

Determinação do protocolo de assepsia para reprodução *in vitro* de *Euterpe precatoria* MART.

Determination of aseptic protocol for reproduction *in vitro* of *Euterpe precatoria* MART.

DOI 10.5935/2446-4775.20170005

¹BATISTA, Bárbara N.*; ¹RAPÔSO, Nadia V.M.; ¹LIBERATO, Maria Astrid R.

¹Universidade do Estado do Amazonas, UEA, Manaus, AM, Brasil.

*Correspondência: barbara_sing@hotmail.com

Resumo

Euterpe precatoria Mart. (Arecaceae), importante em aspectos socioeconômico e ecológico por fornecer o “vinho” e palmito, é apreciada em praticamente todo o Brasil. Porém, ao retirar o palmito, executa-se a palmeira, que não perfilha, carecendo reprodução imediata. A micropropagação é o conjunto de técnicas que visa a reprodução em ambiente asséptico, a partir de fragmentos vegetais induzidos, por meio de cultivo artificial com vitaminas e nutrientes necessários. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar protocolos de desinfecção para reprodução *in vitro* de embriões e explantes foliares de *E. precatoria* em meios Murashige e Skoog (1962), e meio comercial para Orquídeas B&G Flores – Nutrição vegetal, a fim de baratear a produção. Retirados de forma asséptica, as amostras foram submetidas a tratamento com Álcool 70%, Hipoclorito de Sódio 2%, Fungicida Amistar® a 10% e Glutaron® a 10% variando-se no tempo de imersão. A avaliação foi feita, diariamente, a partir da quantia total de tubos contaminados e não contaminados. Constatou-se contaminações por bactérias nos embriões e oxidação nos explantes foliares. Assim, os adequados para explante foliar apresentaram 20% de contaminação em B&G e 40% em MS. Para embriões a porcentagem de contaminação foi 40% em MS e 33% em meio B&G.

Palavras-chave: Açazeiro. Micropropagação. Desinfecção. *E. precatoria*.

Abstract

Euterpe precatoria Mart. (Arecaceae), important in socio-economic and ecological aspects for providing the "wine" and palmetto, is appreciated in almost all of Brazil. However, when removing the palm, kill the palm tree, that does not share, lacking replanting immediate. Micropropagation is aggregate techniques to propagation aseptic environment from plant fragments induced by artificial cultivation with necessary vitamins and nutrients. The objective of this research was to evaluate protocols disinfection for breeding *in vitro* embryo and leaf explants of *E. precatoria* in Murashige and Skoog (1962) and commercial means of Orchids B & G Flores – Nutrição vegetal in order to cheapen production. Aseptically removed, the samples were subjected to treatment with alcohol 70% Sodium Hypochlorite 2% Fungicide Amistar® 10% and 10% Glutaron® varying the immersion

time. The evaluation was made daily from the total amount of contaminated pipes and uncontaminated. Contamination by bacteria found in embryos and oxidation in leaf explants. As soon, suitable for foliar explants showed 20% contamination in B & G and 40% MS. For embryos contamination rate was 40% MS, and 33% in medium B & G.

Keywords: Açaizeiro. Micropropagation. Disinfection. *E. precatoria*.

Introdução

A floresta amazônica possui uma diversidade de espécies vegetais tanto classificadas quanto não classificadas pelos pesquisadores, e nesta vasta diversidade, existem as palmeiras, que dão características e enriquecem as matas onde são encontradas. Dentre o grande número de espécies de palmeiras, destaca-se o açaí por ser de grande valor socioeconômico. Segundo Calzavara (1972), a espécie conhecida no Estado do Amazonas, como Açaí de terra firme, Açaí solitário, Açaí do Amazonas ou simplesmente Açaí, é encontrada no Alto Amazonas, estendendo-se desde Mato Grosso e Bolívia, chegando ao Peru, ao Sul da Colômbia e a Venezuela. O fruto é muito apreciado em todas as regiões brasileiras. É usado na alimentação, na fabricação de cosméticos, corantes e velas. Suas folhas servem como telhado para habitações. A semente é utilizada como adubo, em fornos de panificadoras e olarias como fonte de energia e, também, na confecção de bijuterias e outras variedades de artesanato. E, do caule, a madeira é utilizada em moradia (paredes, mesas e prateleiras), e é de onde se extrai o palmito, principal fonte de matéria prima para agroindústria. O fato de não apresentar perfilho em sua base, nem originar cepas após ser abatida (LEDO et al., 2001), remetem a pontos importantes a serem levados em conta no aumento do rendimento desta espécie, e que pode ser contornado a partir da reprodução *in vitro*, levando a reprodução em larga escala plântulas saudáveis (GAMA et al., 2005).

Técnicas baseadas na biotecnologia proporcionam métodos eficientes e de baixo custo que permite o plantio da espécie para os diversos usos, porém o longo tempo que leva para germinar é o que impede o “replantio imediato” necessário. Assim, a micropropagação se revela como uma técnica mais apropriada por auxiliar em estudos, tanto morfológicos quanto genéticos, para conservação e melhoramento genético de espécies arbóreas, por se basear na teoria da totipotencialidade, que consiste na capacidade de um fragmento se regenerar até uma planta semelhante a seu original, ou Planta-mãe (GUERRA et al., 2000; DOS SANTOS et al., 2008).

A micropropagação apresenta como pontos positivos características, como: a redução do tempo de multiplicação; a produção em grande quantidade, em uma área reduzida com relevante baixo custo; maior controle do material propagado; facilidade para transporte do material e; ainda, multiplicar indivíduos “raros”, dando assim, origem a um banco de germoplasma. Porém, a técnica de cultivo *in vitro* apresenta desvantagens como a necessidade de pessoal especializado, alto custo de implantação laboratorial (sendo este de infraestrutura adequada para os experimentos) e seus equipamentos, solventes e vidrarias.

Porém, para que a técnica possa atender ao objetivo de ampliar rendimento e, se possível, o melhoramento genético, é indispensável desenvolver protocolos eficazes. Com frequência, os maiores desafios à aplicação das técnicas de cultivo *in vitro*, principalmente em espécies arbóreas, são a contaminação endógena e exógena por microrganismos e a oxidação fenólica (SKIRVIN et al., 1999; GEORGE e SHERRINGTON, 1985). A seleção de explantes com maior vigor, a diminuição do tempo de manipulação

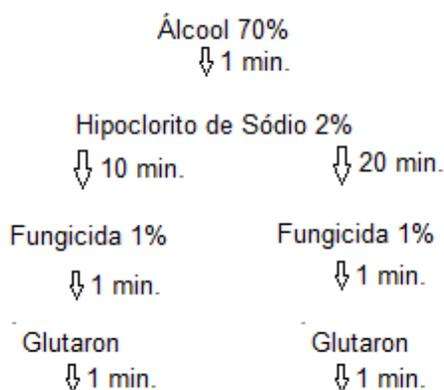
do material vegetal e, principalmente, a imersão dos explantes em agentes desinfetantes são as abordagens usualmente utilizadas durante o estabelecimento de protocolos de assepsia do material vegetal (SKIRVIN et al., 1999).

Materiais e Métodos

Baseado na citação de Cid (2014), as amostras foram submetidas à assepsia com compostos como Álcool 70% e Hipoclorito de Sódio ou de Cálcio. Os explantes foliares foram obtidos a partir de plântulas cultivadas do viveiro da Escola Superior de Tecnologia (EST-UEA), e as sementes foram fornecidas pela empresa Waku Sese, tanto os explantes quanto as sementes foram pré-lavados com água corrente e detergente a fim de retirar sujeiras do próprio viveiro e restos do “vinho de açaí”.

Após a seleção de estruturas saudáveis, as mesmas foram fragmentadas e submetidas aos testes de desinfecção durante 1 minuto em álcool 70%, seguido de submersão em Hipoclorito de Sódio (2% (p/v) cloro ativo) durante 10 e 20 minutos e, posterior, imersão durante 1 minuto em fungicida Amistar® a 1% em seguida no desinfetante industrial Glutaron®. No término de cada etapa, os explantes foram lavados com água destilada (**FIGURA 1**).

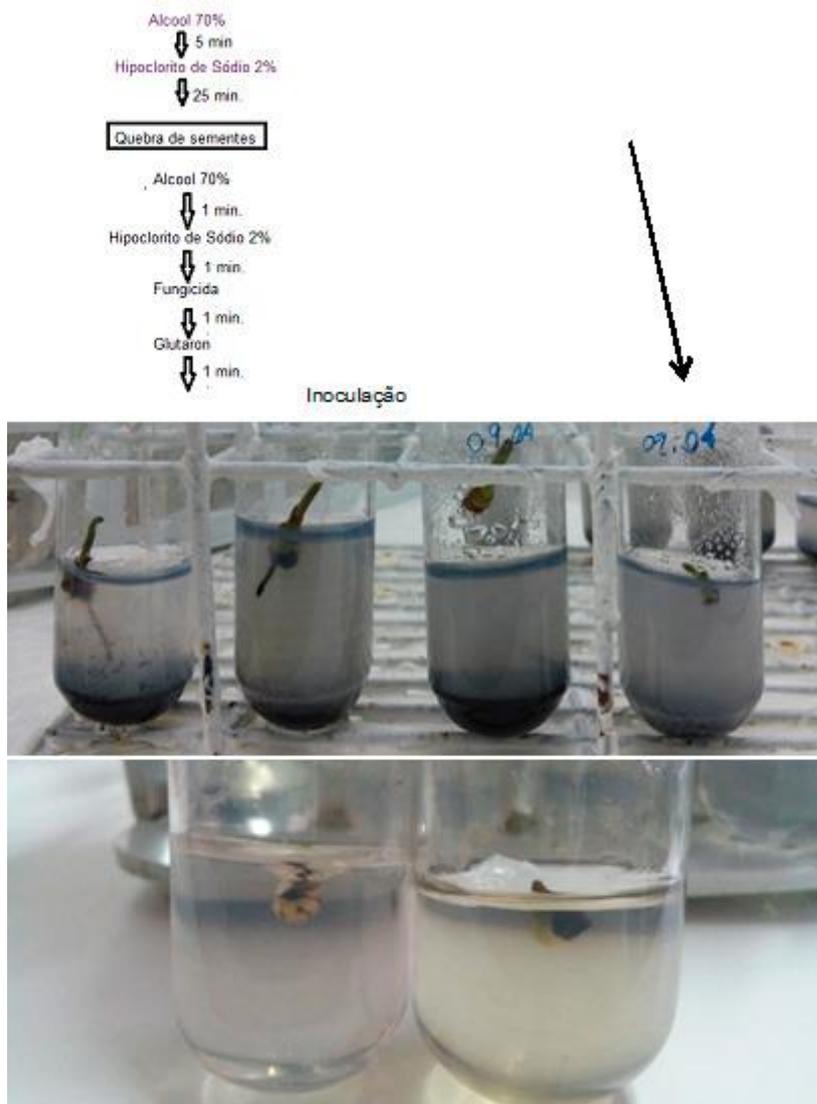
FIGURA 1. Esquema de desinfecção usado.



As sementes foram submetidas a uma assepsia com álcool 70% (v/v) durante 5 minutos, lavadas com água destilada e imersas em Hipoclorito de Sódio comercial (2% (p/v) cloro ativo) durante 25 minutos e, devidamente, lavadas com água destilada a fim de dar início à excisão dos embriões para inoculação.

Após extração, os embriões foram divididos em dois lotes. Um lote foi inoculado imediatamente após a retirada e o outro lote foi submetido à desinfecção com Álcool 70% (v/v), Hipoclorito de Sódio Comercial 2% (2% (p/v) cloro ativo), Fungicida Amistar® 1% e desinfetante industrial Glutaron® durante 1 minuto respectivamente e, no término de cada etapa, foi realizada a lavagem dos embriões com água destilada (**FIGURA 2**).

FIGURA 2. Protocolo seguido para assepsia de sementes e embrião.



Resultados e Discussão

Foi possível a montagem do protocolo de assepsia dos explantes foliares da *Euterpe precatoria*, permitindo o desenvolvimento de estudos posteriores que incluam sua micropropagação.

Após 10 dias de inoculação, os explantes foliares imersos em Hipoclorito 2%, durante 10 minutos, apresentavam 1% de oxidação em meio MS (FIGURA 4A) e, após 1 mês, as amostras imersas durante 10 e 20 minutos, haviam apresentado 40% e 26%, respectivamente, de contaminação por bactérias em meio MS e porcentagens de 50% e 20% no meio B&G para orquídeas (TABELA 1).

O protocolo desenvolvido para assepsia dos embriões é mais eficaz quando realizado na semente (a fim de retirar impurezas do armazenamento e transporte) e nos embriões, pois previne contaminações, tanto na excisão quanto na manipulação. As amostras em que os embriões foram inoculados diretamente, após 30 dias apresentaram 100% de contaminação, enquanto as amostras com embriões desinfetados apresentaram 43% de contaminação por bactérias em meio MS e 23% em meio B&G para orquídeas. Aos 40 dias após a inoculação,

os embriões em meio B&G apresentaram sinais de germinação (TABELA 2 e FIGURA 3A), enquanto em meio MS os sinais de germinação surgiram após 60 dias (FIGURA 3B).

FIGURA 3A e 3B . Embriões aos 40 dias (A) em meio B&G e aos 60 dias (B) em meio MS.

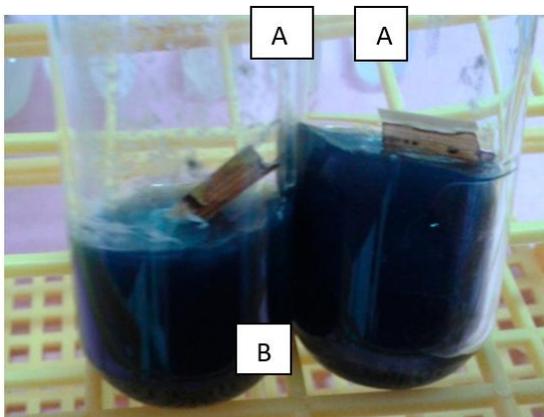


FIGURA 4A. Explantes foliares com oxidação (tratamento com Hipoclorito a 2% durante 20 minutos em meio B&G (A) e MS (B)).



TABELA 1. Porcentagem de contaminação nas amostras em explantes foliares.

% Hipoclorito	Tempo de imersão	% contaminação (meio MS)	% contaminação (meio B&G)
4%	10'	90% fungos 10% bactérias	93% fungos 6% bactérias
	20'	90% fungos 9% bactérias	90% fungos 6% bactérias
2%	10'	40% bactérias 10% fungos 3% oxidação	50% bactérias 13% fungos
	20'	26% bactérias 3% fungos 16% oxidação	20% bactérias 6% fungos 3% oxidação

TABELA 2. Porcentagem de contaminação nas amostras nos embriões.

% contaminados (assepsia apenas da semente)		% contaminados (assepsia da semente e embrião)*	
MS	B&G	MS	B&G
100% fungos	100% fungos	43% fungo 2% bactéria	23% fungo 7% bactéria

Com a elaboração de um protocolo de assepsia para explante foliar, Nogueira et al., (2007) explicam que, para a formação de calos, é necessário o estudo de condições para a produção de embriões somáticos, e assim suplementar com reguladores de crescimento, além de seu balanço hormonal (auxinas e citocininas) ser também um fator relevante o que, por sua vez, leva à continuidade da pesquisa ao micropropagar a *E. precatória*.

O controle da oxidação é um ponto importante pois, além dos contaminantes, pode ser também crucial para a reprodução das espécies vegetais de interesse. George e Sherrington (1985) denominam que a oxidação é resultado da liberação de compostos fenólicos no meio de cultura que, precursores da produção de lignina são altos quando o explante apresenta tecido injuriado ou estressado. Indica-se o cuidado durante a inoculação a fim de reduzir os níveis de oxidação nas amostras em tratamentos com solventes químicos ou, ainda, o cuidado como a lavagem das amostras durante 2 a 3 horas e, em alguns casos, é utilizado Cloreto de mercúrio para a redução de tais níveis de oxidação (ZIV e HALEVY, 1983). Além disso, Teixeira (2001) alega que os níveis de oxidação estão associados à idade das amostras, sendo que amostras jovens apresentam menor nível de oxidação quando comparado a estruturas mais antigas.

Para os embriões, que após devidamente limpos e induzidos no meio de cultura germinando após 40 dias, é indicada a metodologia de Ledo, Lameira e Menezes (2002), que após a germinação dos embriões, passa as amostras germinadas para o meio terciário, que foi avaliado 60 dias depois para observar a frequência embriogenética em relação ao total de explantes.

Considerações Finais

Os tratamentos utilizados neste experimento indicam que é possível o desenvolvimento *in vitro* de embriões de *Euterpe precatória*, e quanto aos resultados para os explantes considerou-se as condições dos viveiros em que foram produzidas as plântulas fornecedoras dos explantes. Fatores como a estrutura do laboratório, viveiros e material vegetal de qualidade são condições fundamentais para o sucesso do cultivo *in vitro*. De uma maneira geral, os dados aqui apresentados sugerem um protocolo eficiente para o cultivo *in vitro* desta espécie ou base para outros testes de desinfecção.

Agradecimentos

À Universidade do Estado do Amazonas pela estrutura e material cedidos, à equipe que acompanhou o andamento do trabalho e à FAPEAM (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amazonas) e MURAKI pelo financiamento.

Referências

- CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA, 2014. 325p, ISBN 978-85-7035-379-5.
- CALZAVARA, B. B. G. As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico. Simpósio Internacional Sobre Plantas de Interesse Econômico de La Flora Amazônica, Belém (PA). Resumos... Belém: IICA, p. 165 -206. 1972.

DOS SANTOS, A. L. W.; STEINER, N.; GUERRA, M. P.; ZOGLAUER, K.; MOERSCHBACHER, B. M. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*. Springer. *Biologia Plantarum*, v. 52, n. 1, p. 195 -199, USA. 2008. ISSN 1573-8264. [[CrossRef](#)].

GAMA, M. de M. B.; RIBEIRO, G. D.; FERNANDES, C. de F.; MEDEIROS, I. M. de. Açai (*Euterpe* spp.): características, formação de mudas e plantio para a produção de frutos. Embrapa Rondônia – *Circular Técnica*, Porto Velho – RO; 6p. 2005. ISSN 0103-9334.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON P. D. Plant propagation by tissue culture. Eversley, Basingstoke, 7^a ed., Wiley. *Journal of Basic Microbiology*, v. 25, 475 p., 1985. ISBN 0-9509325-0-7. [[CrossRef](#)].

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; DOS SANTOS, A. L. W.; ASTARITA, L. V.; NODARI, R. O. Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (Ed.). Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers*, v. 6. p. 457-478. 2000. [[CrossRef](#)].

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. S.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I.C.M.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, M.S.P.O. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. *SciELO. Revista brasileira Fruticultura*. v.23, n.3, p. 468-472. 2001. ISSN 0100-2945. [[CrossRef](#)]

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, I. L. *Embriogênese somática e regeneração de plantas em açazeiro*. Boletim de pesquisa e Desenvolvimento, n.34, 1^a ed., EMBRAPA Rio Branco - AC, 2002. ISSN 0101-5516.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497, Copenhagen, 1962. [[CrossRef](#)].

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 2, p. 366-370, Lavras, 2007. ISSN 1981-1829. [[CrossRef](#)].

SKIRVIN, R. M.; MOTOIKE, S.; NORTON, M. A.; OZGUR, M.; AL-JUBOORY, K.; MCMEANS, O. M. Establishment of contaminant-free perennial plants on vitro. *In vitro cellular & developmental Biology-plant*, v. 35, n°4, p. 278-290, 1999. [[CrossRef](#)].

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. [[Link](#)].

ZIV, M.; HAVELEVY, A.H. Control of oxidative browning and in vitro propagation of *Strelitzia reginae*. *Agris. Hort Science*, v. 18, n°4, p. 434-436, Alexandria, 1983. ISSN 0018-5345.

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Histórico do artigo: Submissão: 21/04/2016 | Aceite: 09/11/2016 | Publicação: 22/09/2017

Como citar este artigo: BATISTA, B. N.; RAPÔSO, N. V.M.; LIBERATO, M. A. R. Determinação do protocolo de assepsia para reprodução *in vitro* de *Euterpe precatoria* MART. *Revista Fitos*. v.11, n1. p. 40-47. Rio de Janeiro. 2017. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/337>>. Acesso em: 11 maio 2017.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.
