



# GERMINAÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO *IN VITRO* DE *Gymnopogon doellii*: UMA ESPÉCIE AMEAÇADA DE EXTINÇÃO

## GERMINATION, MULTIPLICATION, AND *IN VITRO* MAINTENANCE OF *Gymnopogon doellii*: AN ENDANGERED SPECIES

Thauan Martins Lelis<sup>1</sup>; Maiky Lopes Paulo<sup>12</sup>; André Luís Xavier de Souza<sup>3</sup>; Jonny Everson Scherwinski-Pereira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília (UnB) Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Nº: s/n. Complemento: CEP: 70910-900. [thauanlelis98@gmail.com](mailto:thauanlelis98@gmail.com) Apresentador do trabalho.; <sup>2</sup>Unidade de Pesquisa e Inovação em Campos Rupestres Ferruginosos da Gerdau Fazenda do Cadete s/n, Rodovia MG 443, Km 07, Ouro Branco – MG.; <sup>3</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF Parque Estação Biológica - PqEB, s/nº, Brasília, DF. CEP 70770-901.

### INTRODUÇÃO

A gramínea *Gymnopogon doellii* Boechat & Valls, pertencente à família Poaceae, a terceira maior família de plantas com flores, com aproximadamente 18875 espécies (APG IV, 2023). Ela é uma das espécies herbáceas presente na Lista de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014). De acordo com o Livro Vermelho da Flora Ameaçada (MARTINELLI; MORAES, 2013), *Gymnopogon doellii* é classificada como uma das espécies no nível de Criticamente em Perigo, e na Lista das Espécies da Flora Ameaçada de Minas Gerais (DRUMMOND et al., 2008).

A distribuição geográfica do *Gymnopogon doellii* abrange regiões do Cerrado de Goiás, Distrito Federal e no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (MENDES et al., 2013). Mediante esses registros de ocorrência, observa-se que *G. doellii* apresenta grande disjunção de ocorrência, cerca de 700 km entre as populações do Centro-Oeste e do Quadrilátero Ferrífero. Em razão disso e por ser uma espécie ameaçada de extinção, a propagação e conservação dessa gramínea é de suma importância para manutenção da biodiversidade do Cerrado.

Com o passar dos anos, o Cerrado brasileiro apresenta uma crescente pressão para o desmatamento, devido ao avanço acelerado da agricultura e pecuária (SANO et al., 2019). Além disso, o Quadrilátero Ferrífero é alvo cada vez mais crescente de degradação de áreas, principalmente devido a aberturas de cavas para exploração de minério de ferro (MME, 2009).

Mediante ao efeito causado em espécies raras no cenário da mineração, a cultura de tecidos vegetais surge como uma alternativa para propagação e conservação de plantas (PATIL et al., 2021), inclusive para aquelas espécies de difícil estabelecimento e com riscos de extinção, como é o caso do *Gymnopogon doellii*. Neste contexto, a conservação *ex situ* pelo uso de técnicas da cultura de tecidos pode ser uma alternativa para manutenção de genótipos para futuras propostas de restauração e manutenção dos possíveis recursos que o *Gymnopogon doellii* pode oferecer (TEFERA, 2019).

### MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *Gymnopogon doellii* utilizadas são provenientes de regiões do Cerrado do Distrito Federal. Foram retiradas as cariopses das sementes para promoção do processo de esterilização



das mesmas para inoculação em meio de cultivo no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

O processo de esterilização se deu pela submersão das amostras em solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e, posteriormente, pela lavagem com água destilada autoclavada. Em seguida, as sementes foram submersas em álcool etílico 70% por mais 15 minutos e lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Após a esterilização do material, as sementes foram inoculadas em diferentes meios de cultivo. Para preparação do meio de cultura, utilizou-se o meio Murashige e Skoog (MS) suplementado com 30g/L de sacarose. Para testar a influência de fitormônios, dois meios diferentes foram testados: um controle e outro com a adição de 1ml/L de 6-Benzylaminopurine (BAP). Todos os meios foram colocados em placas de petri de plástico (15 x 90 mm), gelificados com 2,0 g/L de Phytigel, e com o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,1$ , sendo autoclavados por 20 minutos a  $121^\circ\text{C}$  e 1,5 atm de pressão. No total foram utilizadas 15 placas com 10 sementes cada para cada tratamento, totalizando 300 sementes.

Para avaliação da luminosidade sobre a germinação, 5 placas de cada tratamento foram colocadas sob regime de ausência de luz e as outras 10 placas deixadas em local com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de  $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas LED (Philips® - Green Power 20W 60Hz). As sementes/plântulas foram avaliadas semanalmente quanto à germinação e a altura das plantas, sendo transferidas para outros frascos de cultivo maiores (250 mL de capacidade), dependendo da necessidade. Após, 30 dias nos frascos maiores, foram avaliados a altura das plantas, quantidade de folhas e a ocorrência de perfilhamento.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Após sete dias, as plantas apresentaram baixo percentual de germinação, chegando a 4% no tratamento com BAP e 2% no grupo controle. As sementes que começaram o processo de germinação apresentam um intumescimento e depois a profusão da radícula e por último a emissão da parte aérea (Figura 1). Apesar de muito utilizados na cultura de tecidos, os reguladores de crescimento têm o potencial de estimular ou inibir funções fisiológicas das plantas e alterar o desenvolvimento pleno dos órgãos vegetais (PATIL et al., 2021).



**FIGURA 1** - Germinação de semente de *Gymnopogon doellii* em meio de cultivo de MS sob regime de luz após 7 dias de inoculação. (A) intumescimento da semente e início da profusão da radícula, (B) Processo de profusão da radícula e emissão da parte aérea.

Porém, os resultados começaram a ser mais expressivos após 14 dias após a inoculação no meio de cultura como pode ser observado na Tabela 1.

**TABELA 1** - Porcentagem de germinação de sementes de *Gymnopogon doellii* sob diferentes regimes de tratamento *in vitro*, após 14 dias de inoculação em meio de cultivo: Placas no Escuro Controle; Placas na luz Controle; Placas no Escuro com BAP; Placas na luz com BAP.

Tratamento	Sementes iniciais	Porcentagem de germinação
Escuro Controle	50	12,24
Luz Controle	100	84,88
Escuro com BAP	50	21,28
Luz com BAP	100	73,68

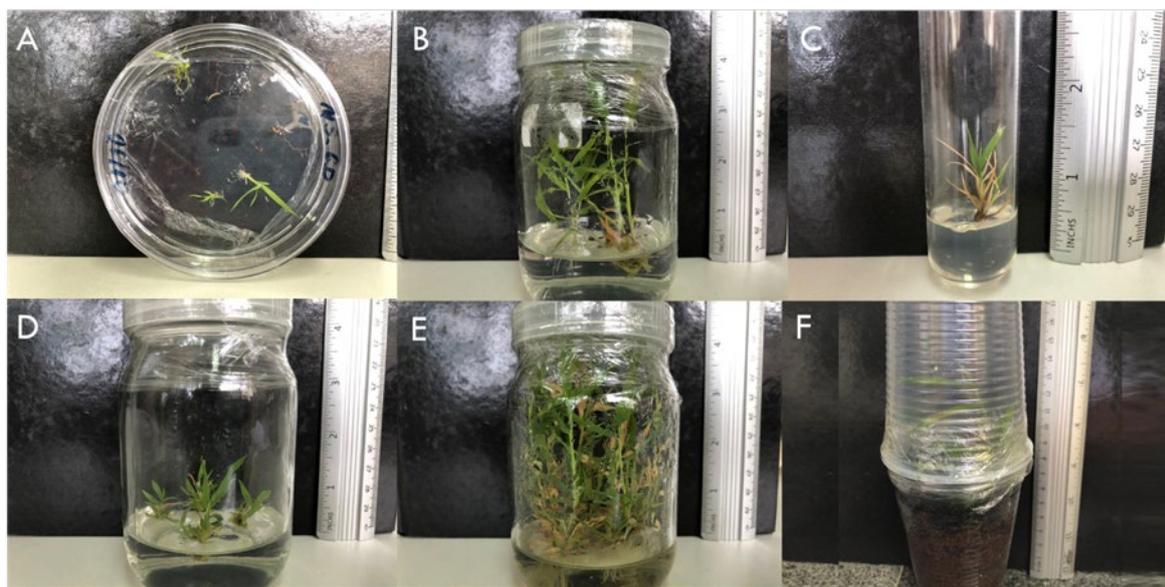
Pode-se notar que o tratamento sob regime de luz apresentou maiores taxas de germinação em relação ao grupo sob ausência luminosa, podendo-se concluir que estas sementes têm características fotoblásticas positivas, muito comum em gramíneas, principalmente as do Cerrado (ZAIDAN; CARREIRA, 2008). Além disso, as plântulas que começaram a se desenvolver no escuro apresentaram sintomas de estiolamento do caule e maior transparência da parte aérea, demonstrando fragilidade e pior desenvolvimento da plântula, comuns a resposta tríplice pelo acúmulo de etileno na ausência de luz (AZEVEDO; SANTOS, 2011). Por isso, todas as placas foram transferidas para o regime de luminosidade para maior sobrevivência dos propágulos.

Após os 30 dias de avaliação, do total de 300 sementes, 194 germinaram, 23 contaminaram e 83 não apresentaram nenhuma alteração visível.

As plantas germinadas foram colocadas em diferentes frascos de cultivo: 54 foram mantidas em placas de petri, 80 foram transferidas para tubos de ensaio (25 x 150 mm) e 60 outras foram coladas em frascos de vidro (250 mL de capacidade) para avaliação do melhor local para desenvolvimento das



plantas. Após 30 dias nos frascos, houve uma taxa de perfilhamento de 25,77% das plantas, com uma maior quantidade de perfilhos no frasco de 250 mL. Ainda foi possível observar taxa de mortalidade de 36,25%, 22,22% e 26,67% nos tubos, placas e frascos, respectivamente, demonstrando uma maior fragilidade do crescimento nos tubos de ensaio, como pode ser observado na Figura 2. Além disso, estudos demonstram que, para a família Poaceae, a utilização de gemas laterais e brotos é o método mais eficaz para propagação dessas plantas, como por exemplo o bambu (LAREKENG; GUSMIATY; NADHILLA, 2020).



**FIGURA 2** - Desenvolvimento do *Gymnopogon doellii* em diferentes frascos após 30 dias de transferência para frasco de 250 mL de capacidade. (A) desenvolvimento em placas de petri. (B) Desenvolvimento em frasco de 250 mL de capacidade. (C) desenvolvimento em tubos de ensaio. (D) evidência de perfilhamento. (E) Crescimento em frasco com perfilhamento após mais 30 dias. (F) Aclimatização em copos de plástico transparente.

Devido a taxa de mortalidade similar das placas de petri e frascos, e a falta de espaço para crescimento na placa, todas as plantas foram transferidas para os frascos de 250 mL de capacidade. Dentre os explantes presentes inicialmente nos frascos, 20 foram retirados aleatoriamente para avaliação do crescimento aéreo, quantidade de folhas e número de perfilhos. Observou-se uma média de 4,85 cm de comprimento aéreo, média de 5,15 folhas por explante e uma média de 2,85 perfilhos por planta.

Indica-se que as sementes devem ser mantidas por 1 a 2 meses em placa de petri, até que este recipiente comece a limitar o tamanho das plantas. Estes explantes devem ser transferidos para frascos de vidro maiores para aumentar a quantidade de perfilhos e melhor desenvolvimento do vegetal.



## CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos, o método de esterilização descrito é eficaz contra a contaminação. Além disso, o melhor protocolo para germinação de sementes de *G. doellii* é a utilização de meio de MS suplementado com sacarose, sem a utilização de regulares de crescimento, sob regime de luz. Quando germinada sob efeito da ausência luminosa, as sementes apresentaram a resposta de estiolamento e menor taxa de sobrevivência.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela utilização dos equipamentos e do espaço para produção da pesquisa. Agradeço também à Gerdau S.A., através da ADESIAP – Agência de Desenvolvimento Econômico e Social - dos Inconfidentes e Alto Paraopeba, pelo financiamento e bolsa referente a mão de obra técnico-científica para auxílio ao responsável pela execução do projeto – Projeto Programa de Conservação *Gymnopogon*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APG IV. **ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 14**. 2023. Disponível em <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em 14 de Junho de 2023.

AZEVEDO, I. G.; SANTOS, C. L. A.. Influência do etileno e da H<sup>+</sup>-ATPase durante o amadurecimento de frutos. **Biológicas & Saúde**, v. 1, n. 1, 2011.

BRASIL. Portaria No 443, de 17 de dezembro de 2014. **Reconhece como espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da “Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção”**. D.O.U. v.245, p.110-221. 2014.

DRUMMOND, G.M; MACHADO, A.B.M.; MARTINS, C.S.; MENDONÇA, M.P.; STEHMANN, J.R. **Listas vermelhas das espécies da fauna e da flora ameaçadas de extinção em Minas Gerais**. 2a ed. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas. 2008.

LARAKENG, S. H.; GUSMIATY, G.; NADHILLA, D. n-Vitro Shoot Induction of Pring Tutul (*Bambusa maculata*) through in Various Plant Growth Regulators (PGR). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 575, n. 1, 2020.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. (org.). **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson/Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MENDES, M. S.; MEYER, P. B.; VIANA, G. P. Caracterização fitossociológica de cinco trechos de campo rupestre sobre canga nodular na região do sinclinal moeda, município de Itabirito- Minas Gerais. **Anais do 64o Congresso Nacional de Botânica Belo Horizonte**, 2013.

MME - Ministério de Minas e Energia. **Perfil da Mineração de Ferro**. Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral-SGM, 2009.

PATIL, SHASHANK M.; KUMARI, V. B. CHANDANA; SUMANA , K.; SUJAY, S.; TEJASWINI, M.; SHIRAHATTI , PRITHVI S.; RAMU, RAMITH. Sustainable development of plant tissue culture industry: The Indian scenario. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 18-27, 2021.



SANO, E. E.; RODRIGUES, A. A.; MARTINS, E. S.; BETTIOL, G. M.; BUSTAMANTE, M. M. C.; BEZERRA, A. S.; COUTO, A. F.; VASCONCELOS, V.; SCHULER, J.; BOLFE, E. L. Cerrado ecoregions: A spatial framework to assess and prioritize Brazilian savanna environmental diversity for conservation. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 818-828, 2019.

SORENG, R. J.; PETERSON, P. M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; TEISHER, J. K.; CLARK, L. G.; ZULOAGA, F. O. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, n. 4, p. 259-290, 2017.

TEFERA, A. A. Review on Application of Plant Tissue Culture in Plant Breeding. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 9, n. 3, p. 20-25, 2019.

ZAIDAN, L. B. P.; CARREIRA, R. C. Seed germination in Cerrado species. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 20, p. 167-181, 2008.