

Artigos

Germinação *in vitro* de *Raulinoa echinata* R. S. Cowan (Rutaceae): sementes e embriões zigóticos

In vitro germination of *Raulinoa echinata* R. S. Cowan (Rutaceae): seeds and zygotic embryos

Luana Tiara Hoffmann^I 
Ricardo Bittencourt^{II} 
Iasmin Tassi Grott^{II} 
Carmem Lúcia Sperlich^{III} 

^IPlante Projetos Ambientais Ltda, Blumenau, SC, Brasil

^{II}Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brasil

^{III}Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

RESUMO

Raulinoa echinata é uma espécie endêmica do Vale do Itajaí/Santa Catarina, ameaçada de extinção e que se encontra em ambiente vulnerável e, devido ao fato de possuir sementes recalcitrantes, as técnicas *in vitro* são uma das estratégias mais indicadas para sua conservação *ex situ*. Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi estabelecer a espécie *Raulinoa echinata in vitro* por meio da germinação de sementes e embriões zigóticos. As sementes foram retiradas de frutos maduros e submetidas a tratamentos de embebição em ácido giberélico (GA_3) e de imersão em soluções de álcool, hipoclorito de sódio e fungicida (Benlate 500®); sendo inoculadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) sem reguladores de crescimento. Para o resgate dos embriões zigóticos, a metodologia consistiu-se em: coleta e assepsia de frutos imaturos; abertura dos frutos e retirada das sementes; assepsia das sementes; resgate dos embriões e remoção do endosperma; e inoculação dos embriões em meio de cultura MS suplementado com reguladores de crescimento: 6-benzilaminopurina (BAP), ácido 1-naftalenoacético (ANA) e GA_3 , isolados e em associação. As metodologias propostas para a assepsia das sementes mostram-se satisfatórias, porém não houve germinação após 65 dias de cultivo independente do tempo de embebição em GA_3 ; formulando-se a hipótese de que o endosperma da espécie possui inibidores de crescimento que impedem a germinação *in vitro*. Para os embriões zigóticos, o meio de cultura MS sem reguladores de crescimento mostrou-se eficiente para a germinação (80%) e para o desenvolvimento, sendo que o futuro estabelecimento de um protocolo de criopreservação para os embriões zigóticos da espécie mostra-se promissor para a conservação *ex situ*.

Palavras-chave: Endemismo; Ameaça de extinção; Conservação; Micropropagação

ABSTRACT

Raulinoa echinata is an endemic species of the Vale do Itajaí/Santa Catarina, which is endangered and is found in a vulnerable environment, and because it has recalcitrant seeds, *in vitro* techniques are one of the most favorable strategies for its *ex situ* conservation. The objective of this study was to establish *Raulinoa echinata in vitro* through the seeds and zygotic embryos germination. The seeds were extracted from mature fruits, being submitted to treatments of imbibition in gibberellic acid (GA₃), and immersion in alcohol, sodium hypochlorite and fungicide (Benlate 500®); being inoculated in Murashige and Skoog (MS) culture medium without growth regulators. For the extraction of zygotic embryos, the methodology consisted of: collect and asepsis of immature fruits; opening of fruits and removal of seeds; seed asepsis; embryos extraction and endosperm removal; and inoculation of the embryos in MS culture medium supplemented with growth regulators: 6-benzylaminopurine (BAP), naphthalene-1-acetic acid (NAA) and GA₃, isolated and in association. The proposed methodologies for seed asepsis were satisfactory, but there was no germination after 65 days of culture regardless of the imbibition time in GA₃; formulating the hypothesis that the endosperm of the species has growth inhibitors that hinder the germination *in vitro*. For the zygotic embryos, the MS culture medium without growth regulators proved to be efficient for their germination (80%) and for their development; and the future establishment of a cryopreservation protocol for the zygotic embryos of the species seems promising for its *ex situ* conservation.

Keywords: Endemism; Endangered; Conservation; Micropropagation

1 INTRODUÇÃO

Popularmente conhecida como cutia-de-espinhos ou sarandi, *Raulinoa echinata* R. S. Cowan (Rutaceae) é uma espécie reófito e endêmica do Vale do Itajaí/Santa Catarina (COWAN; SMITH, 1973), mais precisamente da Floresta Ombrófila Densa Aluvial (IBGE, 2012). Ocorre entre os municípios de Lontras e Ibirama até Indaial (BITTENCOURT, 2010), exclusivamente em alguns pontos das margens e ilhas rochosas do rio Itajaí-Açu (COWAN; SMITH, 1973), podendo ser considerada um caso de micro-endemismo (DAROSCI; PAULILO, 2011). A espécie figura na “Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção” (BRASIL, 2014) e encontra-se sujeita a uma série de pressões antrópicas (BITTENCOURT, 2010; DAROSCI; PAULILO, 2011).

Além de endêmica, de estar ameaçada de extinção e de se encontrar em ambiente vulnerável, *Raulinoa echinata* possui sementes recalcitrantes, sendo que espécies que apresentam essas características devem ser prioridade de pesquisas e programas de conservação *ex situ* por meio de estratégias *in vitro* (PILATTI *et al.*,

2011). Nesse sentido, para o cultivo de espécies *in vitro* e posterior conservação, a micropropagação destaca-se como uma das técnicas de cultura de tecidos mais empregada na área florestal (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A primeira etapa da micropropagação consiste em estabelecer a espécie *in vitro*, o que pode ser alcançado por meio da germinação *in vitro* de explantes (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013), como sementes e embriões zigóticos (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). A germinação *in vitro* é considerada uma técnica vantajosa em virtude, principalmente, de baixas taxas de contaminação (HU; FERREIRA, 1998; SOUZA *et al.*, 2011) e alta resposta morfogênica (HU; FERREIRA, 1998; SOUZA *et al.*, 2012); todavia, para isso é necessário estabelecer um protocolo eficiente de assepsia (SOUZA *et al.*, 2011) sem danificar o tecido dos explantes.

A assepsia das sementes é comumente realizada com soluções de álcool (SOUZA *et al.*, 2011; LENCINA *et al.*, 2014) e hipoclorito de sódio (SOUZA *et al.*, 2011; ROSSI; SARTORETTO, 2013), podendo também ser empregado o uso de soluções fungicidas (MORAES *et al.*, 2010; ALCÂNTARA *et al.*, 2011). Além da assepsia, as sementes de algumas espécies podem necessitar de pré-tratamentos para aumentar a porcentagem e/ou a velocidade de germinação (BRAUN *et al.*, 2010), sendo frequentemente realizada a pré-embebição em ácido giberélico (GA_3) (BRAUN *et al.*, 2010; BÁRBARA *et al.*, 2015).

No que se refere aos embriões zigóticos, o crescimento destes pode ser estimulado com o acréscimo de reguladores de crescimento ao meio de cultura (HU; FERREIRA, 1998), sendo que algumas espécies da família Rutaceae apresentaram resultados satisfatórios com o emprego de 6-benzilaminopurina (BAP) associada com ácido 1-naftalenoacético (ANA) (NAYAK; PATEL; SUTHAR, 2015) e de GA_3 isolado (CARIMI; PASQUALE; PUGLIA, 1998; CHAGAS *et al.*, 2005; KURT; ULGER, 2014).

Diante do exposto e considerando a falta de trabalhos sobre o cultivo *in vitro* de *Raulinoa echinata*, este trabalho objetivou: a) avaliar diferentes tempos de embebição em GA_3 e metodologias de assepsia na germinação *in vitro* de sementes maduras da espécie; e b) determinar os efeitos de reguladores de crescimento e concentrações de GA_3 na germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos da espécie; ambos visando estabelecer a espécie *Raulinoa echinata in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Condições gerais dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Micropropagação Vegetativa do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Regional de Blumenau (FURB), localizado no município de Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

Os explantes de todos os experimentos foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo aproximadamente 15 ml de meio de cultura, sendo que os tubos de ensaio foram vedados com papel alumínio e filme de pvc. O pH do meio de cultura foi previamente ajustado entre 5,7 e 5,8; posteriormente, foi esterilizado em autoclave sob temperatura de 121°C e 2 atmosferas de pressão, durante 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e um regime de fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria sob $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância.

No que se refere à análise dos dados, as variáveis porcentagem de contaminação e porcentagem de germinação foram submetidas ao Teste do Qui-Quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade; e de acordo com a significância, foram construídas Tabelas de Contingência de dupla entrada (2 x 2), também a 5% de probabilidade. As demais variáveis foram submetidas ao Teste de Shapiro-Wilk ($n < 50$) ou de Kolmogorov-Smirnov ($n > 50$) para análise da normalidade, sendo transformadas por $\ln(x+2)$ quando necessário; em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e, de acordo com a significância, as médias foram comparadas pelo Teste de Student Newman Keuls (SNK) a 5% de probabilidade. A comparação de médias entre os períodos de avaliação foi realizada através do Teste *t* pareado. Essas análises estatísticas foram realizadas por meio dos softwares BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007), Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011) e Microsoft Excel (Office 365).

2.2 Sementes maduras

2.2.1 Tempos de embebição em GA₃ e metodologias de assepsia

As sementes maduras foram retiradas manualmente de frutos maduros, os quais foram coletados de diferentes indivíduos de duas populações de Ibirama/SC localizadas próximas às coordenadas geográficas 27°4'56.07"S e 49°30'17.80"O. Essas sementes foram previamente lavadas com detergente neutro e permaneceram sob água corrente durante 1 hora. Em seguida, as sementes foram submetidas aos tratamentos (T) de embebição em GA₃ e de assepsia, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos de embebição em GA₃ e de imersão em soluções de álcool, hipoclorito de sódio e fungicida

Tratamento	Tempo de embebição em GA₃ (100 µL L⁻¹)	Tempo de imersão em álcool a 70%	Tempo de imersão em NaClO a 6%	Tempo de imersão em fungicida a 1%
T1	0	3 minutos	20 minutos	0
T2	0	3 minutos	30 minutos	0
T3	0	3 minutos	20 minutos	10 minutos
T4	0	3 minutos	30 minutos	10 minutos
T5	12 horas	3 minutos	20 minutos	0
T6	12 horas	3 minutos	30 minutos	0
T7	12 horas	3 minutos	20 minutos	10 minutos
T8	12 horas	3 minutos	30 minutos	10 minutos

Fonte: Autores (2021)

Ademais, vale mencionar que nos tratamentos sem embebição em GA₃ e sem imersão em fungicida, as sementes ficaram embebidas em água destilada pelo mesmo período de tempo; o fungicida utilizado foi o Benlate 500®; e foram adicionadas duas gotas de surfactante Tween 20 em cada uma das soluções de assepsia.

Após a assepsia, foi realizada a tríplex lavagem das sementes com água destilada

e autoclavada, após foram inoculadas em meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g L^{-1}) e ágar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$). O delineamento do experimento foi em blocos completamente casualizados, com 8 tratamentos, 4 blocos, 2 tubos de ensaio compondo cada bloco e 1 semente por tubo de ensaio. A repetição foi reduzida em virtude da escassez de frutos maduros da espécie durante o período de realização deste experimento.

As sementes inoculadas *in vitro* foram cultivadas em sala de crescimento e permaneceram no escuro durante os 15 primeiros dias, sendo que após 65 dias de cultivo foram avaliadas a porcentagem de contaminação e a porcentagem de germinação.

2.3 Embriões zigóticos imaturos

2.3.1 Reguladores de crescimento no meio de cultura MS

Os embriões zigóticos imaturos foram oriundos de frutos verdes coletados de diferentes indivíduos de duas populações naturais localizadas em Ibirama/SC, próximas às coordenadas geográficas $27^{\circ}4'56.07''\text{S}$ e $49^{\circ}30'17.80''\text{O}$. Os frutos foram lavados com detergente neutro, permaneceram sob água corrente durante 2 horas e, posteriormente, em câmara de fluxo laminar ficaram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 6% durante 20 minutos.

Posteriormente, os frutos foram excisados para retirada das sementes, as quais foram imersas em solução de álcool a 70% durante 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% durante 10 minutos. Todas as soluções de assepsia foram acrescidas de duas gotas de surfactante Tween 20. Após a assepsia, foi realizada a tríplice lavagem das sementes com água destilada e autoclavada; e com auxílio de uma lupa eletrônica, foram excisadas para o resgate dos embriões, os quais tiveram todo o endosperma removido.

Os embriões foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), ágar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$) e tratamentos com associações entre reguladores de crescimento, sendo: T1 = basal (sem reguladores de crescimento); T2 = $4,4 \mu\text{M}$ de BAP; T3 = $4,4 \mu\text{M}$ de BAP + $0,5 \mu\text{M}$ de ANA; T4 = $23,12 \mu\text{M}$ de GA_3 ; e T5 = $4,4 \mu\text{M}$ de BAP + $0,5 \mu\text{M}$ de ANA + $23,12 \mu\text{M}$ de GA_3 . O delineamento experimental foi em blocos completamente casualizados, com 5 tratamentos, 15 blocos, 2 tubos de ensaio compondo cada bloco e 1 embrião por tubo de ensaio.

Os explantes inoculados *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento e permaneceram no escuro durante os 15 primeiros dias. Após 35 e 65 dias de cultivo, foram avaliadas a porcentagem de contaminação, a porcentagem de germinação, a altura das plântulas e o número de folhas das plântulas, sendo considerados germinados os embriões que apresentaram crescimento após a inoculação.

2.3.2 Concentrações de GA_3 no meio de cultura MS

Os procedimentos para o resgate dos embriões foram os mesmos do experimento anterior. Os embriões foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), ágar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$) e tratamentos com concentrações de GA_3 , sendo: T1 = basal; T2 = $11,56 \mu\text{M}$; T3 = $23,12 \mu\text{M}$; e T4 = $34,68 \mu\text{M}$. O delineamento do experimento foi em blocos completamente casualizados, com 4 tratamentos, 10 blocos, 2 tubos de ensaio compondo cada bloco e 1 embrião por tubo de ensaio.

Após a inoculação, os embriões foram cultivados em sala de crescimento e mantidos no escuro durante os 15 primeiros dias. As variáveis porcentagem de contaminação, porcentagem de germinação, altura das plântulas e número de folhas das plântulas foram avaliadas após 40 e 65 dias de cultivo, sendo considerados germinados os embriões que apresentaram crescimento após a inoculação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Sementes maduras

3.1.1 Tempos de embebição em GA₃ e metodologias de assepsia

Nenhuma semente apresentou germinação aos 65 dias. No entanto, apenas 7,8% das sementes apresentaram contaminação, sem diferença significativa entre os tratamentos, o que demonstra que as metodologias de assepsia propostas foram satisfatórias. Dessa forma, os futuros experimentos de otimização do protocolo podem adotar os mesmos parâmetros como base, sendo que o T1 (imersão em solução de álcool a 70% durante 3 minutos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 6% durante 20 minutos) é a metodologia menos agressiva em relação à exposição das sementes a agentes desinfetantes.

Tendo em vista que não houve germinação de nenhuma semente deste experimento, como também o fato observado em experimentos-piloto de resgate de embriões, nos quais a manutenção do endosperma (ou parte dele) inibiu a germinação, formula-se a hipótese de a dormência estar relacionada com a presença do endosperma. Sugere-se que o endosperma da espécie *Raulinoa echinata* constitui uma barreira física para o desenvolvimento *in vitro* do embrião. Do mesmo modo, levanta-se a hipótese de o endosperma ser responsável pelo fornecimento de inibidores químicos de crescimento que, possivelmente, são degradados de algum modo específico no ambiente natural.

Resultados similares foram obtidos por Paiva Neto *et al.* (2014), os quais concluíram que o endosperma da espécie *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) provavelmente inibe fisicamente o processo de germinação *in vitro* de embriões zigóticos da espécie, além de possuir inibidores químicos que também dificultam o processo. Mendes *et al.* (2008), estudando *Citrus spp.* (Rutaceae), também verificaram que a remoção do endosperma é benéfica para a germinação *in vitro* de embriões da espécie.

Dessa forma, novos estudos são necessários para se determinar se o endosperma da espécie *Raulinoa echinata* realmente possui inibidores de crescimento que prejudicam a sua germinação *in vitro*. Além disso, também se mostram promissores estudos que objetivem compreender a germinação da espécie em ambiente natural, a fim de se determinar a dinâmica de degradação das possíveis substâncias inibidoras.

3.2 Embriões zigóticos imaturos

3.2.1 Reguladores de crescimento no meio de cultura MS

A contaminação do experimento foi de apenas 5,33% e foi verificada já na primeira avaliação, o que demonstra que a assepsia adotada foi satisfatória.

Todos os tratamentos apresentaram alta germinação, a qual variou de 67 a 77% aos 35 dias e de 73 a 80% aos 65 dias, contudo, sem diferença significativa entre os tratamentos e entre os períodos avaliados (Figura 1A). Apesar de não haver diferença significativa, observa-se que os tratamentos com GA₃ (T4 e T5) apresentaram as maiores médias absolutas de germinação em ambas as avaliações, do mesmo modo que apresentaram as menores porcentagens de germinação tardia (após 35 dias) (Figura 1A). Segundo Taiz e Zeiger (2006), o emprego de giberelinas exógenas tende a beneficiar o processo germinativo principalmente pela ativação do crescimento vegetativo do embrião.

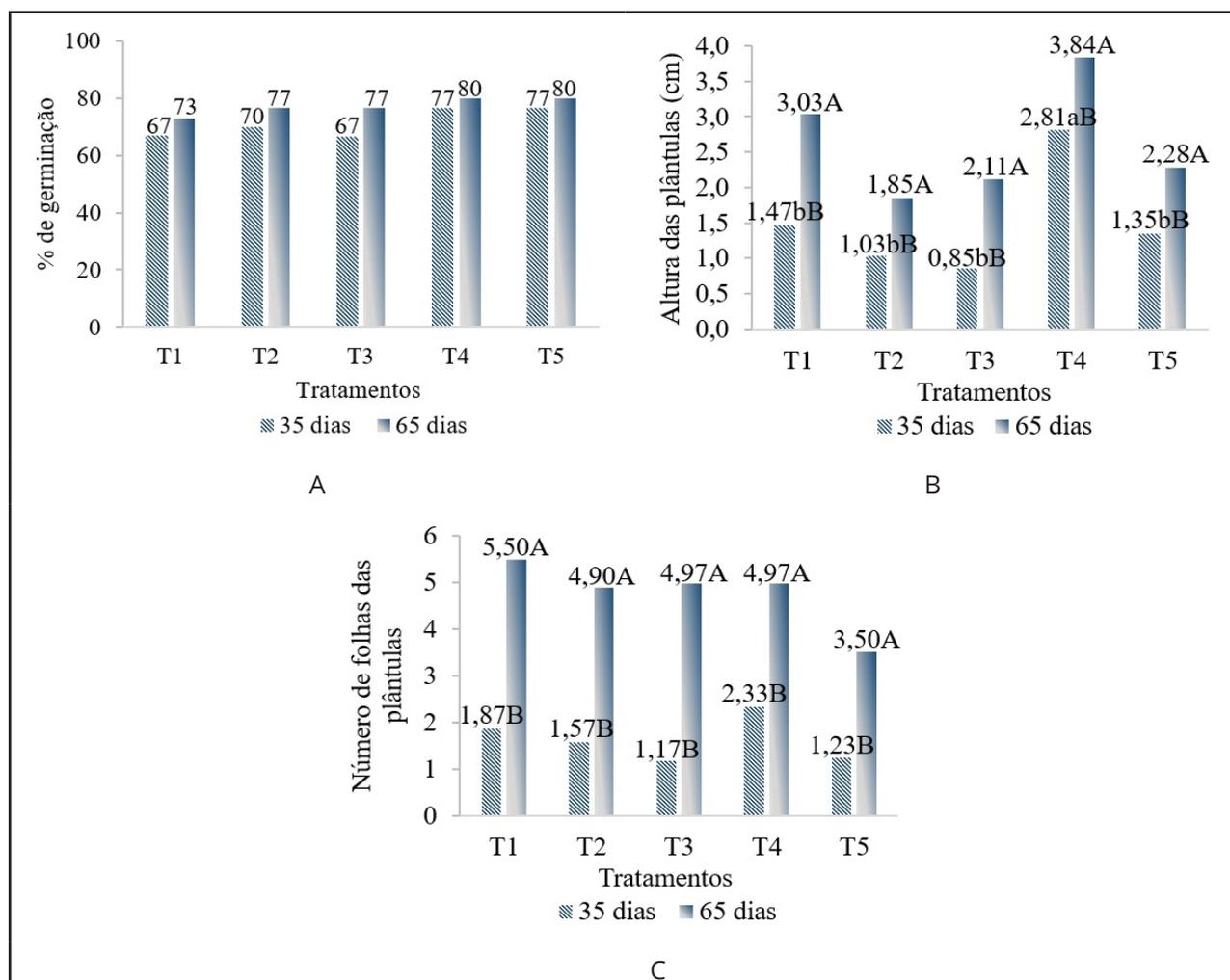
Além disso, vale observar que o tratamento com GA₃ isolado (T4) e o tratamento com GA₃ associado com BAP e ANA (T5) apresentaram as mesmas porcentagens de germinação (Figura 1A). Esse resultado difere do encontrado para *Citrus aurantium* L. (Rutaceae), a qual obteve a maior porcentagem de germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos em meios de cultura com GA₃ isolado quando comparado com meios contendo GA₃ associado com BAP ou ANA (CARIMI; PASQUALE; PUGLIA, 1998).

No que se refere à variável altura, houve diferença significativa entre os tratamentos e entre os períodos avaliados (Figura 1B; Figura 2). Aos 35 dias, o T4 (GA₃) apresentou altura significativamente superior (2,81 cm), e aos 65 dias também apresentou a maior altura (3,84 cm), todavia, sem diferir significativamente dos demais tratamentos (Figura 1B). Chagas *et al.* (2005), ao introduzirem *in vitro* embriões zigóticos imaturos de um híbrido de *Citrus* (Rutaceae), também obtiveram os melhores resultados para a variável altura com o acréscimo de GA₃ ao meio de cultura. Esses resultados se devem à capacidade das giberelinas em estimular o alongamento celular, sendo que a aplicação exógena está frequentemente associada com o aumento da altura em várias espécies (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os tratamentos com adição de BAP (T2, T3 e T5) apresentaram as menores médias absolutas para a altura, nos dois períodos de avaliação, sem diferença significativa (Figura 1B). Resultados similares foram encontrados por Fonseca *et al.* (2014) ao estabelecerem *in vitro* embriões zigóticos de *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae), sendo que esses autores verificaram redução da altura com o aumento das concentrações de BAP, obtendo-se a maior altura na ausência deste regulador de crescimento. Esses resultados também corroboram com a análise de Taiz e Zeiger (2006), os quais mencionam que a aplicação de citocininas exógenas tende a inibir o processo de alongamento de caules, em virtude, principalmente, de induzirem a divisão celular.

A variável número de folhas apresentou diferença significativa apenas entre os períodos avaliados, para todos os tratamentos (Figura 1C; Figura 2). O número de folhas variou de 1,17 a 2,33 aos 35 dias e de 3,5 a 5,5 aos 65 dias, sem diferença significativa entre os tratamentos (Figura 1C).

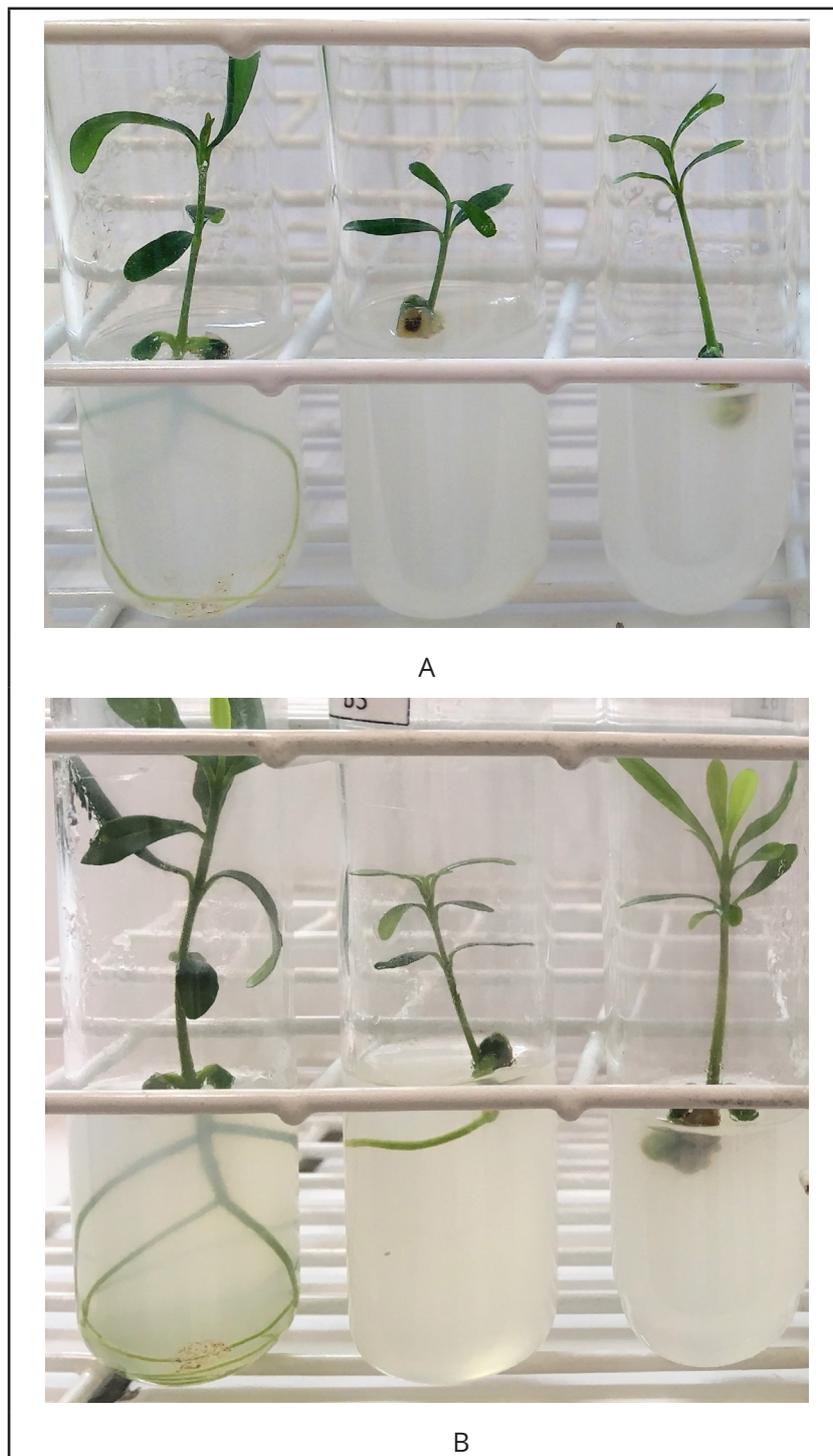
Figura 1 – Porcentagem de germinação (A), altura (B) e número de folhas (C) de embriões zigóticos imaturos de *Raulinoa echinata* em resposta a reguladores de crescimento no meio de cultura MS, após 35 e 65 dias de cultivo



Fonte: Autores (2021)

Em que: T1 = basal; T2 = 4,4 μM de BAP; T3 = 4,4 μM de BAP + 0,5 μM de ANA; T4 = 23,12 μM de GA₃; T5 = 4,4 μM de BAP + 0,5 μM de ANA + 23,12 μM de GA₃. Os dados de porcentagem de germinação foram submetidos ao Teste do Qui-Quadrado (χ^2), e os demais dados foram submetidos à ANOVA e ao Teste de Student Newman Keuls (SNK). A comparação de médias entre os períodos de avaliação foi realizada através do Teste *t* pareado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade: as letras minúsculas referem-se à comparação entre os tratamentos, para o mesmo período de avaliação; as letras maiúsculas referem-se à comparação entre os períodos de avaliação, para o mesmo tratamento.

Figura 2 – Plântulas de *Raulinoa echinata* oriundas de resgate de embriões imaturos, após 35 (A) e 65 (B) dias de cultivo em meio de cultura MS com reguladores de crescimento, com destaque para a diferença na altura e no número de folhas entre os períodos avaliados



Fonte: Autores (2021)

Tendo em vista que o T4 (GA₃) se destacou em relação à porcentagem de germinação e à altura, e que apresentou a segunda maior média absoluta de número de folhas, aos 65 dias, conduziu-se um segundo experimento com o objetivo de avaliar os efeitos de concentrações de GA₃ no resgate de embriões zigóticos imaturos de *Raulinoa echinata*.

3.2.2 Concentrações de GA₃ no meio de cultura MS

Não foram verificadas contaminações ao final dos 65 dias, o que mostra que a assepsia empregada foi adequada. Os tratamentos apresentaram diferença significativa apenas para a variável altura aos 40 dias (Figura 3), sendo que a maior concentração de GA₃ (T4) apresentou altura significativamente superior à altura do meio de cultura basal (T1) (Figura 3B). Por outro lado, aos 65 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas (Figura 3).

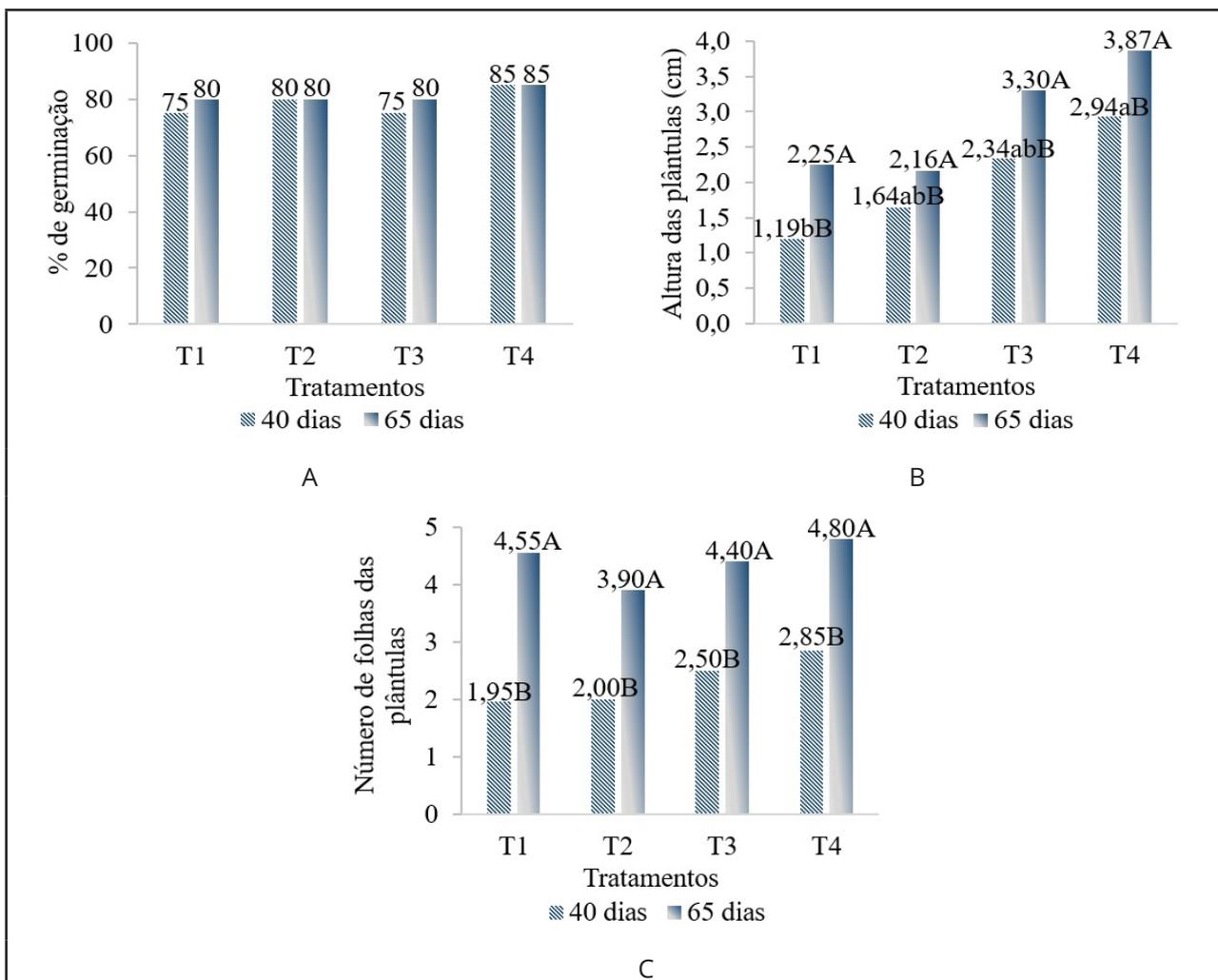
Embora não tenha sido detectada diferença significativa aos 65 dias, observa-se que o T4 (maior concentração de GA₃) obteve as maiores médias absolutas para todos os parâmetros quantificados (Figura 3). Waldow *et al.* (2013) também obtiveram a maior porcentagem de germinação (80%) com a maior concentração de GA₃ testada (23,12 µM) para embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Arecaceae). Do mesmo modo, Pádua *et al.* (2014) verificaram a maior altura (6,2 cm) na maior concentração de GA₃ (20,23 µM) em plântulas de *Elaeis guineensis* (Arecaceae) obtidas de embriões zigóticos.

Todavia, é importante salientar que plântulas muito estioladas tendem a se tornar mais frágeis (SELEGUINI *et al.*, 2013), não sendo recomendada, portanto, a utilização de altas concentrações de giberelina. Dessa forma, considerando que o meio de cultura basal (T1) também apresentou bons índices de germinação e desenvolvimento (Figura 3), este pode ser utilizado de forma eficiente para o estabelecimento *in vitro* de *Raulinoa echinata* através de embriões zigóticos imaturos.

Além disso, tendo em vista as altas taxas de germinação obtidas, uma alternativa para a conservação *in vitro* de *Raulinoa echinata* é a criopreservação dos seus embriões zigóticos. Desse modo, os futuros experimentos que visem a conservação da espécie

devem, possivelmente, procurar estabelecer um protocolo de criopreservação, o qual permita a obtenção de altas taxas de regeneração destes embriões *in vitro* após o congelamento.

Figura 3 – Porcentagem de germinação (A), altura (B) e número de folhas (C) de embriões zigóticos imaturos de *Raulinoa echinata* em resposta a concentrações de GA₃ no meio de cultura MS, após 40 e 65 dias de cultivo



Fonte: Autores (2021)

Em que: T1 = basal; T2 = 11,56 μM de GA₃; T3 = 23,12 μM de GA₃; T4 = 34,68 μM de GA₃. Os dados de porcentagem de germinação foram submetidos ao Teste do Qui-Quadrado (χ^2), e os demais dados foram submetidos à ANOVA e ao Teste de Student Newman Keuls (SNK). A comparação de médias entre os períodos de avaliação foi realizada através do Teste *t* pareado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade; as letras minúsculas referem-se à comparação entre os tratamentos, para o mesmo período de avaliação; as letras maiúsculas referem-se à comparação entre os períodos de avaliação, para o mesmo tratamento.

4 CONCLUSÕES

As metodologias propostas para a assepsia das sementes mostraram-se satisfatórias;

Os diferentes tempos de embebição das sementes em GA₃ não promoveram a germinação *in vitro*;

A ausência de germinação das sementes se deve, muito provavelmente, à presença de algum inibidor de crescimento no endosperma da espécie;

O meio de cultura MS sem reguladores de crescimento mostrou-se eficiente para a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos imaturos da espécie;

O futuro estabelecimento de um protocolo de criopreservação para os embriões zigóticos da espécie mostra-se promissor para a conservação *ex situ*;

Novos estudos são necessários a fim de verificar a possível inibição da germinação *in vitro* por parte do endosperma da espécie.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, B. K. *et al.* Methods of asepsis for *in vitro* establishment and germination of *Eucalyptus grandis*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 2, n. 3, p. 7-13, aug. 2011.

AYRES, M. *et al.* **Bioestat Versão 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT/IDSM/CNPq, 2007. 364 p.

BÁRBARA, E. P. S. *et al.* Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia**, Paraíba, v. 9, n. 2, p. 91-96, mai. 2015.

BITTENCOURT, R. **Plano de Manejo da Unidade de Conservação com propósito específico de proteção da *Raulinoa echinata***: Levantamento da distribuição de agrupamentos de *Raulinoa echinata* e caracterização da situação de conservação dos ambientes ciliares. [s.l]: CESAP - Consórcio Empresarial Salto Pilão, 2010. 27 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014. A ministra de Estado do Meio Ambiente resolve reconhecer como espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção aquelas constantes da “Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção” - Lista, conforme Anexo à presente Portaria, que inclui o grau de risco de extinção de cada espécie. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, dez. 2014. Disponível em: http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf. Acesso em: 30 mar. 2017.

BRAUN, H. *et al.* Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 539-546, jul./set. 2010.

CARIMI, F.; PASQUALE, F. de; PUGLIA, A. M. *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L., and their detection based on RFLP analysis. **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, n. 3, p. 261-266, 1998.

CHAGAS, E. A. *et al.* Cultivo de embriões imaturos de citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1125-1131, nov./dez. 2005.

COWAN, R. S.; SMITH, L. B. Rutáceas. In: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1973, p. 47-51.

DAROSCI, A. A.; PAULILO, M. T. S. Ecophysiological aspects of the seed and seedling of *Raulinoa echinata* (Rutaceae), a species endemic to the riparian forests of Itajaí valley, SC, Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 2, p. 273-281, 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FONSECA, P. T. *et al.* Resposta morfogênica de embriões zigóticos de *Erythrina velutina* Willd: (Leguminosae) cultivados *in vitro*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 5, p. 605-611, set./out. 2014.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, p.371-393.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2012. 275 p.

KURT, S.; ULGER, S. Production of Common Sour Orange × Carrizo Citrange Hybrids Using Embryo Rescue. **International Journal of Fruit Science**, [s.l.], v. 14, p. 42-48, 2014.

LENCINA, K. H. *et al.* Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grápia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 1025-1030, jun. 2014.

MENDES, R. de C. *et al.* Effect of mechanical treatments on *in vitro* germination of citrus seeds. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 5, p. 445-449, set./out. 2008.

MORAES, C. F. de *et al.* Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 64-69, jan./mar. 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAYAK, R.; PATEL, D.; SUTHAR, R. S. *In vitro* seed germination and propagation of kagdi lemon (*Citrus limon* L.). **Journal of Global Agriculture and Ecology**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 130-134, jun. 2015.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out./dez. 2013.

PÁDUA, M. S. S. *et al.* *In vitro* development and acclimatization of dendezeiro (*Elaeis guineensis*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 6, p. 1095-1102, 2014.

PAIVA NETO, V. B. *et al.* Ação inibitória do endosperma na germinação *in vitro* de embrião zigótico de pinhão manso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 433-438, mar. 2014.

PILATTI, F. K. *et al.* *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, [s.l.], v. 47, p. 82-98, 2011.

ROSSI, E.; SARTORETTO, L. M. Propagação *in vitro* da farinha-seca. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 45-52, jan./mar. 2013.

SELEGUINI, A. *et al.* Estratégias para produção de mudas de tomateiro utilizando paclobutrazol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 539-548, mar./abr. 2013.

SOUZA, R. A. V. de *et al.* Efeito da luz na germinação *in vitro* de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, p. 299-304, mai./jun. 2012.

SOUZA, L. S. de *et al.* Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 691-697, set. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

WALDOW, D. A. G. *et al.* *In vitro* culture of zygotic embryos of *Butia eriospatha*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 2179-2188, set./out. 2013.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2013. 279 p.

Contribuição de Autoria

1 – Luana Tiara Hoffmann

Engenheira Florestal, Ma.

<https://orcid.org/0000-0001-9922-7712> • luanatiara.hoffmann@gmail.com

Contribuição: Conceituação, Curadoria de dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia, Administração do projeto, Supervisão, Validação, Visualização de dados (tabela, gráfico), Escrita – primeira redação, Escrita – revisão e edição

2 – Ricardo Bittencourt

Engenheiro Agrônomo, Dr.

<https://orcid.org/0000-0002-6609-3372> • ricbittencourt@furb.br

Contribuição: Conceituação, Análise Formal, Obtenção de financiamento, Metodologia, Administração do projeto, Recursos, Supervisão, Validação, Visualização de dados (gráfico), Escrita – primeira redação

3 – Iasmin Tassi Grott

Licenciada em Ciências Biológicas, Mestranda em Engenharia Florestal

<https://orcid.org/0000-0002-4412-780X> • iasmintg@gmail.com

Contribuição: Investigação, Escrita – revisão e edição

4 – Carmem Lúcia Sperlich

Bióloga, Mestranda em Biologia Celular e do Desenvolvimento

<https://orcid.org/0000-0001-7518-2812> • carmem.sperlich@gmail.com

Contribuição: Investigação, Escrita – revisão e edição

Como citar este artigo

Hoffmann, L. T.; Bittencourt, R.; Sperlich, C. L.; Grott, I. T. Germinação *in vitro* de *Raulinoa echinata* R. S. Cowan (Rutaceae): sementes e embriões zigóticos. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 1187-1204, 2022. DOI 10.5902/1980509837874. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509837874>.