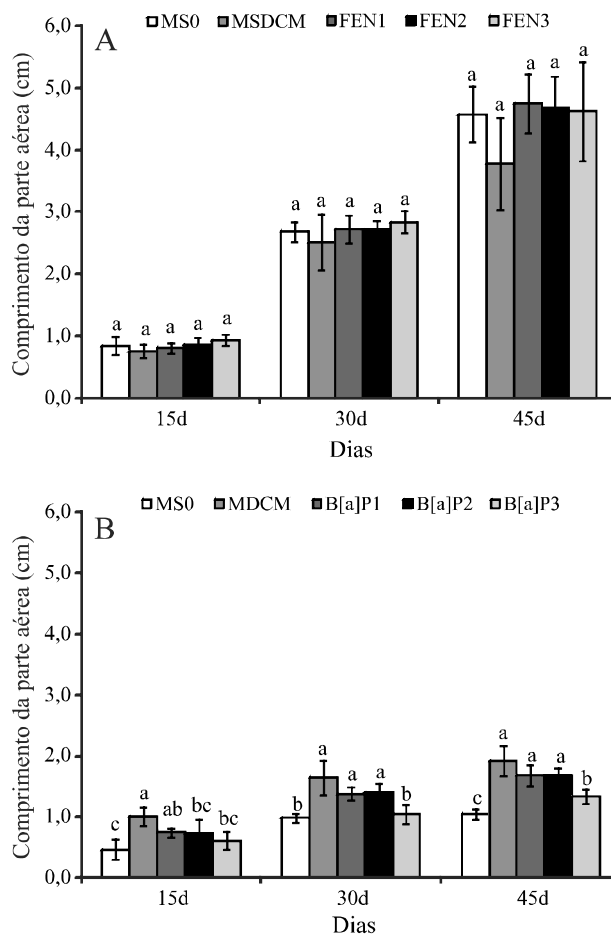
Figura 1 - Desenvolvimento radicular *in vitro* de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.) em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno e benzo[a]pireno em quatro semanas: (A) MS0 (MS sem suplementação); (B) MS + 5,0 mg L⁻¹ de fenantreno; (C) MS + 1 µL de diclorometano e; (D) MS + 0,001 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno. Desenvolvimento da parte aérea aos 45 dias em (E) MS + 0,001 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; (F) MS + 0,01 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno. Desenvolvimento radicular após dois meses em (G) MS + 1,0 mg L⁻¹ de fenantreno e (H) MS + 5,0 mg L⁻¹ de fenantreno



Aos 45 dias, as plântulas foram avaliadas em relação às respostas morfofisiológicas. Não foi observado diferença significativa ($p \leq 0,05$) nas plântulas expostas ao fenantreno em relação ao comprimento da parte aérea (Figura 2A). Resultados semelhantes foram descritos em plântulas de *P. sativum* obtidas por germinação em meio de cultura contendo fluoranteno, suplementado com o fitormônio ácido indol-acético, que não apresentaram alteração no seu desenvolvimento (KUMMEROVÁ *et al.*, 2010). Entretanto, as plântulas expostas a menores concentrações B[a]P1 e B[a]P2 (Figuras 1E e 1F, respectivamente), apresentaram indução significativa do crescimento no mesmo período (Figura 1B). Fato este descrito com plantas de *Baumea juncea*, *Baumea articulata*, *Schoenoplectus validus* e *Juncus subsecundus* que apresentaram maior desenvolvimento quando expostas a baixas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no cultivo hidropônico (ZHANG *et al.*, 2010).

Após dois meses de cultivo, as plântulas expostas ao fenantreno e ao benzo[a]pireno não apresentaram

Figura 2 - Desenvolvimento de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.) obtidas por germinação em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno (A) e benzo[a]pireno (B), aos 15, 30 e 45 dias. MS0: MS sem suplementação; MSDCM: MS + 1 µL de diclorometano; FEN: MS + 1,0 mg L⁻¹ de fenantreno; FEN2: MS + 5,0 mg L⁻¹ de fenantreno; FEN3: MS + 10,0 mg L⁻¹ de fenantreno; B[a]P1: MS + 0,001 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; B[a]P2: MS + 0,01 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; B[a]P3: MS + 0,1 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno. Barras com letras iguais não apresentam diferença significativa segundo o teste DMS ($p \leq 0,05$) através da comparação das médias de cada tratamento

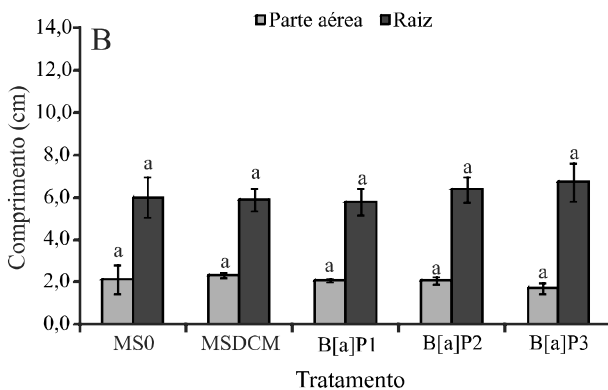
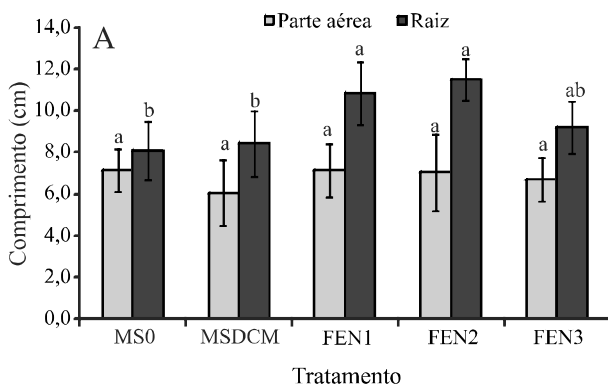


diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos em relação ao desenvolvimento da parte aérea (Figura 3A e 3B). Plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a fenantreno *in vitro* nas concentrações de 0,008 mg L⁻¹ a 0,13 mg L⁻¹ apresentaram redução do desenvolvimento aéreo, o que poderia ser atribuído à redução da atividade celular durante o seu desenvolvimento (ALKIO *et al.*, 2005).

Em relação ao desenvolvimento radicular, durante dois meses de observação, as plântulas expostas

ao FEN1 e FEN2 (Figuras 1G e 1H, respectivamente) apresentaram melhor resposta, não havendo diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos com benzo[a]pireno (Figura 3A). Trabalhos anteriores com plantas expostas a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos *in vitro*, indicam a redução no crescimento radicular, formação de brotos e fitomassa radicular (ALKIO *et al.*, 2005; DEBIANE *et al.*, 2008; KUMMEROVÁ *et al.*, 2008; KUMMEROVÁ *et al.*, 2010; REYNOSO-CUEVAS *et al.*, 2008).

Figura 3 - Desenvolvimento após dois meses das partes aérea e radicular de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.) obtidas por germinação em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno (a) e benzo[a]pireno (b). MS0: MS sem suplementação; MSDCM: MS + 1 μ L de diclorometano; FEN1: MS + 1,0 mg L⁻¹ de fenantreno; FEN2: MS + 5,0 mg L⁻¹ de fenantreno; FEN3: MS + 10,0 mg L⁻¹ de fenantreno; B[a]P1: MS + 0,001 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; B[a]P2: MS + 0,01 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno; B[a]P3: MS + 0,1 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno. Barras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas não são significativamente diferentes, segundo o teste DMS ($p \leq 0,05$) através da comparação das médias de cada tratamento



Em relação à massa fresca e ao número de folhas formadas por plântulas ao final do processo de análise, isto é, aos dois meses de exposição ao fenantreno e ao benzo[a]pireno, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos (dados não mostrados), sendo que estas plântulas já apresentavam as características morfológicas que permitem o seu estabelecimento *ex vitro*.

CONCLUSÕES

1. As sementes de *R. graveolens* germinam *in vitro* gerando plântulas normais nas concentrações máximas testadas de 10 mg L⁻¹ de fenantreno e de até 0,1 mg L⁻¹ de benzo[a]pireno;
2. O uso de contaminantes favorece o desenvolvimento pós-seminal *in vitro*, viabilizando a transferência das plantas de *R. graveolens* para condição *ex vitro* e posterior aclimatização;
3. Os resultados revelam o potencial de produção de fitomassa de *R. graveolens* em áreas contaminadas com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e de cultivo da espécie nestes ambientes.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AHAMMED, G. J. *et al.* The growth, photosynthesis and antioxidant defense responses of five vegetable crops to phenanthrene stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 132-139, 2012.
- ALKIO, M. *et al.* Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2983-2994, 2005.
- BENZARTI, S. *et al.* Plant response to heavy metal toxicity: comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype ganges) and nonaccumulator plants: lettuce, radish, and alfafa. **Environmental Toxicology**, v. 23, n. 5, p. 607-616, 2008.
- CASTRO, T. C. *et al.* Morphological aspects of fruits, seeds, seedlings and *in vivo* and *in vitro* germination of species of the

- genus Cleome. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 3, p. 326-335, 2014.
- DEBIANE, D. *et al.* In vitro evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 120-127, 2008.
- DIEZ LAZARO, J. *et al.* A phytochemical study of the Trás-os-Montes region (NE Portugal): possible species for plant-based soil remediation technologies. **The Science of the Total Environment**, v. 354, n. 2/3, p. 265-277, 2006.
- DIWAN, R. *et al.* Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. in vitro culture lines. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- FAISAL, M. *et al.* In vitro regeneration and mass propagation of *Ruta graveolens* L. - a multipurpose shrub. **HortScience**, v. 40, n. 5, p. 1478-1480, 2005.
- FIGUEIREDO, S. F. L. *et al.* Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ.) Baill. **In Vitro Cell Developmental Biology**, v. 37, n. 4, p. 471-475, 2001.
- GAO, Y. *et al.* Ascorbic acid enhances the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in roots of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). **PLoS one**, v. 7, n. 11, p. e50467, 2012.
- GARCÍA, M. H., DORANTES, A. M. R. Evaluación del crecimiento, actividad de hemoperoxidasas y remoción de fenantreno de los cultivos celulares de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*. **Polibotánica**, n. 25, p. 101-119, 2008.
- KUMMEROVÁ, M. *et al.* The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity. **Chemosphere**, v. 71, n. 11, p. 2050-2059, 2008.
- KUMMEROVÁ, M. *et al.* Understanding the effect of organic pollutant fluoranthene on pea in vitro using cytokinins, ethylene, ethane and carbon dioxide as indicators. **Plant Growth Regulation**, v. 61, n. 2, p. 161-174, 2010.
- KUZOVKINA, I. N. *et al.* Composition of essential oil in genetically transformed roots of *Ruta graveolens*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 56, n. 6, p. 846-851, 2009.
- LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of germination in *Salvia hispanica* L. temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, n. 1, p. 37-56, 1987.
- LENCINA, K. H. *et al.* Estabelecimento e crescimento in vitro de plantas de grábia. **Ciência Rural**, v. 44, n. 6, p. 1025-1030, 2014.
- LOPES, R. R., FRANKE, L. B. Aspectos térmicos-biológicos da germinação de sementes de cornichão anual sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 10, p. 2091-2096, 2011.
- LUTTRELL, W., THOMAS, C. Toxic tips: benzo(a)pyrene. **Journal of Chemical Health and Safety**, v. 14, n. 6, p. 21-22, 2007.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling and vigour. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.
- MASSOT, B. *et al.* Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, n. 1, p. 11-19, 2000.
- MEIRE, R. O. *et al.* Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.
- MENESES, C. H. S. G. *et al.* Germination of cotton cultivar seeds under water stress induced by polyethyleneglycol-6000. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, p. 131-138, 2011.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVA, A. *et al.* Effects of *Ruta graveolens* leaves on soil characteristics and on seed germination and early seedling growth of four crop species. **Annals of Applied Biology**, v. 141, n. 1, p. 87-91, 2002.
- PEREIRA, G. P. *et al.* Qualidade fisiológica de sementes de uva-do-japão após envelhecimento acelerado e armazenamento. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 527-532, 2010.
- REYNOSO-CUEVAS, L. *et al.* In vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. **Bioresource technology**, v. 99, n. 14, p. 6379-6385, 2008.
- RIGON, J. P. G. *et al.* Allelopathic effects of aqueous extract of *Brassica napus* on germination of seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 3, p. 451-455, 2012.
- SINGH, M., CHATURVEDI, R. Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from in vitro cell and tissue cultures of *Spilanthes acmella* Murr. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 321-328, 2012.
- VICTÓRIO, C. P., LAGE, C. L. S. Efeitos da qualidade de luz na germinação e desenvolvimento inicial in vitro de *Phyllanthus tenellus*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 3, p. 400-405, 2009.
- ZHANG, Z. *et al.* Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) differentially influence growth of various emergent wetland species. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, n. 1/3, p. 689-695, 2010.