



GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. EM MEIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS

IN VITRO GERMINATION OF ZYGOTIC EMBRYOS OF *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. IN MEDIUM WITH DIFFERENT SALT CONCENTRATIONS

Thaís Fabijam Silva do Amaral¹; Roberta Delgado Teixeira²; Jessica Jennifer Pereira¹; Leticia Costa Geraldo²; Yuri Palacio Mello¹; Nathaly Tacki Maass Ribeiro¹; Joyce Sena dos Santos²; Rildo Gabriel Rodrigues Farias¹; Ana Caroline Tavares Barbosa¹; Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso³; Jonny Everson Scherwinski-Pereira⁴

¹ Estudante de Engenharia Florestal da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. t.fabijam@gmail.com; jessicajenniferpe@gmail.com; yuripmllo@gmail.com; nathaly.tacki@hotmail.com; gabriel.rildo@gmail.com; tavaresbarbosaa@gmail.com; ² Estudante de Agronomia da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. r.delgg@hotmail.com; leticiaavazc@gmail.com; joycemari.ss@gmail.com; ³ Pós-doutoranda da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. inaemarie@hotmail.com. Apresentadora do trabalho.; ⁴ Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. jonny.pereira@embrapa.br.

INTRODUÇÃO

Syagrus oleracea (Mart.) Becc., popularmente conhecida como gueroba, é uma palmeira nativa do Brasil Central, com múltiplos usos e, portanto, uma opção para diversificação de renda para o pequeno e médio produtor. Dentre os produtos passíveis de exploração citam-se o palmito de sabor amargo (SILVA-CARDOSO et al., 2017) e os frutos, sobretudo, as amêndoas consideradas fonte potencial de nutrientes (GOUVEIA et al., 2018) e o endocarpo com uso potencial para produção de carvão ativado (SANTOS et al., 2019).

Apesar da relevância da espécie, principalmente, no Brasil Central, há um déficit de estudos voltados principalmente à conservação de germoplasma e desenvolvimento de métodos eficientes de propagação (SILVA-CARDOSO et al., 2017). A espécie propaga-se exclusivamente por via sexuada, apesar das tentativas recentes de desenvolvimento de protocolos de propagação clonal por embriogênese somática (SILVA-CARDOSO et al., 2019). A sua germinação é considerada lenta e irregular (SILVA-CARDOSO et al., 2017), porém quando realizada *in vitro*, os índices aumentam significativamente (MELO et al., 2001; NETO et al., 2015). Nesse sentido, a otimização das condições de cultivo *in vitro*, sobretudo daquelas relacionadas ao meio de cultivo, é crucial para garantir uma eficiente propagação da espécie, bem como o melhor entendimento fisiológico do seu processo germinativo. Vale mencionar, contudo, que o cultivo *in vitro* exige investimento em equipamentos, energia elétrica, componentes do meio de cultura, dentre outros fatores, que encarecem esse sistema de propagação e/ou estudo.

Nesse sentido, objetivou-se investigar o efeito da formulação salina Y3, desenvolvida especificamente para a germinação de uma palmeira (EEUWENS, 1962), sobre a germinação *in vitro* de *Syagrus oleracea* Mart. Becc. Adicionalmente, visando reduzir custos do cultivo *in vitro*, testaram-se o meio Y3 com a concentração original de sais e com metade da concentração original.

MATERIAL E MÉTODOS



Frutos maduros de *Syagrus oleracea* Mart. Becc. (gueroba) foram coletados de plantas adultas provenientes de populações localizadas no município de Itaberaí, Goiás, Brasil, para extração dos embriões zigóticos. Após extração dos frutos, as sementes foram mantidas à temperatura de 4°C por seis semanas, antes do início do experimento.

A desinfestação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, por imersão em álcool etílico 70% (v/v), durante cinco minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 30 min. Três sucessivas lavagens foram realizadas em água destilada e autoclavada, por um minuto cada. Logo depois, em condições assépticas, as sementes foram seccionadas e os embriões isolados.

Em seguida, os embriões zigóticos foram inoculados nos seguintes meios de cultivo: Y3 (EEUWENS, 1976) com força total (com a concentração original dos sais) e Y3 meia força (metade da concentração de sais). A fonte de Fe-EDTA e vitaminas do meio Y3 foi mantida de acordo com a concentração original do meio de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Ambos os meios foram suplementados com 30 g/L de sacarose e 2,5 g/L de carvão ativado.

Os meios usados foram gelificados com 2,5 g/L de Phytigel (Sigma) e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do agente gelificante. Os meios foram autoclavados por 20 minutos à 121 °C e 1,5 atm de pressão. O experimento foi realizado em tubos de ensaio (25 x 150 mm) mantidos em sala de crescimento com condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), sob disponibilidade de luz. Avaliaram-se, após 180 dias, as seguintes variáveis (%): oxidação, alongamento do pecíolo cotiledonar, emissão de parte aérea, emissão de raiz e emissão de parte aérea e raiz (germinação completa).

Adotou-se delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento foi composto por cinco repetições com 10 embriões zigóticos cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), por meio do software estatístico R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 30 dias de cultivo, verificou-se, independentemente do meio de cultivo testado, intumescimento e/ou início de alongamento do pecíolo cotiledonar de alguns embriões. Não se observou nesse período a ocorrência de oxidação. Com 60 dias de cultivo, observaram-se o alongamento mais expressivo do pecíolo cotiledonar e o esverdeamento, sobretudo, da região distal de uma parcela dos embriões inoculados. Com 90 dias, notou-se início de emissão de meristemas.

Já após 180 dias em meio de cultivo *in vitro*, verificou-se oxidação em alguns embriões zigóticos não germinados, os quais exibiam indícios de calos, provavelmente, por injúrias ocasionadas durante a extração do interior das amêndoas. Oxidação também foi observada em haustórios e pecíolos cotiledonares de embriões germinados, independentemente do tratamento avaliado. Essa maior oxidação verificada principalmente nos haustórios está relacionada certamente com a perda de função dessa estrutura em condições *in vitro*, as quais, geralmente, atrofiam. Atrofiamento do haustório também foi mencionado

durante a germinação *in vitro* de *Butia capitata* (MAGALHÃES et al., 2013). Nesse período de avaliação, verificou-se também 19% de contaminação bacteriana e 7% de contaminação fúngica.

Aos 180 dias, avaliaram-se a taxa de oxidação, alongamento do pecíolo cotiledonar, emissão de parte aérea, emissão de sistema radicular e emissão de ambos os meristemas (germinação completa) (Figura 1), não sendo verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos testados, com valores médios de 19%, 41%, 25%, 15% e 10%, respectivamente. Apesar da ausência de diferenças entre os tratamentos testados para as variáveis supramencionadas, o meio Y3 com força completa apresentou 20% de explantes (embriões e plantas) vitrificados (Figura 1), ou seja, morfologicamente quebradiços e translúcidos, similar ao mencionado em outras espécies cultivadas *in vitro* (SAHER et al., 2005; LIU et al., 2017).

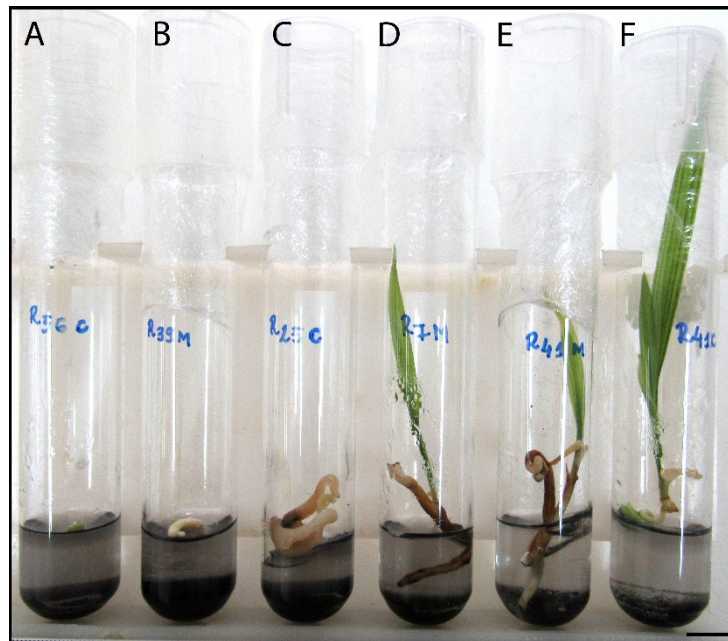


Figura 1 - Diferentes respostas morfológicas de embriões zigóticos de *Syagrus oleracea* após 180 dias em meio de cultivo visando à germinação. A: Embrião zigótico sem alongamento do pecíolo cotiledonar. B: Embrião zigótico com alongamento do pecíolo cotiledonar. C: Emissão de parte aérea com anormalidade (hiperhidricidade). D, E: Germinação completa. F: Emissão de parte aérea. Barra: 1 cm.

A vitrificação também conhecida como hiperhidricidade é uma anormalidade fisiológica típica de plantas cultivadas *in vitro*, que leva a menor lignificação, hidratação extrema, ineficiência estomática, dentre outras modificações (MUNEER et al., 2018) que inviabilizam o desenvolvimento posterior da planta. A composição do meio de cultura corresponde a um dos vários fatores responsáveis pela ocorrência desse tipo de resposta (IVANOVA; VAN STADEN, 2008; VASUDEVAN; VAN STADEN, 2011; LIU et al., 2017). De acordo com Brand (1993), o nitrato associado com outros fatores pode ser positivamente ou negativamente correlacionado com a ocorrência de hiperhidricidade. Salienta-se que a principal fonte de nitrogênio do meio Y3 é nitrato de potássio (KNO_3). Nesse sentido, a relação entre ocorrência de vitrificação e uma maior concentração de nitrato no meio de cultura não pode ser descartada.



Embora as diferentes concentrações de sais do meio Y3 testadas não diferiram entre si quanto à germinação *in vitro* de gueroba, algumas observações importantes devem ser enfatizadas. Neste experimento, o alongamento do pecíolo cotiledonar não foi um indicativo de emissão de meristemas, uma vez que, obteve-se um valor médio de 41% de alongamento, ao passo que os valores de emissão de um único meristema, parte aérea ou raiz, ou de ambos foram consideravelmente mais baixos (25%, 15% e 10%, respectivamente). Salienta-se ainda uma taxa maior de emissão do meristema apical caulinar comparativamente ao radicular.

A baixa taxa de germinação obtida nesse experimento difere do reportado por Neto *et al.* (2015), os quais relataram até 71,1% de germinação quando os embriões foram extraídos de frutos dessecados a $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Esses autores salientaram a importância da dessecação dos frutos previamente à extração dos embriões zigóticos na redução da contaminação *in vitro*, reduzindo-a 3,3%, valor considerado aceitável. Melo *et al.* (2001) também reportaram alta taxa de germinação *in vitro* de embriões de gueroba. Esses autores atribuíram esse resultado à quebra de dormência associada ao uso de antioxidantes e meio de cultura adequado. É importante mencionar que os autores supracitados utilizaram o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Como mencionado anteriormente, verificou-se nesse experimento contaminações fúngicas e bacterianas, que em conjunto com a provável inadequacidade do meio de cultura utilizado comprometeram a germinação da espécie.

CONCLUSÕES

As diferentes concentrações de sais do meio Y3 testadas não diferiram entre si quanto à germinação *in vitro* de gueroba. Nas condições de estudo, a germinação, independentemente da concentração de sais do meio Y3, foi baixa, lenta e assíncrona. O meio Y3 com força total proporcionou a ocorrência de vitrificação em uma parcela do explantes.

REFERÊNCIAS

- BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 35, p. 203-209, 1993.
- EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 36, p. 23-28, 1976.
- GOUVEIA, D.S.; LIMA, A.K.S.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.C.; DANTAS, R.L. Potencial nutricional e perfil lipídico do óleo da amêndoa do coco catolé (*Syagrus oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Pombal - Brasil, v. 12, n. 4, p.01-06, 2018.
- IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 92, p. 227-231, 2008.



- IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 104, p. 13-21, 2011.
- LIU, M.; JIANG, F.; KONG, X.; TIAN, J.; WU, Z.; WU, Z. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 217, p. 2852-96, 2017.
- MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA, D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, Germany, v. 27, p. 273-283, 2013.
- MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões de guarirubeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras - Brasil, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, 2001.
- MUNEER, S.; PARK, Y. G.; JEONG, B. R. Red and blue light emitting diodes (leds) participate in mitigation of hyperhydricity in in vitro-grown carnation genotypes (*Dianthus Caryophyllus*). **Journal of Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 37, p. 370-379, 2018.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 15, n. 3, 473-497, 1962.
- NETO, R. A.; OLIVEIRA, J. C. de; FREITAS, B. M. S. de; LIMA, L. R. de; SOUZA, J. L. F. de; SALES, J. de F. Desiccation tolerance of embryos of *Syagrus oleracea*, a cerrado native bitter palm heart. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 14, n. 11, 922- 929, 2015.
- SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 81, p. 149-158, 2005.
- SANTOS, K.J.L; SANTOS, G.E.S.; LEITE DE SÁ, I.M.G.; CARVALHO, S.H.V.; SOLETTI, J.I.; MEILI, L.; DUARTE, J.L.S.; BISPO, M.D.; DOTTO, G.L. *Syagrus oleracea*–activated carbon prepared by vacuum pyrolysis for methylene blue adsorption. **Environmental Science and Pollution Research**, Germany, v. 26, n. 16, p. 16470-16481, 2019.
- SILVA-CARDOSO, I.M.A.; MEIRA, F.S.; GOMES, A.C.M.M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, Denmark, 2019.
- SILVA-CARDOSO, I.M.A.; SOUZA, A.M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. The palm tree *Syagrus oleracea* Mart. (Becc.): A review. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, n. 225, v. 65-73, 2017.