

Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa* sob diferentes temperaturas

Alexandre Ebert¹ Adriana Zanirato Contini¹ Gilvano Ebling Brondani¹ Reginaldo Brito da Costa^{1*}

¹Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Boa Esperança, 78060-900, Cuiabá-MT, Brasil.

* Author for correspondence: reg.brito.costa@gmail.com

Received: 22 December 2013 / Accepted: 07 March 2014 / Published: 21 March 2014

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa* em diferentes temperaturas. O material botânico foi coletado na localidade denominada Vale do Rio Paciência, Parque nacional da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil. A coleta dos frutos foi realizada diretamente das árvores selecionadas, totalizando 10 indivíduos distribuídos em transecto estabelecido ao longo das margens do Rio Paciência. Os frutos acondicionados em sacos de papel foram transportados ao Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Mato Grosso (BIOTEC), sendo mensurados e despulpados para a extração das sementes e embriões zigóticos. Utilizaram-se 60 embriões dispostos em câmara de germinação, com temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40°C e fotoperíodo de 16 h. Os dados foram analisados estatisticamente aplicando-se análise de regressão polinomial. Os resultados mostraram que a germinação de embriões *in vitro* viabilizou o estabelecimento do buriti, constatado pelos altos índices de germinação. Embriões germinaram mais lentamente quando submetidos a temperaturas amenas. As melhores taxas de germinação ocorreram nas temperaturas de 30°C (75%) e 35°C (83,33%). A técnica de cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa* pode ser utilizada para a propagação de mudas da espécie buscando-se homogeneizar as taxas de germinação.

Palavras-chave: Buriti; Cultivo *in vitro*; Produção de mudas.

In vitro germination of zygotic embryos of *Mauritia flexuosa* under different temperatures

Abstract

The study aimed to evaluate the *in vitro* germination of zygotic embryos of *Mauritia flexuosa* under different temperatures. Botanic material was collected in a spot called Vale do Rio Paciência at the Chapada dos Guimarães National Park, in Mato Grosso State, Brazil. Fruits were directly collected from selected trees, totalizing 10 individuals from a transect along Paciência river banks. Fruits were packed in paper bags and transported to the Biotechnology Lab at the Agronomy School of the Federal University of Mato Grosso (BIOTEC). They were measured and cleared from pulp for seeds and embryos extraction. For the study, 60 embryos were placed in a germination chamber, with temperatures of 20, 25, 30, 35 e 40°C with 16 h. Resulting data were analyzed using polynomial regression, investigating the behavior of variables applied to the treatments tested. Results showed that *in vitro* embryo germination support establishment processes for *Mauritia flexuosa*, confirmed by the high germination indexes. Embryos of this species germinate slowly when under moderate temperatures, showing influence also on germination rates. Best germination rates were obtained with 30°C (75%) and 35°C (83.33%) temperatures. The *in vitro*

culture of zygotic embryos of *Mauritia flexuosa* can be used for species propagation by seedlings, aiming to homogenize germination rates.

Key words: Buriti; *In vitro* culture; Seedlings production.

Introdução

O Buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) é uma palmeira da família Areaceae de importância etnoecológica. A espécie é muito utilizada por populações tradicionais da Amazônia e do Cerrado pelas suas propriedades alimentícias, medicinais e ou como matéria-prima para confecção de artesanatos (Martins et al. 2012; Federman et al. 2013; Gilmore et al. 2013). Planta higrófito muito comum em nascentes, cursos d'água e áreas brejosas conhecidas como vereda de buritizais, onde normalmente apresentam uma distribuição espacial agregada formando grandes populações (Ferreira 2006; Ribeiro e Walter 2008). Apresenta papel no equilíbrio geocológico dos cerrados quanto à conservação dos recursos hídricos, oferta de alimentos para a fauna regional, manutenção de corredores ecológicos que permitem o fluxo gênico e de matéria (Castro 1979; Gomes et al. 2011).

A distribuição geográfica da espécie se estende pela América do Sul em baixas altitudes, especialmente na região Amazônica da Colômbia, Venezuela, Guianas, Trinidad e Tobago, Equador, Peru, Bolívia e Brasil, nos estados da Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Pará, Piauí e São Paulo (Henderson et al. 1995).

Apresenta um sistema reprodutivo ainda não totalmente esclarecido (Martins et al. 2012). Henderson (1995) descreve a espécie como sendo partenocárpica ou autógama, porém não estritamente dióica, pois indivíduos femininos isolados produzem sementes, as inflorescências estaminadas apresentam flores pistiladas e os estaminódios produzem pólen.

A propagação da espécie é realizada basicamente via sementes e, em condições naturais é lenta e desuniforme, o que dificulta a produção de mudas em viveiros. Os estudos sobre a fisiologia da germinação do buriti podem contribuir para o desenvolvimento de tecnologias para a sua propagação, favorecendo a conservação do banco de germoplasma da espécie (Spera et al. 2001).

Hanning (1904) foi o precursor da técnica de cultivo de embriões zigóticos *in vitro*, trabalhando com embriões maduros de dois gêneros de crucíferas. Atualmente vários estudos têm sido conduzidos com diferentes espécies florestais, gerando protocolos específicos de cultivo *in vitro* de plantas. A cultura de embriões *in vitro*, permite estudar as demandas nutricionais e físicas para o desenvolvimento do embrião, superar a dormência em certos tipos de sementes e conservar os híbridos imaturos oriundos de cruzamentos incompatíveis (Pascal et al. 1998). Trata-se de uma ferramenta essencial para a obtenção de protocolos de produção de mudas com produção de indivíduos com características superiores, livres de fitopatógenos, subsidiando programas de melhoramento genético e conservação da espécie.

Nesse sentido, a cultura de embriões apresenta-se como uma forma de produção de mudas, permitindo a obtenção de plantas sadias em um espaço de tempo reduzido, proporcionando ganhos econômicos e homogeneidade produtiva.

Considerando a falta de conhecimento sobre a germinação de *Mauritia flexuosa*, e buscando estabelecer técnicas mais eficientes para a produção de mudas, o presente estudo objetivou avaliar o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos em diferentes temperaturas.

Material e métodos

O material botânico foi coletado na localidade denominada Vale do Rio Paciência, inserida no Parque nacional da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso - Brasil (Fig. 1). Inserida na região denominada planície da baixada Cuiabana, a área está condicionada a uma dupla estacionalidade climática, com verão chuvoso entre os meses de outubro a março e inverno seco de maio a setembro, definido pelo sistema Köppen como Aw (MMA

2009). A precipitação média anual é de 1.800 a 2.000 mm (MMA 2009).

A vegetação caracteriza-se predominantemente por uma marcante fisionomia de cerrado utilizando-se técnicas de escalada (*climbing tree*), totalizando 10 indivíduos distribuídos em transecto estabelecido ao longo das margens do Rio Paciência. Os frutos foram acondicionados em sacos de papel e transportados ao Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Mato Grosso (BIOTEC), onde foram medidos e despulpados para a extração das sementes, e posteriormente extraídos embriões da câmara embrionária (Fig. 2A-C).

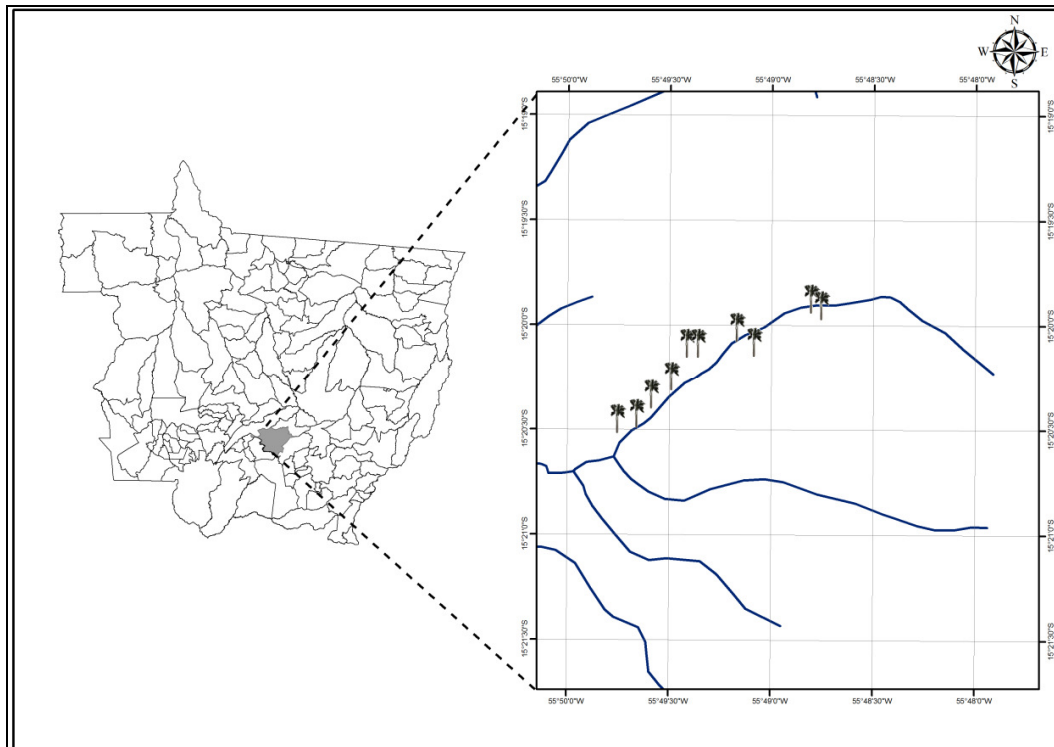


Figura 1. Mapa de localização da área de coleta dos frutos de *Mauritia flexuosa* e detalhe da distribuição das árvores selecionadas.

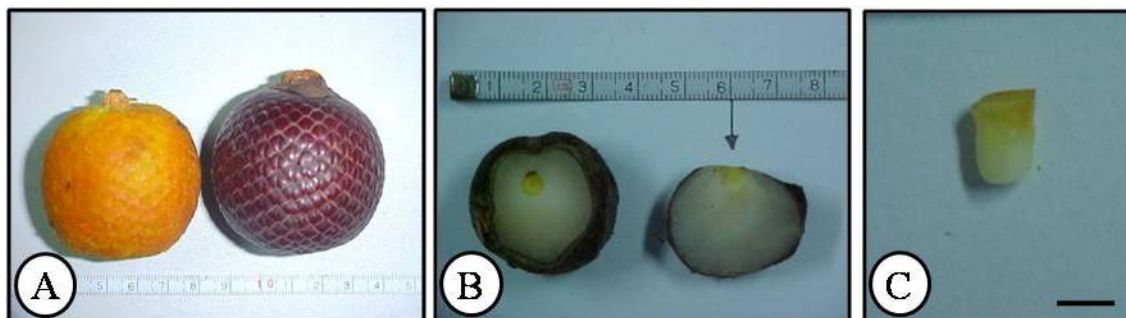


Figura 2. Detalhe dos frutos, sementes e embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa*. (A) Frutos com e sem casca. (B) Corte transversal e longitudinal da semente com detalhe da posição do embrião. (C) Detalhe do embrião zigótico, barra: 0,5 cm.

As sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio a 1,0% de cloro ativo por 30 min e mantidas em estufa na temperatura de 20°C por 48 h. Em seguida os embriões zigóticos foram extraídos com auxílio de uma tesoura de poda e bisturi, seguidos de desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo durante 15 min. Posteriormente, os embriões foram transferidos para câmara de fluxo laminar e inoculados em tubos de ensaio de 18 x 180 mm, contendo 20 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,0 g L⁻¹ de solidificante gel de Agarose em pH ajustado a 6,0. Ao todo foram inoculados 60 embriões dispostos em câmara de germinação tipo BOD, com temperaturas reguladas em 20, 25, 30, 35 e 40°C e fotoperíodo de 16 h. As unidades experimentais foram constituídas de tubo de ensaio preenchido com meio de cultura e contendo a inoculação de um embrião.

As avaliações foram realizadas diariamente, e quando concluídas calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme a fórmula proposta por Maguire (1962), em que: $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, onde: G = número de plantas germinadas; N = período de dias em que houve germinação, n = tempo considerado. Contabilizou-se a quantidade diária de plântulas provenientes da germinação dos embriões.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e 12 repetições, resultando em 60 unidades experimentais. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente aplicando análise de regressão polinomial.

Resultados e discussão

O processo de assepsia para a desinfestação dos frutos, sementes e embriões zigóticos, por meio da utilização de cloro ativo, mostrou-se eficiente e reduziu a contaminação por fungos.

O experimento foi conduzido até aos 45 d após a inoculação *in vitro*, com início dos eventos germinativos aos 6 d, resultando um total de 32 plantas ao final do

experimento, ou seja, 53,33% de taxa de germinação total em todos os tratamentos testados (Fig. 3A-C).

Logo após a inoculação, observou-se um intumescimento dos embriões na posição próxima ao opérculo, a qual determina a posição da emissão do pecíolo cotiledonar por onde emergem a raiz e a bainha (Fig. 3A). Efeito semelhante também foi observado por Spera et al. (2001) e Costa et al. (2006), e deve-se a embebição e ativação do metabolismo, resultando na ativação do processo germinativo.

As maiores taxas de germinação ocorreram nas temperaturas de 30 e 35°C iniciando a germinação no 6º d após a inoculação, resultando em 75% e 83,33% de plântulas germinadas respectivamente, após a última avaliação. Na temperatura de 25°C a germinação iniciou no 10º d, resultando em 58,33% de plântulas emergidas, seguido da temperatura de 20°C com germinação iniciada no 11º d após a inoculação e com 50% de plântulas germinadas. Na temperatura de 40°C houve mortalidade em todos os embriões inoculados, sendo observado ressecamento dos tecidos. Esses resultados sugerem efeitos deletérios para o cultivo de embriões de buriti em temperaturas iguais ou superiores a 40°C. Resultados semelhantes foram relatados por Villalobos e Herrera (1991) ao estudar a germinação de *Bactris gasipaes* sob diferentes substratos e temperaturas, com relato da morte de todas as sementes na temperatura de 40°C. Iossi et al. (2003) avaliando os efeitos de substratos e temperaturas na germinação de tamareira anã (*Phoenix ruebenii*) verificaram que na temperatura de 40°C não houve germinação das sementes.

O modelo de regressão quadrática foi o que melhor se ajustou para explicar o processo da germinação, bem como o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com a temperatura. Por meio da equação gerada foi possível determinar a estimativa da temperatura ótima para a germinação *in vitro* de embriões de buriti, derivando a equação chegou-se ao resultado na temperatura ideal, a qual correspondeu a 28,63°C (Fig. 4A).

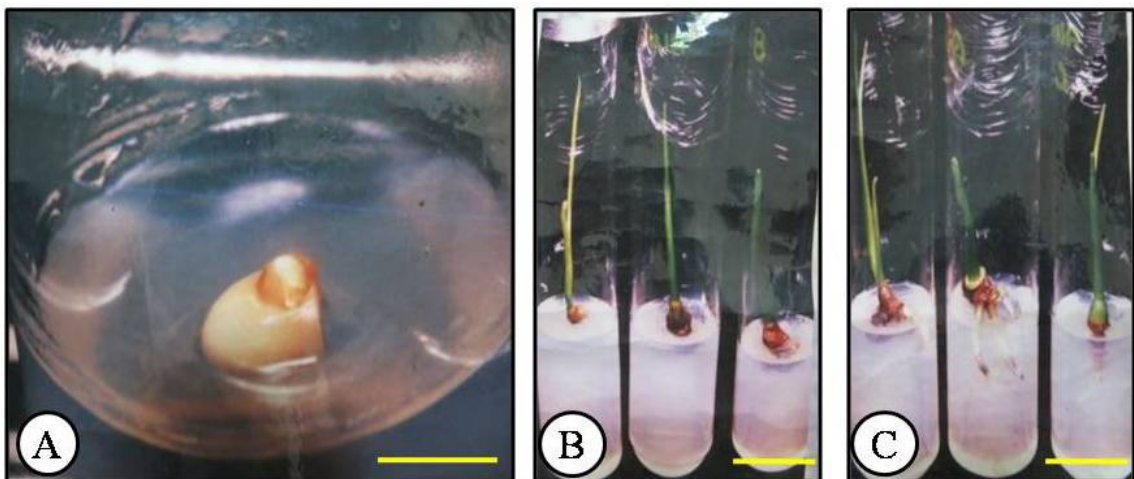


Figura 3. Detalhe da inoculação e germinação de embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa*. (A) Embrião inoculado *in vitro*, observa-se o acentuado intumescimento na região de germinação, barra: 1,0 cm. (B) Plântulas em desenvolvimento sem a indução de raízes, barra: 2,0 cm. (C) Plântulas com desenvolvimento da parte aérea e radicular, barra: 2,0 cm.

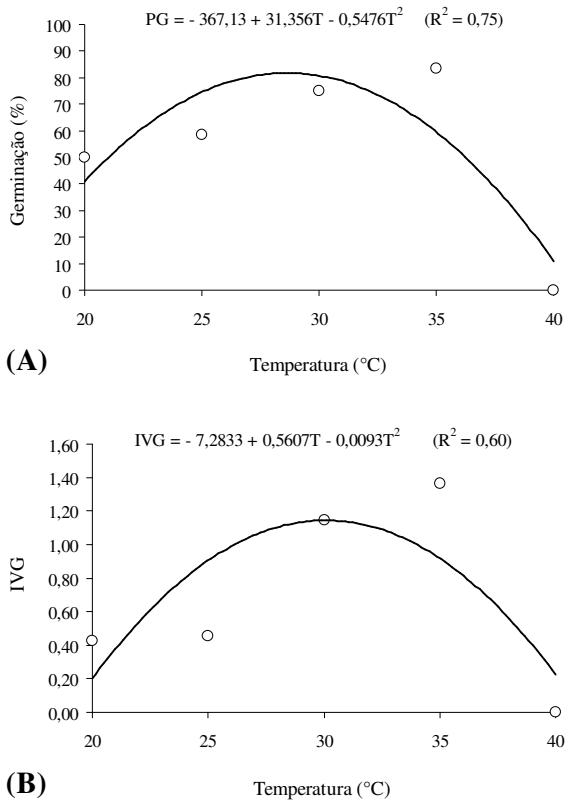


Figura 4. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa*, aos 45 d em relação às diferentes temperaturas - T. (A) Valores médios e estimados da porcentagem de germinação - PG. (B) Valores médios e estimados do índice de velocidade de germinação - IVG.

A melhor temperatura para a germinação de embriões *in vitro* foi estimada em torno de 28°C, ocorrendo um declínio no número de plantas germinadas conforme aumento da temperatura, chegando a ser nula na maior temperatura testada (40°C) (Fig. 4A). Para o índice de velocidade de germinação os melhores valores foram obtidos nos tratamentos com temperatura correspondente a 30° e 35°C (Fig. 4B). Além disso, o ajuste da regressão quadrática para o índice de velocidade de germinação resultou na temperatura de 30°C.

O meio de cultura MS acrescido de 3% de sacarose mostrou-se eficiente para a germinação *in vitro* de buriti. Demais estudos com diferentes espécies de palmeiras salientam a influência do meio de cultura e demais fatores externos, como a temperatura e luminosidade, em relação ao desenvolvimento *in vitro* de tecidos (Kumar et al. 2010; Almeida et al. 2012; Ribeiro et al. 2012; Scherwinski-Pereira et al. 2012; Fki et al. 2013; Palanyandy et al. 2013), denotando a necessidade de ajuste do meio de cultura e controle das condições ambientais para cada espécie de interesse. A germinação *in vitro* de embriões de *Mauritia flexuosa* é aconselhada para obter elevados índices de emergência de plântulas, o que ocasiona maior uniformidade na obtenção de mudas e em menor tempo. Contudo, demais etapas do cultivo *in vitro* ainda devem ser investigadas, principalmente em relação a viabilidade do processo de aclimatização das mudas e rustificação em viveiro.

Baseado nos resultados pode-se verificar que embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa* apresentam elevado índice de germinação em condições *in vitro*. Além disso, as melhores taxas de germinação ocorreram nas temperaturas de 30°C (75%) e 35°C (83,33%), com temperatura ótima estimada em 28°C. Temperaturas iguais ou superiores a 40°C

ocasionam o ressecamento, desidratação e mortalidade dos embriões cultivados em condições *in vitro*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES e FAPEMAT pelo apoio concedido.

Referências

- Almeida M, Almeida CV, Graner EM, Brondani GE, Abreu-Tarazi (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Reports*, 31(8):1495-1515. doi: 10.1007/s00299-012-1264-6
- Castro JPS (1979) As veredas e a sua proteção jurídica. *Revista da Faculdade de Direito*, 27(22):491-519.
- Costa NMS, Aloufa MAI (2006) Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 36(3):195-198.
- Federman S, Hyseni C, Clement W, Oatham MP, Caccone (2013) Habitat fragmentation and the genetic structure of the Amazonian palm *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) on the island of Trinidad. *Conservation Genetics*. doi: 10.1007/s10592-013-0543-2
- Ferreira EL (2006) *Manual das Palmeiras do Acre, Brasil*. Rio Branco: Instituto Nacional de Pesquisas, Universidade Federal do Acre. 212p.
- Fki L, Bouaziz N, Chkir O, Benjemaa-Masmoudi R, Rival A, Swennen R, Drira N, Panis B (2013) Cold hardening and sucrose treatment improve cryopreservation of date palm meristems. *Biologia Plantarum*, 57(2):375-379. doi: 10.1007/s10535-012-0284-y
- Gilmore MP, Endress BA, Horn CM (2013) The socio-cultural importance of *Mauritia flexuosa* palm swamps (aguajales) and implications for multi-use management in two Maijuna communities of the Peruvian Amazon. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9(29):1-23. doi: 10.1186/1746-4269-9-29
- Gomes LRP, Lopes MTG, Bentes JLS, Barros WS, Neto PQCN, Contim LAS (2011) Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11(3):216-223. doi: 10.1590/S1984-70332011000300003
- Henderson A, Galeano G, Bernal R (1995) *Field guide to the palms of the Americas*. New Jersey: Princeton University Press, Princeton. 351p.
- Iossi E, Sader R, Pivetta KFL, Barbosa JC (2003) Efeito de substratos e temperaturas na germinação de sementes de tamareira-anã (*Phoenix roebelenii* O'Brien). *Revista Brasileira de Sementes*, 25(2):63-69. doi: 10.1590/S0101-31222003000400009
- Kumar N, Modi AR, Singh AS, Gajera BB, Patel AR, Patel MP, Subhash N (2010) Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(2):207-213. doi: 10.1007/s12298-010-0023-9
- Maguire JD (1962) Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2(2):176-177. doi: 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x

- Martins RC, Filgueiras TS, Albuquerque UP (2012) Ethnobotany of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) in a maroon community in central Brazil. *Economic Botany*, 66(1):91-98. doi: 10.1007/s12231-011-9182-z
- MMA (2009) *Plano de manejo*: Parque Nacional da Chapada dos Guimarães. Chapada dos Guimarães: Ministério do Meio Ambiente, ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Parque Nacional da Chapada dos Guimarães. 250p.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Palanyandy SR, Suranthran P, Gantait S, Sinniah UR, Subramaniam S, Aziz MA, Alwee SSRS, Roowi SH (2013) *In vitro* developmental study of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids from cell suspension using scanning electron microscopy. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(5):1727-1733. doi: 10.1007/s11738-012-1201-x
- Pascal M, Hoffman A, Ramos JD (1998) *Cultura de tecidos, tecnologia e aplicações*. Lavras: Universidade Federal de Lavras - FAEPE, Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão. 159p.
- Ribeiro JF, Walter BMT (2008) As principais fitofisionomias do bioma cerrado. In: Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF (eds) *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília: EMBRAPA. p.153-212.
- Ribeiro LM, Oliveira DMT, Garcia QS (2012) Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. *Trees*, 26(3):851-863. doi: 10.1007/s00468-011-0659-2
- Scherwinski-Pereira JE, Guedes RS, Silva RA, Fermino Jr. PCP, Luis ZG, Freitas EO (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(3):501-508. doi: 10.1007/s11240-012-0115-z
- Spera MRN, Cunha R, Teixeira JB (2001) Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(12):1567-1572.
- Villalobos R, Herrera J (1991) Seed germination in pejibaye palm (*Bactris gasipaes*) I. effect of temperature and substrate. *Agronomia Costarricense*, 15(1-2):57-62.