

Estado de desenvolvimento do embrião durante a germinação de sementes de *Corema album*

Ana Lisboa^{1,2}, Cândida S. Trindade², Teresa Valdiviesso², Cristina M. Oliveira¹, Filomena Nóbrega² & Pedro B. Oliveira²

¹LEAF, ISA, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa

²Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., UEIS-SAFSV, Av. da República, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras

Resumo

A espécie *Corema album* (L.), vulgarmente designada por camarinha, é endémica das dunas da costa atlântica da Península Ibérica, inserida na subfamília Ericoideae, na família Ericaceae e na ordem Ericales. *C. album* é um pequeno arbusto dióico, perene, que pode atingir até um metro de altura.

Uma vez documentado que a germinação da espécie *C. album* é difícil em condições controladas, pretende-se avaliar o efeito de pré-tratamentos na germinação de sementes de 4 génotipos distintos, em condições controladas de temperatura. Os pré-tratamentos baseiam-se na escarificação química por emersão em ácido sulfúrico concentrado ou apenas embebidas em água destilada. Foram estabelecidas oito amostras (com quatro repetições cada), sujeitas a diferentes condições de fotoperíodo e temperatura. Das oito amostras, quatro permaneceram em câmara de germinação, à temperatura de 15/25°C e a fotoperíodo com alternância entre 16/8 horas dia e escuro. Por sua vez, as outras quatro ficaram expostas durante 12 semanas em câmara frigorífica à temperatura de 4/5°C, sem luz. O ensaio teve uma duração de 36 semanas.

Ao longo da germinação, foram retiradas amostras em diferentes momentos para análise histológica. Fizeram-se cortes histológicos dos embriões, para analisar o estado de desenvolvimento dos mesmos durante as diversas fases do ensaio. Analisando a morfologia e anatomia dos embriões, verificou-se que há um desenvolvimento cotiledonar ao longo do tempo. Foi também efetuado um segundo ensaio, em que as sementes de *C. album* de três génotipos diferentes, foram expostas a diferentes temperaturas (40, 60, 15/25, e 4/5°C), humidade e fotoperíodo, durante o ensaio. Os resultados preliminares indicam que as temperaturas baixas favorecem a quebra da dormência enquanto as temperaturas elevadas (acima dos 40°C) são desfavoráveis.

Palavras-chave: *Corema album*, escarificação química, germinação das sementes, embrião.

Abstract

Corema album, commonly known as camarinha, is endemic to the sand dunes of the Atlantic coast of the Iberian Peninsula. This species is inserted in Ericoideae subfamily, the Ericaceae family and the order Ericales. *C. album* is a small dioecious perennial shrub, which can reach up to a meter high.

Once documented that the germination of *C. album* species is difficult in controlled conditions, the objective of the present research was to evaluate the effect of pre-treatment on the germination of four distinct genotypes under controlled temperature conditions. The pre-treatments were based on chemical scarification by immersion in concentrated sulphuric acid or just soaked in distilled water. Eight

samples were established (with four replications each), subject to different conditions of temperature and photoperiod. Of the eight samples, four remained in a germination chamber at a temperature of 15/25 °C and photoperiod with alternating 16/8 hours day and night. The other four were exposed for 12 weeks in a cold chamber at 4/5 °C without light. The trial period was 36 weeks.

Throughout germination, samples were taken at different time points for histological analysis. Histological sections of embryos were done to the state of their development during the various stages of the experiment. This analysis showed a cotyledonal development. It was also performed a second test, where the seeds of the three different genotypes were exposed to different temperatures (40, 60, 15/25, and 4/5 °C), humidity and photoperiod during the test. Preliminary results indicate that low temperature were favourable to germination whereas high temperatures were adverse.

Keywords: *Corema album*, chemical scarification, germination of seeds, embryo

Introdução

A espécie *Corema album* é uma de duas espécies pertencente ao género *Corema*, sendo *Corema conradii* (Torr.) Torr. ex Loudon, a outra espécie, endémica da costa Noroeste dos Estados Unidos da América (Oliveira e Dale, 2012).

A possibilidade da *Corema album* ser integrada no mercado dos pequenos frutos é de elevada potencialidade, uma vez que se inclui sob o nome genérico de pequenos frutos todos os frutos pequenos de tamanho (“small fruits”) que possuem polpa branda, normalmente de forma redonda que são para ser consumidos em fresco, independentemente da estrutura do fruto (Oliveira e Dale, 2012). Estudos desenvolvidos anteriormente demonstraram que existe uma variação na percentagem de germinação de sementes provenientes de locais diferentes, mas do mesmo ano de colheita, bem como de sementes da mesma localização, mas anos diferentes (Santos, 2013). O presente ensaio está a ser realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.) em Oeiras e tem como objetivo principal a otimização de estudos anteriores relativos à germinação de sementes de *Corema album* e respetivos estádios de maturação do embrião com vista ao melhoramento da espécie.

A semente desenvolve-se a partir de um conjunto de modificações fisiológicas e morfológicas que terminam na formação da semente (Hartmann, 1996). O embrião da semente diferencia-se a partir do zigoto e tem como estruturas principais o eixo embrionário e cotilédones. No seu desenvolvimento a redução do teor em água no final da ontogénese das sementes ortodoxas força a entrada em quiescência do embrião e nos casos em que uma combinação apropriada de fatores ambientais não chega para iniciar a germinação diz-se então que as sementes são dormentes (Aguiar, 2012). Esta dormência pode denominar-se primária ou secundária, consoante o momento em que é iniciada.

Material e métodos

As bagas de camarinha do presente estudo, provenientes de arbustos de *C. album*, foram colhidas no litoral da Aldeia do Meco. Selecionaram-se 4 genótipos (AM8, AM11, AM17, AM19), de acordo com as características mais desejadas para o fruto (bom calibre, bom sabor, fáceis de colher).

Para avaliar os efeitos do pré-tratamento de escarificação e estratificação foi usado um total de 3200 sementes, 800 sementes de cada genótipo (AM8, AM11, AM17 e AM19), divididas em 8 modalidades distintas (T0, T1, F1, F2, G1, G2 e G3), (Quadro 1).

As sementes de quatro lotes do ensaio (F1 + F2 + G3 + G4) foram sujeitas a uma escarificação química, sendo colocadas em ácido sulfúrico concentrado (95-97%), num banho de gelo, durante 30 minutos, numa hote química. Seguidamente são lavadas em água corrente durante uma hora. Posteriormente, as sementes foram mantidas em contato com hipoclorito de cálcio (3 g/L) completamente dissolvido em água com hidróxido de cálcio (3 g/L) durante 30 minutos. As sementes dos restantes quatro lotes do ensaio 1 (T0 + T1 + G1 + G2) não sofreram qualquer tratamento de escarificação química.

As sementes dos lotes G1, G2, G3 e G4 foram submetidas a tratamento com uma solução de ácido giberélico (1000 ppm), > 93% de pureza (Duchefa®), durante 24 horas na ausência de luz a 19 de maio (24 semanas após o início do ensaio).

No decorrer no ensaio 1, foram recolhidas amostras de sementes, em diferentes estádios de desenvolvimento do embrião, para análise histológica. Neste ensaio, recorreu-se a várias metodologias até se conseguir otimizar o processo de corte. A metodologia otimizada dividiu-se em 5 grandes grupos: recolha das sementes, fixação, desidratação clarificação e inclusão.

i) Preparação de sementes

As sementes foram abertas e retirados os embriões, para de seguida proceder à sua hidratação, durante 48 horas. Em todos os procedimentos seguintes utilizou-se vácuo durante 5/7 segundos em cada fase do protocolo histológico.

ii) Fixação

Utilizou-se o fixador FAA (formaldeído, ácido acético glacial, álcool 70%) na proporção 1:1:18. As sementes mantiveram-se durante 48 horas em fixador e para assegurar a eficiente penetração do fixador, utilizou-se o vácuo. Após fixação, as sementes foram desidratadas. A duração da fixação foi igual para todas as sementes, uma vez que têm todas dimensões semelhantes.

iii) Desidratação

Utilizou-se a seguinte serie de desidratação, constituída por crescentes concentrações de etanol desde os 70% ao absoluto.

- Etanol 70%: 1 hora
- Etanol 80%: 1 hora
- Etanol 96%: 1 hora
- Etanol 100%: 1 hora

iv) Clarificação

Neste protocolo, após várias pesquisas, decidiu-se utilizar o clorofórmio como substância de clarificação, uma vez que degrada de uma forma mais rápida os lípidos contidos na semente de camarinha (adaptado de Willard e Rowlee, 1890).

v) Inclusão

Após a clarificação, emergiu-se o material já desidratado na parafina líquida. De seguida, para assegurar a infiltração de parafina nas sementes, colocam-se os frascos numa estufa a 60°C, durante, pelo menos 16 horas.

Os cortes de espessura 7 µm efetuaram-se num micrótomo rotativo da Leica RM 2255, com lamínas descartáveis Leica Premium Surgipath®DB80 series.

Após os cortes histológicos e desparafinação dos mesmos, torna-se necessário corar os cortes de forma a ser mais fácil a interpretação das imagens obtidas por microscopia ótica.

Depois de retirados os cortes de etanol a 96% e secos à temperatura ambiente, procedeu-se á elaboração das montagens permanentes, para observação no microscópio ótico, usando resina como meio de montagem entre a lâmina e a lamela.

Por fim, procedeu-se à observação dos cortes obtidos em lupa (Leica DMA 1000). A aquisição da imagem foi realizada com o programa Leica Application Suite (LAS) version 4.4.0.

O ensaio 2 foi desenvolvido com o objetivo de testar a germinação das sementes sem escarificação química e avaliar o impacto da temperatura na sua germinação. Utilizaram-se os mesmos genótipos que no ensaio 1 (Quadro 2).

Resultados e discussão

Os ensaios ainda se encontram em execução, no entanto alguns resultados preliminares podem ser apresentados.

Aos 288 dias após sementeira em câmara de germinação verificou-se que o tratamento mais eficaz, no ensaio 1, para o genótipo AM8, foi o G1 (sem escarificação e com GA₃) com 53% de germinação. Nos restantes genótipos, o tratamento T0 foi o mais eficaz, com 32% de sementes germinadas no genótipo AM11, 26% no genótipo AM17 e 38% em AM19 (Fig. 1). Até ao momento, a taxa de germinação, em todos os genótipos do ensaio 1 é reduzida, o que poderá estar relacionado com a imaturidade do embrião, ou seja, o embrião não se encontra completamente desenvolvido quando a semente se desprende da planta-mãe. Quando as sementes são colocadas para germinar, a germinação fica estagnada até que o embrião complete a diferenciação e crescimento (Propinigis, 1985).

Analisando a morfologia e anatomia dos embriões, verificou-se que há um desenvolvimento cotiledonar ao longo do tempo (Fig.2 e 3). Este desenvolvimento está, provavelmente, relacionado com a dormência da semente antes da aplicação de GA₃ (Propinigis, 1985).

As giberelinas desempenham papel importante no ciclo de vida dos vegetais, atuando na germinação sementes, quebra de dormência, no crescimento e desenvolvimento das plantas. A dormência pode ser o resultado do balanço hormonal entre promotores e inibidores de crescimento, a quebra de dormência e germinação pode estar relacionadas com a atuação do ácido giberélico.

Relativamente ao ensaio 2, neste momento, a taxa de germinação radicular para Z0, Z1, Z2 e Z3 encontra-se mais elevada do que para o ensaio 1, com previsões de aumento. Este fato vem demonstrar que as variações de temperatura tiveram influência na quebra de dormência de *C. album* e conseqüente germinação radicular. A permanência do ensaio durante, pelo menos, 4 semanas a baixas temperaturas (5°C) e antes do ensaio, durante 5 meses à mesma temperatura, levou provavelmente, à quebra da dormência e conseqüente desenvolvimento dos embriões das sementes.

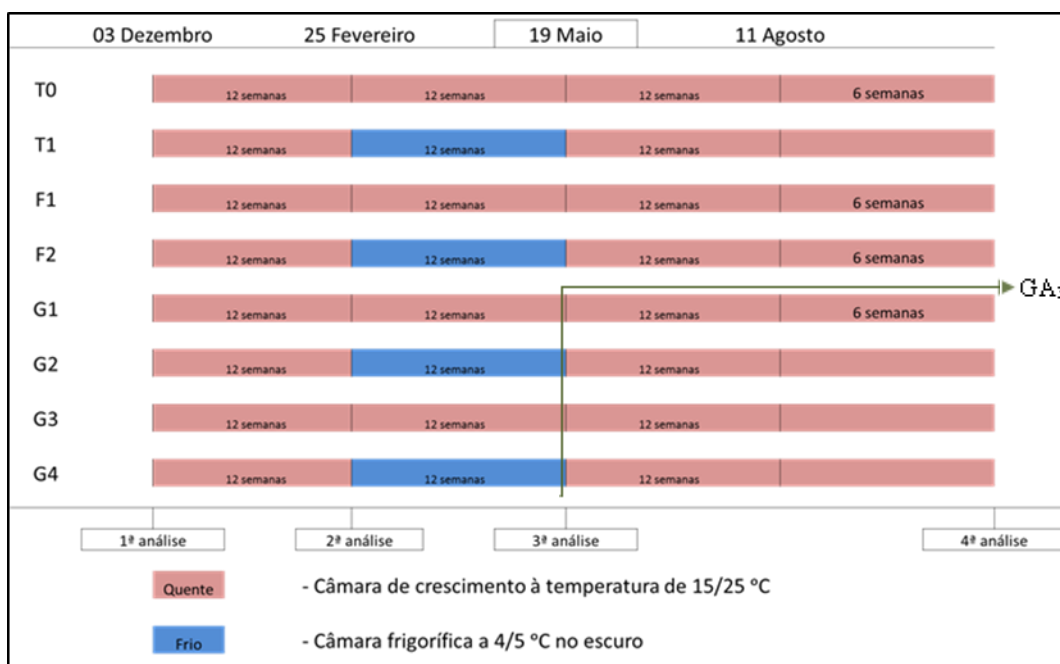
Nas restantes modalidades do ensaio 2 (X0, X1, X2, X3), a taxa de germinação radicular encontra-se nos 0%, que nos leva a concluir que, possivelmente, temperaturas acima de 40°C são desfavoráveis.

Referências

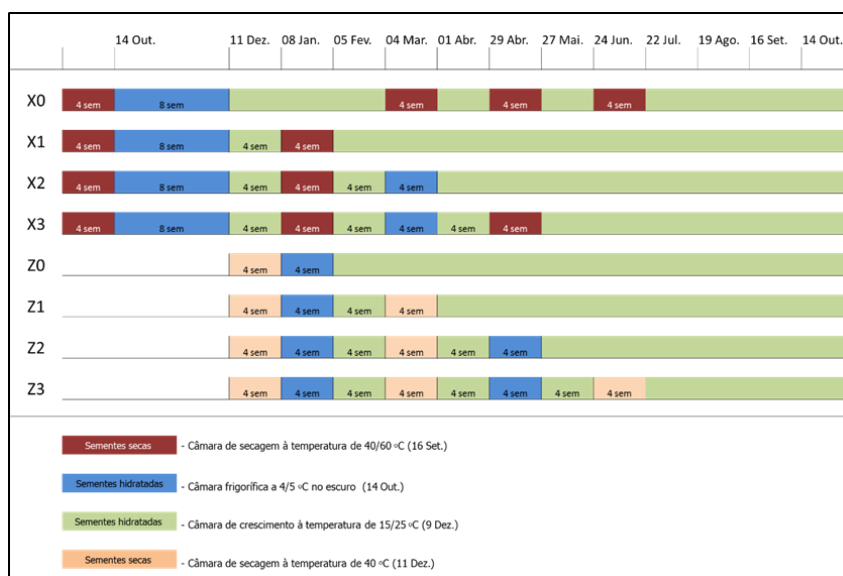
- Aguiar, C. 2012. Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente: Reprodução e Evolução. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, Vol. 2. 85p.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. and Geneve, R.L. 1996. Plant Propagation: Principles and Practices. 6ª ed. Prentice Hall, 770p.
- Oliveira, P.B. and Dale, A. 2012. *Corema album* (L.) D. Don, the white crowberry a new crop. Journal of Berry Research 2: 122-133.
- Propinigis, F. 1985. Fisiologia da semente. 2.ed.- Brasília, 87p;

Santos, M. 2013. Efeito de pré-tratamentos na germinação de sementes da espécie *Corema album*. Tese de mestrado. Lisboa, Instituto Superior de Agronomia
 Willard W. R. 1890. Proceedings of the American Society of Microscopists 12 pp. 208-252, Thirteenth Annual Meeting, Ithaca, New York.

Quadros e Figuras



Quadro 1 – Quadro esquemático dos diferentes tratamentos ao longo do ensaio.



Quadro 2 - Quadro esquemático dos diferentes tratamentos ao longo do ensaio.

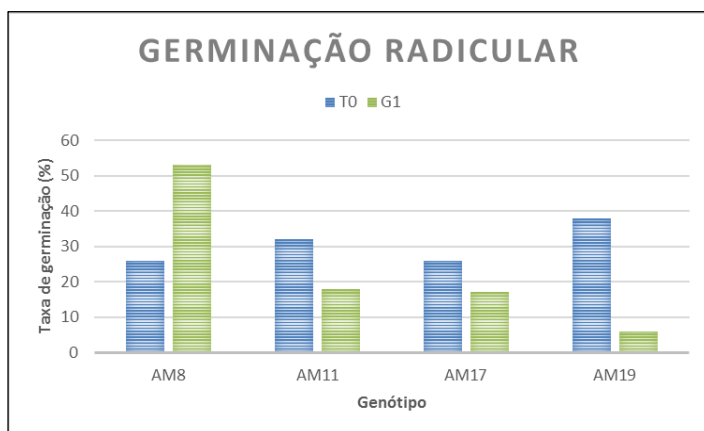


Figura 1- Germinação radicular em duas modalidades (T0 e G1) do ensaio 1.

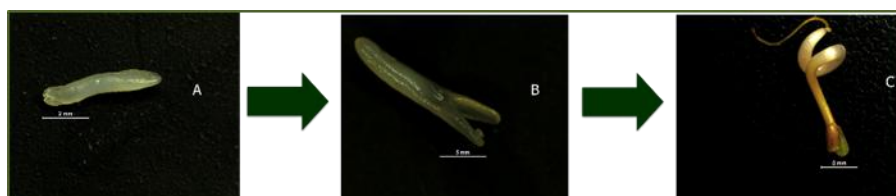


Figura 2 - Desenvolvimento embrionário do genótipo AM19 ao longo do ensaio. A - Embrião no início do ensaio, com cotilédones pouco desenvolvidos (25 jan.); B - Embrião sujeito a 2 variações de temperatura, com cotilédones num estágio mais avançado de desenvolvimento (19 mai.); C - Embrião sujeito a 3 variações de temperaturas, já com emissão de radícula (22 set.).

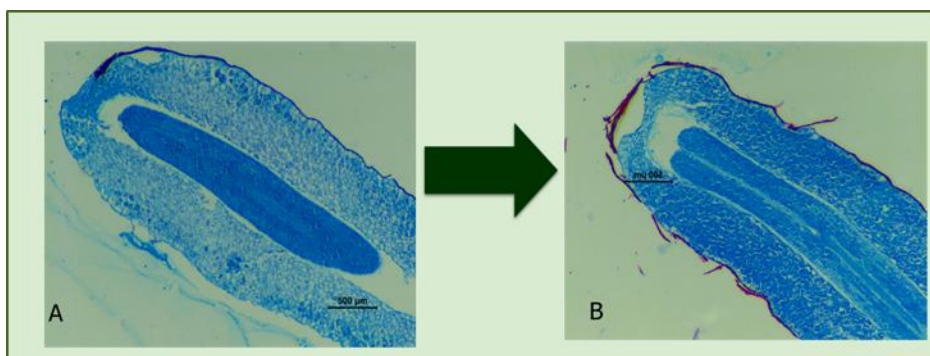


Figura 3 - Cortes histológicos de uma amostra sementes de *Corema album* colhida na mesma data (22 ago.) mas em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário. A - Embrião no início do desenvolvimento cotiledonar; B - Embrião com cotilédones formados.