



JOSIANE CARVALHO FONSECA SILVA

**ÁCIDO GIBERÉLICO NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA
EM SEMENTES DE RAVENALA**

LAVRAS – MG

2020

JOSIANE CARVALHO FONSECA SILVA

**ÁCIDO GIBERÉLICO NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA EM SEMENTES DE
RAVENALA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

Orientadora

Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva

Coorientador

LAVRAS - MG

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Josiane Carvalho Fonseca.

Ácido Giberélico na superação da dormência em sementes de
ravenala / Josiane Carvalho Fonseca Silva. - 2020.

48 p.

Orientador(a): Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Coorientador(a): Diogo Pedrosa Corrêa da Silva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Árvore-do-viajante. 2. Germinação. 3. Ácido Giberélico. I.
Paiva, Patrícia Duarte de Oliveira. II. Silva, Diogo Pedrosa Corrêa
da. III. Título.

JOSIANE CARVALHO FONSECA SILVA

**ÁCIDO GIBERÉLICO NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA EM SEMENTES DE
RAVENALA**

GIBERELIC ACID IN OVERCOMING DORMANCE IN RAVENALA SEEDS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de novembro de 2020.
Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva UFLA
Dr. Diogo Pedrosa Corrêa da Silva UFLA
Dr. Luciano Coutinho Silva UFPB

Prof.^a Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva
Orientadora

**LAVRAS - MG
2020**

Ao meu esposo Wellington e meus filhos Davi e Luísa pelo apoio, carinho e amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar este trabalho, por fortalecer a minha fé e renovar sempre as minhas forças.

À minha mãe Selma (in memoriam) por ter plantado em mim a vontade de correr atrás dos meus sonhos.

A meu pai Luiz pelo apoio e por me ensinar que uma das maiores riquezas da vida é o conhecimento adquirido.

A meu esposo Wellington pelo companheirismo, apoio e por sempre acreditar em mim, até quando eu mesma descreditei.

Aos meus filhos Davi e Luísa por sempre me apoiarem e, mesmo sem entender muitas vezes, não cobrar a minha presença física nos momentos dedicados a esse trabalho.

À minha irmã Karol e meu cunhado Rony por estarem sempre ao meu lado e incentivar a buscar meus objetivos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Setor de Fisiologia Vegetal por viabilizar a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva por todo apoio, atenção e confiança.

Ao professor Renato Paiva por disponibilizar o espaço para realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Diogo pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e Núcleo de Estudos de Paisagismo e Floricultura, especialmente à professora Michele por toda ajuda, troca de conhecimentos, apoio e companheirismo.

Aos amigos e parceiros de pós-graduação Carol, Afonso, Letícia, Bruna, Israela, e Mayara pela ajuda durante os experimentos e discussões sobre o trabalho.

Aos meus amigos pelo apoio, tornando essa caminhada mais leve.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições e disponibilidade.

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

Muito Obrigada!

RESUMO

Ravenala (*Ravenala madagascariensis*) também conhecida como árvore-do-viajante, é uma espécie tropical utilizada como planta ornamental, para cultivo em jardins. A propagação é realizada por divisão de touceiras ou por sementes, mas essas apresentam dormência e lento desenvolvimento. Dessa forma, objetivou-se a superação da dormência de sementes de ravenala utilizando ácido giberélico (GA₃) e assim definir um protocolo de germinação *in vitro* e otimizar o processo de germinação *ex vitro*. As sementes foram submetidas a um teste de assepsia, sendo imersas por 15, 30 e 45 minutos em hipoclorito de sódio (NaOCL) a 2,5%. Para a superação de dormência foi analisado a aplicação de GA₃ ao meio de cultivo e no processo de embebição das sementes. As sementes foram escarificadas em ácido sulfúrico por 10 minutos e então inoculadas em meio MS suplementado por 0, 10, 20, 40 ou 80 µM de GA₃. Para o processo de embebição, após a escarificação em ácido sulfúrico por 10 minutos, as sementes foram embebidas em solução com diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) por 24 e 48 horas e inoculadas em meio MS para o cultivo *in vitro* ou foram colocadas em tubetes contendo substrato comercial Tropstrato[®] e Vermiculita para o cultivo *ex vitro*. Também foram determinadas as atividades da α-amilase, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica nas sementes embebidas. O resultado do teste de assepsia demonstrou que o tempo de 15 minutos de imersão é recomendado para a desinfestação de sementes dessa espécie. A adição de 20 µM de GA₃ ao meio de cultivo promoveu maior porcentagem de germinação (95%) em relação às demais concentrações. Nos demais parâmetros de crescimento a concentração de 20 µM também apresentou resultados significativos. A embebição das sementes por 24 ou 48 horas promoveu uma germinação *in vitro* média de 80%. No entanto, não houve diferença significativa na porcentagem de germinação entre sementes embebidas em solução com ou sem GA₃. Na germinação extra vitro, a embebição das sementes em solução com 250 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹ de GA₃ promoveram a maior porcentagem de germinação (25%) em 24 e 48h respectivamente. Portanto, de acordo com nossos resultados, o uso de meio de cultura suplementado com 20 µM de GA₃ e embebição das sementes por 24 a 48 horas independente do uso de GA₃ é recomendado para quebrar a dormência das sementes de Ravenala e otimizar a germinação *in vitro*.

Palavras-chave: Árvore-do-viajante. Germinação. GA₃.

ABSTRACT

Ravenala (*Ravenala madagascariensis*), also known as the traveler's tree, is a tropical plant species commonly used for garden ornamentation. Since the seeds of this tree present dormancy and slow development, the tree is more vegetatively propagated by division and replanting of clumps. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of gibberellic acid (GA₃) on breaking the dormancy of ravenala seeds in order to develop an efficient *in vitro* germination protocol and to optimize the *ex vitro* germination process. The seeds were initially immersed for 15, 30 and 45 minutes in 2.5% sodium hypochlorite (NaOCL). The effect of GA₃ on breaking seed dormancy was analyzed both by applying acid to the culture medium and by applying it during the process of seed imbibition. Ravenala seeds were scarified in sulfuric acid for 10 minutes and then they were inoculated in MS medium supplemented with 0, 10, 20, 40 or 80 μM of GA₃. For the imbibition process, after scarification in sulfuric acid for 10 minutes, the seeds were imbibed in solution with different GA₃ concentrations (0, 250, 500, 750, and 1000 mg L⁻¹). After 24 and 48 hours the seeds were inoculated in MS medium for *in vitro* germination or they were placed in tubes containing commercial substrate Tropstrato[®] and Vermiculite for *ex vitro* germination. Hydrogen peroxide (H₂O₂), lipid peroxidation, as well as α-amylase activities of embedded seeds were also determined. Our result showed that seeds were successfully disinfested after 15 minutes immersed in NaOCL. The culture medium supplemented with 20 μM of GA₃ promoted the higher percentage germination (95%) compared with the other tested concentrations. The GA₃ also provided significant results for other plant growth parameters. Seed imbibition for 24 or 48 hours promoted an *in vitro* germination average of 80%. However, there was no significant difference on germination percentage between seeds embedded in solution with or without GA₃. In *extra vitro* germination the seed imbibition in solution with 250 mg L⁻¹ and 1000 mg L⁻¹ of GA₃ promoted the higher germination percentage (25%) in 24 and 48h respectively. Therefore, according to our results the use of culture medium supplemented with 20 μM of GA₃ and seed imbibition for 24 to 48 hours regardless the use of GA₃ is recommended to break the dormancy of ravenala seeds and to optimize the *in vitro* germination.

Keywords: Traveler's tree. Germination. GA₃.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Ravenala	11
2.2 Propagação de Ravenala	12
2.2.1 Propagação Vegetativa.....	12
2.2.2 Propagação Seminal	13
2.2.3 Limitações: Dormência	13
2.2.4 Quebra de dormência.....	14
2.2.4.1 Física	14
2.2.4.2 Química.....	15
2.3 Germinação de sementes de ravenala	16
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2: ÁCIDO GIBERÉLICO NA GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> E <i>ex vitro</i> DE RAVENALA	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Obtenção do material vegetal	24
2.2 Efeito do ácido giberélico na germinação <i>in vitro</i> de ravenala	24
2.2.1 Assepsia de sementes de ravenala	24
2.2.2 Superação da dormência com diferentes concentrações de GA ₃ em meio de cultura.....	25
2.2.3 Superação da dormência com embebição em diferentes concentrações de GA ₃	25
2.3 Efeito do ácido giberélico na germinação <i>ex vitro</i> de ravenala.....	26
2.4 Determinação da atividade da α -amilase.....	26
2.5 Determinação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e peroxidação lipídica.....	27
2.6 Análises estatísticas.....	28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1 Efeito do ácido giberélico na germinação de ravenala e crescimento das plântulas <i>in vitro</i>	28
3.1.1 Assepsia de sementes de ravenala	28

3.1.2	Superação da dormência com diferentes concentrações de GA ₃ em meio de cultura.....	28
3.1.3	Superação da dormência com embebição em diferentes concentrações de GA ₃ <i>in vitro</i>	32
3.2	Efeito do ácido giberélico na germinação de ravenala crescimento das plântulas <i>ex vitro</i>	37
3.2.1	Superação da dormência com embebição em diferentes concentrações de GA ₃ <i>ex vitro</i>	37
3.3	Determinação da atividade da α -amilase.....	39
3.4	Determinação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e peroxidação lipídica.....	41
4	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS.....	44

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ravenala ou árvore-do-viajante (*Ravenala madagascariensis* Sonnerat), família Strelitziaceae, é uma espécie tropical originária de Madagascar, utilizada como planta ornamental em jardins, podendo suas flores também ser utilizadas em arranjos florais (RAMIARANTSOA, et al., 2014; SUROOWAN; MAHOMOODALLY, 2020).

A propagação de ravenala pode ser realizada por divisão e replantio de touceiras ou por sementes. As mudas propagadas por divisão de touceiras iniciam seu florescimento após três anos, além de resultar em reduzido número de mudas (HELAL; EISA, 2008; PAIVA; ALMEIDA, 2012). A propagação via sementes é possível, porém estas plantas apresentam dormência química em consequência da presença de inibidor da germinação, além de dormência física por consequência da impermeabilidade do tegumento e rigidez do endosperma (MCLENDON, 2005; EDWARD et al., 2006; PAIVA; ALMEIDA, 2012). Em consequência, a germinação é tardia, demandando mais de seis meses para iniciar (HELAL; EISA, 2008).

Os mecanismos que determinam a dormência dificilmente poderão ser identificados de forma isolada, pois podem estar altamente relacionados, dessa forma, utilizar os métodos de quebra de dormência de forma integrada pode ser efetivo (MARCOS FILHO, 2015). Para a superação da dormência existem alguns métodos como choque térmico, escarificação e giberelina exógena (HELAL; EISA, 2008; TORRES et al., 2013).

A escarificação por meio de ácido sulfúrico consiste em manter as sementes em contato com essa solução durante 5 a 10 minutos. Esse método possibilita alterações mecânicas ou amolecimento do tegumento de sementes para torná-las permeáveis à água e aos gases (MARCOS FILHO, 2015; ABD AZIZ et al., 2018).

Outro método utilizado para quebra de dormência de sementes é o uso de giberelina, a qual está envolvida na regulação do processo germinativo (TAIZ et al., 2017). As giberelinas estão envolvidas na ativação do crescimento embrionário, enfraquecendo o revestimento de sementes e as camadas de endosperma que circundam o embrião e que restringem seu crescimento, além da mobilização de reservas de energia (TUAN et al., 2019).

O ácido giberélico (GA₃) é uma das giberelinas, entre as diversas existentes, que apresenta a maior utilização, sendo amplamente empregado na cultura de tecidos de plantas (LAVAGNINI et al., 2014; SINGH et al., 2016). A propagação via cultura de tecidos de

plantas aliada a estas técnicas de quebra de dormência, pode ser uma alternativa viável para a germinação de ravenala. Visto que, a cultura de tecidos permite a propagação de espécies com dificuldade de germinação, sendo possível obter elevado número de plantas em curto período de tempo e espaço reduzido, em excelentes condições fitossanitárias (ULISSES et al., 2010; PINHAL et al., 2011).

Contudo, são poucos os estudos relatados sobre a propagação de ravenala, além de escassos os protocolos viáveis para produção comercial visto que a espécie apresenta dificuldades de germinação. Trabalhos com escarificação utilizando ácido sulfúrico, água morna e embebição com giberelina foram realizados na busca da quebra de dormência e aumentar a germinação da espécie, mas ainda são necessários mais estudos, para observar a interação entre diversos fatores, e melhorar a porcentagem de germinação dessa espécie (TORRES et al., 2013; HELAL; EISA, 2008). Entretanto, não se tem relatos de estudos com propagação *in vitro* de ravenala até o momento.

Dessa forma, sendo essa espécie uma planta com crescente apelo econômico, métodos eficientes para a superação da dormência das sementes poderão contribuir para o estabelecimento de protocolos eficientes de germinação *in vitro* e otimização da germinação *ex vitro*, permitindo assim a produção em larga escala de mudas de ravenala.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ravenala

Strelitziaceae é uma família de monocotiledôneas pertencente à ordem Zingiberales, que possui três gêneros *Strelitzia*, *Ravenala* e *Phenakospermum*, todos ocorrem em regiões tropicais ou subtropicais (CRON et al., 2012; TORRES et al., 2013).

Dentre as espécies desta família destaca-se a *Ravenala madagascariensis*, única do seu gênero, originária de Madagascar e utilizada mundialmente como planta ornamental para jardins (LORENZI, 2003; HELAL; EISA, 2008; SUROOWAN; MAHOMOODALLY, 2020). Conhecida popularmente como ravenala ou árvore-do-viajante, essa espécie pode atingir de 9 a 18 m de altura, e apresenta algumas características morfológicas marcantes como o tronco similar ao das palmeiras e folhagem em forma de leque muito distinta, que podem chegar até 3 m de comprimento (HELAL; EISA, 2008; SUROOWAN; MAHOMOODALLY, 2020). Apresenta sementes envoltas por um arilo fibroso de coloração azul, rígidas e capazes de resistir por muitos anos no solo até que surja condições favoráveis

para a germinação, e suas flores apresentam coloração branca-creme (FEELEY-HARNIK, 2001; SUROOWAN; MAHOMOODALLY, 2020) (Figura 1).

Figura 1 – Ravenala localizada no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e seu fruto com sementes.



Legenda: (A) Ravenala plantada no Câmpus da UFLA. (B) Fruto de ravenala aberto com suas sementes. (C) Sementes de ravenala com e sem arilo. Barra 1 cm.

Fonte: Do autor (2020).

Além disso, a espécie figura entre diversas outras como parte da medicina popular em diversos países (SUROOWAN; MAHOMOODALLY, 2020). Estudos comprovam o potencial medicinal de suas sementes e partes do fruto que possuem atividade antibacteriana, sendo utilizadas como anti-séptica. Podem ainda constituir fontes de agentes antibacterianos naturais e antioxidantes para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DUVALE, et al., 2020). Estudos recentes relatam ainda que o extrato etanólico das folhas de ravenala podem apresentar atividade citotóxica promissora em linhagens celulares contra o câncer pancreático, (SETHURAMAN, et al., 2020).

2.2 Propagação de Ravenala

2.2.1 Propagação Vegetativa

A ravenala pode ser propagada de forma assexual e sexual. A propagação assexuada pode ser realizada por divisão de touceiras ou através da cultura de tecidos. As mudas propagadas por divisão e replantio de touceiras iniciam seu florescimento em 3 anos, mas

produzem reduzido número de mudas (MCLENDON, 2005; EDWARD et al., 2006). Não há relatos de estudos da propagação dessa espécie por meio de cultura de tecidos, entretanto, têm-se estudos com a estrelícia espécie pertencente à mesma família, para a qual a propagação assexuada *in vitro* é caracterizada pela elevada taxa de oxidação (PAIVA et al., 2004; PAIVA; ALMEIDA, 2012; NORTH et al., 2012).

2.2.2 Propagação Seminal

Já a propagação sexuada por meio de sementes é limitada pela ocorrência de dormência (MCLENDON, 2005; EDWARD et al., 2006) o que ocasiona germinação tardia (HELAL; EISA, 2008). A germinação pode começar após 7 dias e continuar por 6 meses ou mais, influenciando também diretamente no desenvolvimento da espécie, obtendo nesse processo um número pequeno de plantas reproduzidas a partir da planta mãe (HELAL; EISA, 2008; THOMPSON; MORGAN, 2008)

2.2.3 Limitações: Dormência

Dormência é caracterizada pela incapacidade de germinação de sementes mesmo quando expostas a condições ambientais favoráveis (OLIVEIRA, 2012). Dentre os tipos de dormência, destaca-se a dormência física ou tegumentar, normalmente atribuída à presença de uma camada de células esclerenquimatosas com paredes secundárias grossas lignificadas, sendo caracterizada pela impermeabilidade do tegumento à absorção de água e gases (BASKIN; BASKIN, 2014). A dormência química definida como substâncias produzidas tanto dentro como fora da semente que, translocadas para o embrião, inibem a germinação. E em muitos casos, sementes que apresentam inibidores químicos também apresentam dormência fisiológica que está relacionada ao embrião, envolvendo na sua superação, entre outros processos, mudanças na produção e/ou na sensibilidade do tecido a substâncias de crescimento como os fitohormônios (CARDOSO, 2009). As sementes que apresentam dormência necessitam de tratamentos adicionais ou sinais para a germinação ocorrer, o tratamento dependerá do tipo de dormência que a semente possui (TAIZ et al., 2017). A dormência e a germinação das sementes em muitas plantas parecem ser controladas pelo equilíbrio dos fitohormônios giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA) (LLANES et al., 2016; SHU et al., 2016).

Em ravenala as sementes apresentam dormência química causada pela presença de um inibidor da germinação e dormência física por consequência da impermeabilidade do tegumento e rigidez do endosperma que causa ao embrião uma limitação mecânica, influenciando a germinação e o desenvolvimento dessas plantas (EDWARD et al., 2006; HELAL; EISA, 2008; PAIVA; ALMEIDA, 2012). Por esse motivo, há a necessidade de se realizar estudos buscando tratamentos eficientes para a quebra da dormência, com intuito de otimizar a produção comercial de mudas por sementes.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é considerado centro de sinalização da superação da dormência e germinação (WOJTYLA et al., 2016). A peroxidação lipídica (LIP), é uma das principais formas de deterioração das sementes, seu aumento provoca danos na membrana e gera subprodutos tóxicos (SCHWEMBER; BRADFORD, 2010; SAISANTHOSH et al., 2018). Dessa forma a determinação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica poderão também contribuir para entender melhor a quebra de dormência.

Estudos utilizando escarificação com ácido sulfúrico, embebição em água e o uso de reguladores de crescimento já foram realizados buscando otimizar a germinação de espécies dessa família, porém novos trabalhos são necessários para avaliar a interação entre diversos fatores, buscando melhores métodos para a quebra de dormência e melhorar a porcentagem de germinação (HELAL; EISA, 2008; TORRES et al., 2013; KUMAR et al., 2018).

2.2.4 Quebra de dormência

2.2.4.1 Física

Diversos métodos podem ser utilizados para a quebra de dormência física, como imersão em água quente, escarificação mecânica com lixas e química com ácidos, com o objetivo de romper as camadas de células impermeáveis do tegumento e assim permitir a entrada de água e/ou oxigênio (BEWLEY et al., 2013). Métodos para superar a dormência física buscando otimizar a germinação não devem causar prejuízos ao desempenho das sementes e desenvolvimento das plântulas. A imersão em água quente pode ser eficiente, aumentando a porcentagem de germinação, com baixo custo e processo simples (CARVALHO et al., 2019). A escarificação química, geralmente com ácido sulfúrico, pode ser um método adequado e eficaz, pois é possível escarificar um grande número de sementes ao mesmo tempo (ABD AZIZ et al., 2018). A escarificação em ácido sulfúrico já demonstrou ser eficiente para a quebra da dormência física dessa espécie (TORRES et al., 2013).

2.2.4.2 Química

A aplicação exógena de giberelina pode aliviar vários tipos de dormência em sementes, incluindo a dormência fisiológica (TAIZ et al., 2017). A giberelina (GA) é um fitohormônio essencial que controla muitos aspectos do desenvolvimento das plantas, promovendo a germinação de sementes em muitas espécies, estão envolvidas na ativação do crescimento embrionário, enfraquecendo o revestimento de sementes e as camadas de endosperma que circundam o embrião e restringem seu crescimento, além de mobilizar reservas de energia (TAIZ et al., 2017; REGO et al., 2018). Além disso, as giberelinas também estão envolvidas com a síntese de proteínas e RNA durante a germinação, com o aumento da atividade de enzimas que são responsáveis por hidrolisar substâncias do tecido de reserva da semente, que após assimilação formarão aminoácidos, açúcares e demais substâncias destinadas ao eixo embrionário, estimulando o seu crescimento e alongamento, e por fim, a protrusão da radícula (REGO et al., 2018).

Uma dessas enzimas importantes do metabolismo, é a α -amilase, envolvida na hidrólise do amido em glicose. O desenvolvimento da atividade da amilase constitui um importante evento, no qual pode ser detectado durante o início da germinação de sementes (TUAN et al., 2019). Essa enzima é amplamente distribuída nas plantas, estando presente em pequenas quantidades em sementes dormentes. Entretanto durante o processo de germinação, a expressão da α -amilase é aumentada (LIU et al. 2018). No processo de germinação de sementes, os GAs bioativos são sintetizados no embrião e transportados para a camada de aleurona para induzir a expressão do gene da α -amilase e a síntese da α -amilase. Em seguida, a α -amilase é secretada no endosperma para hidrolisar o amido armazenado (LIU et al. 2018).

O GA e o ABA foram reconhecidos como os principais hormônios com efeito antagônico na regulação da germinação das sementes (LLANES et al., 2016; SHU et al., 2016). Em muitas plantas, logo após a semente embeber água durante a germinação, as giberelinas ou substâncias semelhantes ao GA aumentam (HELAL; EISA, 2008). O ácido giberélico (GA₃) é uma das giberelinas, entre as diversas existentes, que apresenta a maior utilização nesse âmbito (LAVAGNINI et al., 2014).

O GA₃ pode ser empregado, em diversas concentrações na busca de melhorar a porcentagem de germinação e promover a quebra de dormência de sementes, sendo amplamente utilizado na cultura de tecidos de plantas (SINGH et al., 2016; TUAN et al., 2019). Sua aplicação tem sido amplamente estudada, e seus efeitos benéficos já foram

relatados para ravenala, como também para estrelícia pertencente a mesma família (HELAL; EISA, 2008; KUMAR et al., 2018).

2.3 Germinação de sementes de ravenala

A germinação de sementes se refere ao processo fisiológico que culmina com a emergência do embrião (MARCOS FILHO, 2015). A propagação por sementes torna-se uma alternativa importante, pois o uso de sementes é relevante para conservação e melhoramento de plantas (VELLVE, 2010). Além disso, o uso de sementes confere maior segurança contra contaminações viróticas e microbiológicas inerentes ao material vegetal (SMITH, 2013).

Desse modo, uma alternativa que se apresenta é a propagação *ex vitro* e *in vitro* por sementes, posto que o método é passível de ser explorado em escala comercial (STASOLLA; THORPE, 2011). A propagação de ravenala é realizada por divisão de touceiras no qual resulta um pequeno número de mudas e por sementes (MCLENDON, 2005; EDWARD et al., 2006). A propagação de ravenala utilizando sementes é lenta e insatisfatória quando se busca uma produção comercial, devido as sementes apresentarem dormência resultando em baixa porcentagem de germinação (EDWARD et al., 2006; HELAL; EISA, 2008).

Entretanto, estudos com a propagação de ravenala são escassos, sendo necessários mais trabalhos com o intuito de melhorar a porcentagem de germinação dessa espécie. Um dos métodos utilizados para quebrar a dormência das sementes de ravenala é a escarificação das sementes com ácido sulfúrico. Ao utilizar o ácido sulfúrico por 9 minutos a porcentagem de germinação aumentou (aproximadamente 54%) resultando em uma germinação alta (90%) e relativamente rápida (15 dias), já as sementes não escarificadas, houve apenas 36% de germinação após 39 dias (TORRES et al., 2013). Isso indica que a dormência pode estar ligada à impermeabilidade do tegumento à água e a gases e também a rigidez do endosperma.

Ao utilizar a interação de escarificação com GA₃ como alternativa para quebra da dormência, houve aumento aproximadamente 75% de germinação de sementes de ravenala submetidas em imersão em água por 24 horas e, posteriormente, imersão em solução em GA₃ na concentração de 300 mg L⁻¹, quando comparados ao controle 50% de germinação, porém não foi testado outras concentrações de GA₃ (HELAL; EISA, 2008). Entretanto ainda não se tem relatos de estudos com propagação *in vitro* dessa espécie.

Dessa forma, fica evidente a importância de se avaliar o potencial de reguladores de crescimento, como o GA₃ para quebra da dormência de sementes de espécies com interesse

ornamental, sobretudo aquelas que apresentam dificuldade de propagação como é o caso da ravenala, e dessa forma otimizar sua germinação.

REFERÊNCIAS

- ABD AZIZ, et al. Efficient micropropagation protocol and genome size estimation of an important cover crop, *Mucuna bracteata* DC. ex Kurz. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 132, p. 267-278, 2018.
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 2. ed. San Diego, Academic/Elsevier, p. 1602, 2014.
- BEWLEY, D. et al. Germination. In: **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. Berlin: Springer Science & Business Media, p. 133–181, 2013.
- CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, p. 619-631, 2009.
- CARVALHO, M. B. F. et al. Métodos de superação de dormência da *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 1, p. 490-500, 2019.
- CRON, G. V. et al. Phylogenetic relationships and evolution in the *Strelitziaceae* (Zingiberales). **Systematic Botany**, v. 37, n. 3, p. 606-619, 2012.
- DUVALE, S. A. H. et al. *Solofomalala anjaramampionona* Henintsoa et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the fruits of bemavo, a variety of *Ravenala madagascariensis* Sonn. (Strelitziaceae). **World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences**, v. 2, n. 2, p. 030-039, 2020.
- EDWARD, F.G. et al. *Ravenala madagascariensis*: **Travelers-tree**. IFAS, Univ. Florida. 2006. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/ST/ST56500.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2020.
- FEELEY-HARNIK, G. *Ravenala madagascariensis* Sonnerat: The historical ecology of a “flagship species” in Madagascar. **Ethnohistory**, v. 48, n. 1-2, p. 31-86, 2001.
- HELAL, A. E.; EISA, G. Germination and seedling growth of traveler's tree as affected by some pre-germination treatments. **Journal of Productivity and Development**, v. 13, n. 2, p. 271-287, 2008.
- KUMAR, S. S. et al. Effect of growth regulators on seed germination o paradise. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 7, n.1, p. 101-104, 2018.
- LAVAGNINI, C. G. et al. Fisiologia vegetal-hormônio giberelina. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 25, n. 1, p. 48-52, 2014.
- LIU, L. et al. Salinity inhibits rice seed germination by reducing α -amylase activity via decreased bioactive gibberellin content. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 275, 2018.
- LLANES, A. et al. Drought and salinity alter endogenous hormonal profiles at the seed germination phase. **Seed Science Research**, v. 26, n. 1, p. 1-13, 2016.

LORENZI, H. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa. Instituto Plantarum de Estudos da Flora p. 258, 2003.

MARCOS-FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. **PR: Abrates**, p. 660, 2015.

MCLENDON, C. *Ravenala madagascariensis*. Florida, USA. 2005. Disponível em: <http://www.floridata.com/ref/R/rave_mad.cfm>. Acesso em: 15 out. 2020.

NORTH, J. J. et al. Effects of various media compositions on the *in vitro* germination and discoloration of immature embryos of bird of paradise (*Strelitzia reginae*). **Plant Omics Journal**, v. 4, n. 2, p. 100-113, 2011.

OLIVEIRA, A.K.M. et al. Superação de dormência em sementes de *Parkia gigantocarpa* (Fabaceae – Mimosidae). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 533-540, 2012.

PAIVA, P. D. O.; ALMEIDA, E. F. A. **Produção de flores de corte**. Lavras: UFLA, p. 678, 2012.

PAIVA, P. D. O. et al. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, 2004.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

RAMIARANTSOA, H. et al. Chemical constituents of the antidiabetic plant *Ravenala madagascariensis*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 12, p. 5503, 2014.

REGO, C. H. Q. et al. Ácido giberélico auxilia na superação da dormência fisiológica e expressão de vigor das sementes de graviola. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 3, p. 83–86, 2018.

SAISANTHOSH, K. et al. Role of enzymatic antioxidants defense system in seeds. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 7, n. 1, p. 584-594, 2018.

SCHWEMBER, A.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 15, p. 4423-4436, 2010.

SETHURAMAN, S. P.; PB, VANI, P. B.; KAREEM, A. A.; JANANI, R.; & KUMAR, P. R. Antitumor effect of leaves of *Ravenala madagascariensis* Sonn., in PANC1 and SW1990 pancreatic cell lines. **Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR) [Formerly Natural Product Radiance (NPR)]**, v. 11, n. 2, p. 89-95, 2020.

SHU, K. et al. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. **Molecular Plant**, v. 9, n. 1, p. 34-45, 2016.

SINGH, R. et al. Advances in understanding the role of growth regulators in plant growth and development *in vitro*-III. Inhibitors of Growth Regulators. **Indian Forester**, v. 142, n. 11, p. 1065-1072, 2016.

SMITH, R. **Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments**. 3. ed. [s.l.] Academic Press, 2013.

STASOLLA, C.; THORPE, T. Tissue culture: historical perspectives and applications. In: KUMAR, A.; SOPORY, S. (Ed.). **Applications of Plant Biotechnology**. Dordrecht: The Netherlands Kluwer Academic Publishes, 2011.

SUROOWAN, S.; MAHOMOODALLY, F. *Ravenala madagascariensis*. In: **Underexplored Medicinal Plants from Sub-Saharan Africa**. Academic Press, p. 247-252, 2020.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6th. Porto Alegre, Artmed, 2017.

THOMPSON, K.; MORGAN, H. D. **Seed Germination Database**. Washington, USA. 2008. Disponível em: <<http://www.backyardgardener.com/tm.html>>. Acesso em: 15 out. 2020.

TORRES, S. B. et al. Germination of *Ravenala madagascariensis* (Strelitziaceae) seeds submitted to chemical scarification. **Seed Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 154-157, 2013.

TUAN, P. A. et al. Molecular mechanisms of seed germination. In: **Sprouted Grains**. AACC International Press, p. 1-24, 2019.

ULISSES, C. et al. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p. 86-91, 2010.

VELLVE, R. **Saving the seed**, 1. ed. London: Routledge, p. 210, 2010.

WOJTYLA, L. et al. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 66, p. 1-16, 2016.

CAPÍTULO 2: ÁCIDO GIBERÉLICO NA GERMINAÇÃO *in vitro* E *ex vitro* DE RAVENALA

RESUMO

A propagação de ravenala (*Ravenala madagascariensis*) é realizada por meio de divisão e replantio de touceiras ou por sementes que apresentam baixa porcentagem de germinação, devido a dormência. Dessa forma, objetivou-se quebrar a dormência de sementes de ravenala com aplicação de GA₃, e dessa forma estabelecer protocolos de germinação tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. Inicialmente foi realizado um teste de assepsia, onde as sementes foram imersas em álcool 70% por 30 segundos, e após submetidas a imersão por 15, 30 e 45 minutos em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%. Após 60 dias foi avaliada a porcentagem de contaminação das sementes. Para a germinação *in vitro* foi analisado a aplicação de GA₃ ao meio de cultivo e no processo de embebição das sementes. Para aplicação ao meio de cultivo, as sementes inicialmente foram escarificadas em ácido sulfúrico por 10 minutos, logo após desinfestadas e inoculadas em meio MS suplementado com 0, 10, 20, 40 ou 80 µM de GA₃. Para o processo de embebição, após a escarificação em ácido sulfúrico por 10 minutos as sementes foram desinfestadas e embebidas em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) por 24 e 48 horas e inoculadas em meio MS. Aos 30, 60 e 90 dias da inoculação foi avaliada a porcentagem de germinação. Análises de crescimento foram realizadas aos 90 dias de cultivo, quanto ao comprimento da parte aérea e da raiz principal (cm), o número de folhas e peso fresco da plântula (g). No processo de germinação *ex vitro* após a escarificação em ácido sulfúrico por 10 minutos as sementes foram embebidas em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) por 24 horas e 48 horas e posteriormente foram colocadas em tubetes contendo substrato comercial Tropstrato[®] e vermiculita na proporção 1/1. A porcentagem de germinação foi avaliada após 30, 60 e 90 dias. E aos 90 dias de cultivo avaliou-se o comprimento da parte aérea e raiz (cm), número de folhas e peso fresco (g). Também foram realizadas análises bioquímicas, sendo determinadas a atividade da α-amilase, do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a peroxidação lipídica. No teste de assepsia não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tempos de imersão em NaOCl, demonstrando que a imersão por 15 minutos é suficiente para a desinfestação dessas sementes. A adição de 20 µM de GA₃ ao meio de cultivo promoveu maior porcentagem de germinação (95%). O comprimento da parte aérea e raiz, número de folhas e o peso fresco foi maior nas concentrações 0, 10, 20 e 40 µM. No processo de germinação *in vitro*, a embebição em GA₃ por 24h e 48h promoveram em média 80% de germinação. Maior comprimento da raiz, número de folhas e o peso fresco foram observados no tratamento sem embebição em GA₃, já o comprimento da parte aérea foi maior nas concentrações de 250, 750 e 1000 mg L⁻¹. No processo de germinação *ex vitro* os resultados demonstraram que em 24h de embebição a concentração de 250 mg L⁻¹ de GA₃ promoveu maior porcentagem de germinação (25%), já em 48h, a maior porcentagem de germinação (25%) foi observada em 1000 mg L⁻¹ de GA₃. De acordo com os resultados encontrados, recomenda-se para superação da dormência e otimização da germinação de ravenala a propagação *in vitro* com uso de 20 µM de GA₃ no meio de cultura e a embebição em 24 horas e 48 horas independente do uso de GA₃.

Palavras-chave: Ravenala. Quebra de dormência. Cultura de tecidos.

ABSTRACT

The propagation of ravenala (*Ravenala madagascariensis*) is done vegetatively by replanting clumps or by seeds, which present low germination percentage due to dormancy. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of gibberellic acid (GA₃) on breaking the dormancy of ravenala seeds and to establish protocols for their *in vitro* and *ex vitro* germination. Initially, the seeds were immersed in 70% alcohol for 30 seconds and then they were immersed for 15, 30 and 45 minutes in 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl). After 60 days the percentage contamination of seeds was evaluated. For *in vitro* germination, the effect of application of GA₃ to the culture medium as well as during the process of seed imbibition was analyzed. Seeds were initially scarified in sulfuric acid for 10 minutes and immediately disinfested and inoculated in MS medium supplemented with 0, 10, 20, 40 or 80 µM of GA₃. For the imbibition process, after scarification in sulfuric acid for 10 minutes, the seeds were disinfested and imbibed in different GA₃ concentrations (0, 250, 500, 750 and 1000 mg L⁻¹) for 24 hours and 48 hours and inoculated in MS medium. After 30, 60 and 90 days from inoculation the percentage germination was evaluated. Growth parameters, such as, aerial part length (cm), main root length (cm), number of leaves and, fresh weight of seedlings (g) was analyzed at 90 days of cultivation. In the process of *ex vitro* germination, right after the scarification in sulfuric acid for 10 minutes, the seeds were imbibed in different of GA₃ concentrations (0, 250, 500, 750 and 1000 mg L⁻¹) for 24 hours and 48 hours. Then the seeds were placed in tubes containing commercial substrate Tropstrato[®] and vermiculite in the 1:1 ratio. The percentage germination was also evaluated after 30, 60 and 90 days from sowing. In the same way as for *in vitro* germination, at 90 days of cultivation, growth parameters were also evaluated. Biochemical analyses were also carried out to determine the α-amylase and hydrogen peroxide (H₂O₂) activities and lipid peroxidation. No significant differences were observed among the different immersion times in NaOCl, demonstrating that the immersion for 15 minutes is sufficient for seed disinfestation. The addition of 20 µM of GA₃ to the culture medium promoted the higher percentage germination (95%). The aerial part length, root length, number of leaves and fresh weight of seedlings were greater using 0, 10, 20 and 40 µM of GA₃. Seed imbibition for 24 hours or 48 hours promoted an *in vitro* germination average of 80%. However, there was no significant difference on germination percentage between seeds embedded in solution with or without GA₃. Greater root length, number of leaves and fresh weight of seedlings were observed when seeds were imbibed in solution with no GA₃, whereas the aerial part length was greater in GA₃ concentrations of 250, 750 and 1000 mg L⁻¹. In *extra vitro* germination the seed imbibition in solution with 250 mg L⁻¹ and 1000 mg L⁻¹ of GA₃ promoted the higher germination percentage (25%) in 24h and 48h respectively. Therefore, according to our results the use of culture medium supplemented with 20 µM of GA₃ and seed imbibition for 24 hours to 48 hours regardless the use of GA₃ is recommended to break the dormancy of ravenala seeds and to optimize the *in vitro* germination.

Keywords: Ravenala. Breaking dormancy. Tissue culture.

1 INTRODUÇÃO

No paisagismo o interesse por culturas tropicais e exóticas devido a aspectos favoráveis à comercialização, vem crescendo (SANTOS et al., 2018). Dentre as espécies tropicais, destacam-se *Alpinia purpurata*, *Heliconia psittacorum* e espécies da família Strelitziaceae, como *Strelitzia reginae* e a *Ravenala madagascariensis* (QUEIROZ; SILVA; MARTINS, 2016; JUNQUEIRA; PEETZ, 2017; SANTOS et al., 2018). A *Ravenala madagascariensis* é uma espécie endêmica de Madagascar utilizada em todo mundo como planta ornamental para jardins (SUROOWAN; MAHOMOODALLY, 2020). Entre as plantas ornamentais cultivadas, as tropicais apresentam destaque no mercado brasileiro, por possuírem resistência ao transporte e boa durabilidade pós-colheita, diversidade de flores exóticas com cores e formas diferentes, contribuindo para uma boa aceitação no mercado externo (DIAS, 2016).

A propagação de ravenala é realizada por divisão de touceiras, ou por sementes (MCLENDON, 2005; EDWARD et al., 2006). Plantas que são propagadas por divisão e replantio de touceiras iniciam seu florescimento em 3 anos, entretanto nesse processo obtém-se um pequeno número de mudas reproduzidas a partir da planta mãe (THOMPSON; MORGAN, 2008). A propagação seminal é dificultada, devido ao fato destas sementes apresentarem dormência, o que resulta em germinação tardia com duração de mais de seis meses influenciando também diretamente no desenvolvimento das plantas (MCLENDON, 2005; EDWARD et al., 2006; HELAL; EISA, 2008). Essas condições evidenciam a necessidade de realizar estudos buscando tratamentos eficientes para a superar a dormência e otimizar a germinação, e assim viabilizar a produção comercial de mudas por meio de sementes (TORRES et al., 2013).

Um método muito utilizado para superar a dormência de sementes é o uso de giberelina, pois esse fitorregulador está envolvido na regulação do processo germinativo (ALMEIDA; RODRIGUES, 2016; TAIZ et al., 2017). O ácido giberélico (GA₃) é uma das giberelinas que apresenta a maior utilização nesse âmbito, podendo ser empregado, em diversas concentrações na busca da quebra da dormência de sementes e melhorar a porcentagem de germinação, sendo amplamente usado na cultura de tecidos de plantas (SINGH et al., 2016).

Estudos utilizando reguladores de crescimento já foram realizados buscando a quebra da dormência e otimização da germinação de espécies dessa família. Para estrelícia foi

relatado 78,10% de germinação quando sementes foram embebidas em GA₃ na concentração de 750 mg L⁻¹ por 24h (KUMAR et al., 2018). Já para ravenala sementes submetidas à imersão em água por 24 horas, e posteriormente imersão em solução de GA₃ na concentração de 300 mg L⁻¹ tiveram efeito intensificador, sendo observada aproximadamente 75% de germinação (HELAL; EISA, 2008).

Ademais, estudos sobre a quebra de dormência em sementes de ravenala ainda são escassos, e não são atuais, e até o momento não há relatos de estudos com a propagação *in vitro*. A propagação *in vitro* pode ser uma alternativa viável para aumentar a germinação de ravenala, visto que a germinação *in vitro* de sementes pode aliar a diversidade genética presente no novo organismo e a condição asséptica do meio de cultura (PINHAL et al., 2011).

Diante do exposto, a germinação de ravenala apresenta desafios significativos no uso de sementes. Para lidar com essas limitações e aumentar a porcentagem de germinação, objetivou-se com a aplicação de ácido giberélico GA₃ a superação da dormência de sementes de ravenala, e assim definir um protocolo de germinação e estabelecimento de mudas *in vitro*, como também otimizar a germinação de sementes de ravenala *ex vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

Frutos maduros de ravenala foram coletados de plantas localizadas no Campus da Universidade Federal de Lavras, localizado em 21°13'40" de latitude sul e 44°57'50" de longitude oeste, situando-se a uma altitude média de 900 m. Em seguida foram levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, localizado no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizados os experimentos. As sementes foram retiradas dos frutos com auxílio de pinças e a retirada do arilo foi realizada manualmente.

2.2 Efeito do ácido giberélico na germinação *in vitro* de ravenala

2.2.1 Assepsia de sementes de ravenala

As sementes, após excisado o arilo foram levadas para câmara de fluxo laminar e submetidas à imersão em álcool 70% por 30 segundos. Após esse processo as sementes foram submersas em hipoclorito de sódio a 2,5%, por 15, 30 e 45 minutos, com posterior tríplice lavagem em água destilada e autoclavada (adaptado de PAIVA et al., 2004), em cada

tratamento foram utilizadas 20 sementes. Em seguida essas sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 g L⁻¹ de PVP (Polivinilpirrolidona), 2,5 g L⁻¹ de Phytigel® (PAIVA et al., 2004) e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121°C por 20 minutos. As sementes foram mantidas no escuro por 7 dias e posteriormente foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹. Após o período de 60 dias foi avaliado a porcentagem de contaminação das sementes.

2.2.2 Superação da dormência com diferentes concentrações de GA₃ em meio de cultura

As sementes, após excisado o arilo, foram submetidas à imersão em ácido sulfúrico P.A. por 10 minutos com posterior tríplice lavagem em água destilada (TORRES et al., 2013). Após, foram levadas para câmara de fluxo laminar e desinfestadas utilizando o melhor tratamento determinado no item 2.2.1. Após a desinfestação as sementes foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 g L⁻¹ de PVP, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel® (PAIVA et al., 2004), suplementado com diferentes concentrações de GA₃: 0, 10, 20, 40 e 80 μM e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121°C por 20 minutos, sendo utilizado 20 sementes por tratamento. As sementes foram colocadas no escuro por 7 dias e depois transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

Ao final de 30, 60 e 90 dias da inoculação foi avaliada a porcentagem de germinação. Também aos 90 dias foram avaliados o comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz principal (cm), número de folhas e peso fresco das plântulas (g).

2.2.3 Superação da dormência com embebição em diferentes concentrações de GA₃

As sementes, após excisado o arilo, foram submetidas à imersão em ácido sulfúrico P.A. por 10 minutos com posterior tríplice lavagem em água destilada (TORRES et al., 2013). Logo após, as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar e desinfestadas utilizando o melhor tratamento determinado no item 2.2.1. Em seguida, as sementes foram embebidas em água destilada (controle) e em solução aquosa filtrada a vácuo com GA₃ em diferentes concentrações (250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) por diferentes tempos (24 e 48 horas) (Adaptado KUMAR de et al., 2018). As soluções foram mantidas em agitação constante a 150 rpm. Também foi realizado um tratamento sem embebição (0 horas). Em cada tratamento foi

utilizado 20 sementes. Após o término do período de embebição as sementes foram levadas novamente para câmara de fluxo laminar, onde foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,4 g L⁻¹ de PVP, 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®] (PAIVA et al., 2004), e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121°C por 20 minutos. As sementes foram mantidas em sala de crescimento no escuro por 7 dias e depois transferidas para luz com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e irradiância de fótons de 36 μmol m⁻²s⁻¹.

Após 30, 60 dias da inoculação foi avaliada a porcentagem de germinação. Aos 90 dias, além da porcentagem de germinação foram avaliados também o comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz principal (cm), o número de folhas e peso fresco da plântula.

2.3 Efeito do ácido giberélico na germinação *ex vitro* de ravenala.

As sementes, após excisado o arilo, foram submetidas à imersão em ácido sulfúrico P.A. por 10 minutos com posterior tríplice lavagem em água destilada (TORRES et al., 2013). Logo após, as sementes foram embebidas em água destilada (controle) e em solução aquosa filtrada a vácuo com GA₃ em diferentes concentrações (250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) por diferentes tempos (24 e 48 horas) (Adaptado KUMAR de et al., 2018), sendo utilizado 20 sementes por tratamento. As soluções foram mantidas em agitação constante a 150 rpm. Foi realizado também um tratamento com um lote de 20 sem embebição (0 horas). Cada semente foi disposta individualmente em tubetes de 140 mm de comprimento e 40 mm de diâmetro com capacidade de 100 cm³ contendo substrato comercial Tropstrato[®] e Vermiculita na proporção 1/1 (determinados em pré-testes). As sementes foram mantidas em sala de crescimento em temperatura 25° ± 2°C e irradiância de fótons de 36 μmol m⁻²s⁻¹. A cada três dias as sementes foram irrigadas com água destilada.

Após 30, 60 e 90 dias da inoculação foi avaliada a porcentagem de germinação. E aos 90 dias, o comprimento da parte aérea (cm), comprimento da principal raiz (cm), número de folhas e peso seco das plântulas.

2.4 Determinação da atividade da α-amilase

Sementes embebidas em solução aquosa filtrada a vácuo com GA₃ em diferentes concentrações (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) por diferentes tempos (24 e 48 horas) (Adaptado KUMAR de et al., 2018), foram utilizadas para quantificação de α-amilase de acordo com o método de Sottirattanapan et al. (2017). Para extração enzimática 0,1 g da

massa fresca da semente foi moída e homogeneizada com 2 mL de água destilada (4°C). A mistura foi submetida a um banho de resfriamento a 4°C por 10 min com agitação ocasional. Posteriormente o homogeneizado foi então centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 min a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e utilizado como o extrato bruto para quantificação enzimática. A atividade da α -amilase foi avaliada quantitativamente por uma versão modificada do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER; 1959). O extrato enzimático bruto foi aquecido por 15 min a 70°C. Em seguida, 0,5 mL do extrato enzimático bruto foi misturado com 0,5 mL de amido solúvel a 1% dissolvido em tampão de acetato de potássio a pH 5,6. A mistura foi incubada por 15 min a 40°C e posteriormente aquecida (95°C) por 5 min na presença de 2 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico. A quantidade de açúcar redutor liberado foi medida usando um espectrofotômetro UV-vis (UV-2100, Unico Instrument Co., Ltd., Xangai, China) a 540 nm com maltose como padrão de açúcar redutor. Uma unidade de atividade de α -amilase foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μ M de maltose por minuto nas condições de atividade da enzima (Adaptado LIU et al., 2018).

2.5 Determinação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica

Outro lote de 20 sementes embebidas foi utilizado para a quantificação de H₂O₂. Foram macerados 200 mg da massa fresca das sementes em nitrogênio líquido (NL), acrescido de 20% de polivinilpirrolidona (PVPP) (p/v), homogeneizados em 1500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) e centrifugados a 10.000 g por 15 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi coletado para análise. O H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0), iodeto de potássio (1M) e 45 μ L do extrato coletado. (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). 200 mg da massa fresca das sementes foram macerados em NL, acrescido de 20% de PVPP (p/v) e homogeneizados com 1500 μ L de TCA 0,1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos, a 4°C. Aliquotas de 125 μ L do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação com 250 μ L de [0,5% (p/v) de TBA e 10% (p/v) de TCA], incubando-se, em seguida, em banho-maria a 95°C, por 30 minutos.

A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor

avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A535 - A600) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1).

2.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos as médias foram comparadas pelo teste de Skott-knott (5%). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância (FERREIRA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do ácido giberélico na germinação de ravenala e crescimento das plântulas *in vitro*.

3.1.1 Assepsia de sementes de ravenala

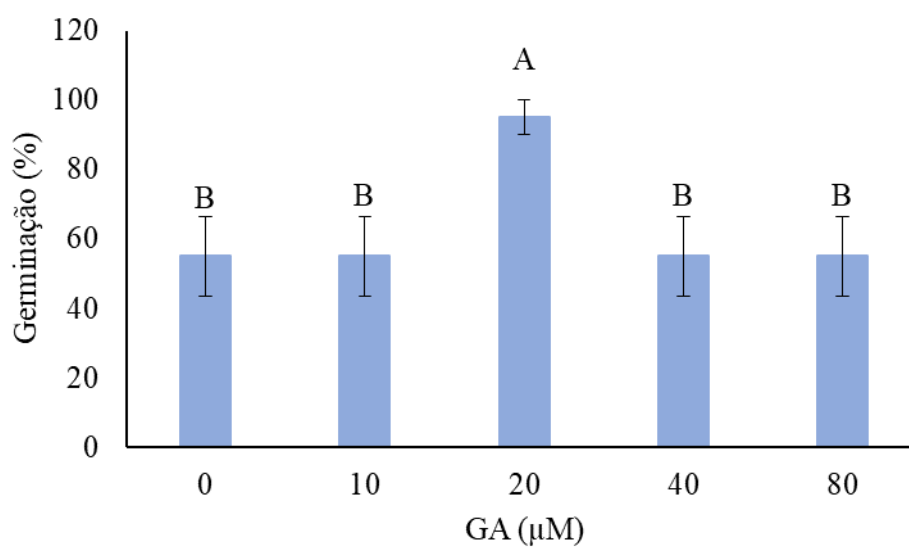
Não houve diferença significativa entre os diferentes tempos de imersão no hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%, tendo como média 5% de contaminação, demonstrando que 15 minutos de imersão em NaOCl é suficiente para a desinfestação de sementes dessa espécie.

Dessa forma as sementes submetidas à imersão em álcool 70% por 30 segundos, e posteriormente submersas por 15 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5%, com posterior tríplice lavagem em água destilada e autoclavada demonstra ser um protocolo eficaz para a desinfestação de sementes de ravenala. Para *Strelitzia reginae*, espécie da família da ravenala, a utilização no processo de assepsia de sementes para a propagação *in vitro* com imersão em solução de hipoclorito de sódio por 15 minutos também já é suficiente para a desinfestação (PAIVA et al., 2004).

3.1.2 Superação da dormência com diferentes concentrações de GA₃ em meio de cultura

Não foram observadas diferenças significativas quanto a porcentagem de germinação nas diferentes concentrações de GA₃ no meio de cultura aos 30 e 60 dias, com germinação média de 20% e 40% para cada tempo avaliado, respectivamente. Entretanto aos 90 dias de cultivo observou-se que a adição de GA₃ ao meio de cultura, na concentração de 20 μM , apresentou maior porcentagem de germinação das sementes (95%), diferindo estatisticamente das demais concentrações testadas que promoveram apenas 55% de germinação (Figura 2).

Figura 2 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de ravenala após 90 dias de cultivo, em meio MS suplementado por diferentes concentrações de GA₃ (0, 10, 20, 40 e 80 μM).



Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao erro padrão da média.

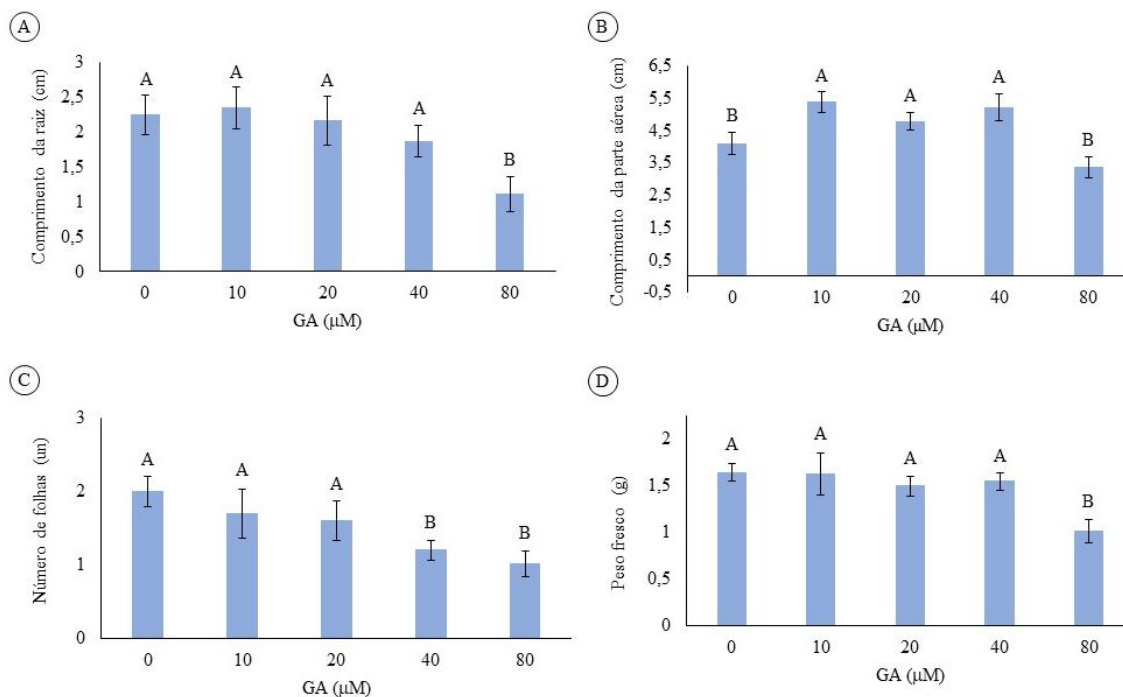
Fonte: do autor (2020).

Diante desses resultados pode-se inferir que concentrações menores que 20 μM de GA₃ ao meio de cultivo, podem não ser efetivas para quebrar a dormência de sementes dessa espécie e que concentrações mais elevadas podem ser fitotóxicas, diminuindo o percentual de germinação. Giberelinas apresentam a capacidade de quebrar a dormência e promover a germinação de sementes, entretanto quantidades excessivas de GA₃ pode proporcionar efeitos negativos na germinação e desenvolvimento das plantas (TUAN et al., 2019; DA SILVA; PISTORI; BLINI; DE SANTANA, 2020). O balanço hormonal entre giberelinas (GAs) e ácido abscísico (ABA) controla a germinação, uma vez que estas substâncias são responsáveis pela ativação ou inativação de enzimas que mantêm ou não o embrião no estado dormente, e pode aliviar assim vários tipos de dormência, inclusive química e fisiológica (CARDOSO, 2009; BASKIN, BASKIN, 2014; TAIZ et al., 2017). De acordo com o que foi encontrado o uso de GA₃ ao meio de cultura é eficaz para a germinação *in vitro* de sementes de ravenala.

Para o comprimento da raiz (Figura 3A) e o peso fresco (Figura 3D) foram observados os melhores resultados nas concentrações 0, 10, 20 e 40 μM de GA₃ não diferindo

estatisticamente entre si. Já as concentrações de 10, 20 e 40 μM de GA_3 promoveram os maiores comprimentos da parte aérea não diferindo estatisticamente entre si (Figura 3B). Maior número de folhas foi observado nas concentrações 0, 10 e 20 μM de GA_3 não diferindo estatisticamente entre si (Figura 3C).

Figura 3 – Análises de crescimento de plântulas de ravenala germinadas *in vitro* após 90 dias de cultivo, em meio MS suplementado por diferentes concentrações de GA_3 (0, 10, 20, 40 e 80 μM).



Legenda: (A) Comprimento da raiz (cm). (B) Comprimento da parte aérea (cm). (C) Número de folhas (un). (D) Peso fresco (g).

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2020).

De acordo com os resultados obtidos para o comprimento da raiz, número de folhas e peso fresco sugere-se que em concentrações altas de GA_3 ocorre a formação de raízes com menor tamanho, além de menor número de folhas e, em consequência, redução do peso fresco. Altas concentrações de GA_3 tornam-se inibidoras e, na maioria dos casos, as raízes apresentam níveis quase saturados de GA_3 , dificultando seu crescimento (TANIMOTO, 2012; TUAN et al., 2019). Entretanto em baixas concentrações elas têm a capacidade de ativar a produção de enzimas que promovem o afrouxamento da parede celular, e por consequência o crescimento do tecido influenciando o crescimento e desenvolvimento das plantas, seus efeitos variam de acordo com cada espécie (PAPARELLI et al., 2013; TUAN et al., 2019). Estudos sobre GA_3 focam geralmente em partes aéreas, visto que a raiz nem sempre é

economicamente importante. No entanto, há estudos onde o excesso de GA₃ pode suprimir o crescimento da raiz de algumas plantas (WANG et al., 2015; GASPARINI, et al., 2019).

De acordo com os resultados encontrados para o comprimento da parte aérea os menores valores encontrados no controle, pode ser justificado devido a falta do GA₃, já a maior concentração utilizada pode ter sido deletéria, influenciando negativamente o desenvolvimento da planta. Visto que o GA₃ é um regulador vegetal que atua como estimulante de crescimento, em consequência da sua ação na divisão e expansão celular, sua aplicação dá origem a plantas mais alongadas, agindo sobre o crescimento das hastes e do caule, entretanto seus efeitos variam de acordo com cada espécie e em alguns casos, o uso de GA₃ pode até inibir o crescimento (TUAN et al., 2019). Esse fitohormônio tem pouco efeito sobre o crescimento das raízes, provavelmente devido ao efeito do aumento do desenvolvimento do caule e parte aérea, atuando no crescimento de órgãos vegetais, pela estimulação do tamanho das células já existentes ou recentemente divididas (DAVIES, 2004; ZHONG et al., 2015). Resultados semelhantes já foram encontrados, onde a aplicação de GA₃ aumentou significativamente a parte aérea, mas diminuiu a raiz (WANG et al., 2015).

Contudo, sem a aplicação de GA₃ exógena e em concentrações mais altas, há diminuição do comprimento da parte aérea (FIGURA 4).

Figura 4 – Plântulas de ravenala após 90 dias de cultivo, em meio MS suplementado por diferentes concentrações de GA₃ (0, 10, 20, 40 e 80 µM).



Legenda: (A) 0 µM de GA₃. (B) 10 µM de GA₃. (C) 20 µM de GA₃. (D) 40 µM de GA₃. (E) 80 µM de GA₃. Barra 1 cm.

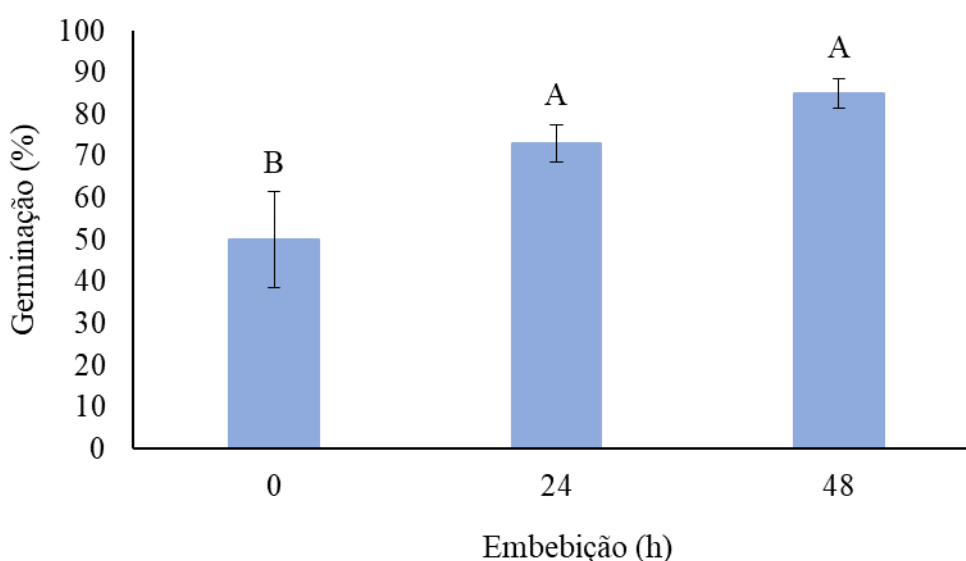
Fonte: Do autor (2020).

Todavia, o principal efeito benéfico do GA₃ observado nas plântulas está relacionado com o desenvolvimento da parte aérea. E em altas concentrações o GA₃ pode afetar o crescimento e desenvolvimento das plântulas.

3.1.3 Superação da dormência com embebição em diferentes concentrações de GA₃ *in vitro*

Os tratamentos de embebição em GA₃ por 24h e 48h apresentaram maiores porcentagens de germinação (75%) e (85%) respectivamente, não diferindo estatisticamente, enquanto que para o tempo 0h foi observado 50% de germinação (Figura 5).

Figura 5 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de ravenala após 90 dias de cultivo, cujas sementes foram embebidas em diferentes tempos (0, 24 e 48 horas).



Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

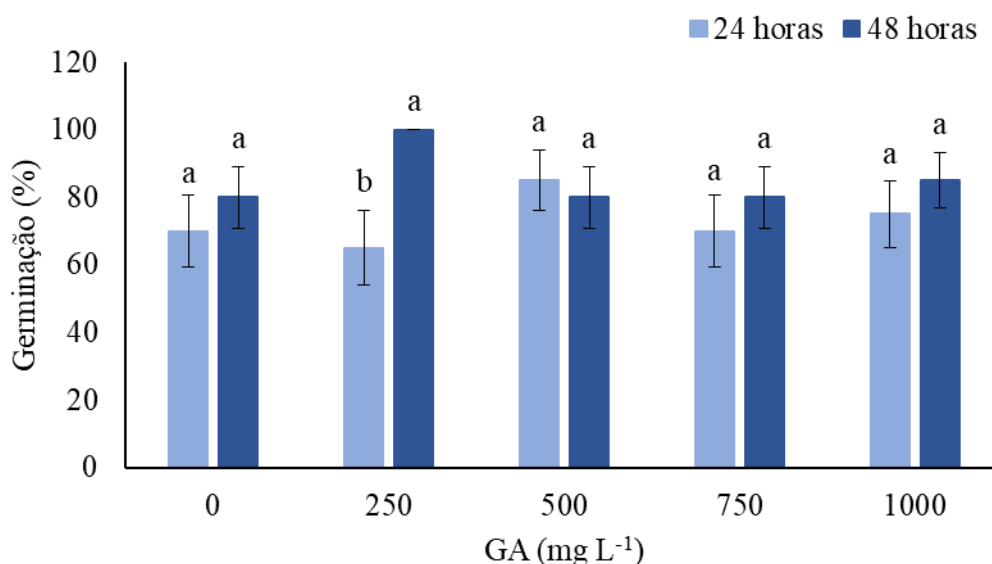
Fonte: Do autor (2020).

Esse resultado sugere que a embebição em 24h já se torna efetivo para a germinação de ravenala, pois em relação ao tempo de 0h teve aumento de 25% na germinação, no tempo de 48 horas observou-se um aumento de 35% na porcentagem de germinação comparado ao tempo de 0h. No processo de embebição ocorre a retomada das etapas de desenvolvimento das sementes, que consiste na reidratação dos tecidos destas, o entendimento desta fase permite inferências sobre o tempo e a quantidade de água necessária para uma semente emitir a radícula, além de conceder informações sobre as influências dos tegumentos neste processo, servindo como subsídio para determinação do tempo de embebição, bem como, o início do processo de germinação (RABANNI et al., 2013).

A velocidade de embebição depende das características de cada espécie, dentre essas, da composição química e da permeabilidade do tegumento (MARCOS FILHO, 2015). Para sementes de estrelícia o período de 24 e 48 horas de embebição também foram efetivos para aumentar a germinação (KUMAR et al., 2018). Um estudo de embebição em sementes de ravenala com imersão em água por 24 horas, e posteriormente imersão em solução com GA₃ se mostrou efetivo para aumentar a porcentagem de germinação dessa espécie (HELAL; EISA, 2008).

Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de germinação em relação as concentrações de GA₃ nos tempos de 24h e de 48h. Entretanto quando avaliado o tempo de embebição em relação a cada concentração de GA₃ observa-se que na concentração de 250 mg L⁻¹ o tempo de 48h apresentou uma maior porcentagem de germinação em relação ao tempo de 24h. No entanto, nas demais concentrações não foram observadas diferenças significativas quanto ao tempo de embebição (Figura 6).

Figura 6 – Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de ravenala após 90 dias de cultivo, cujas sementes foram embebidas em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) por diferentes tempos (24 e 48 horas).



Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2020).

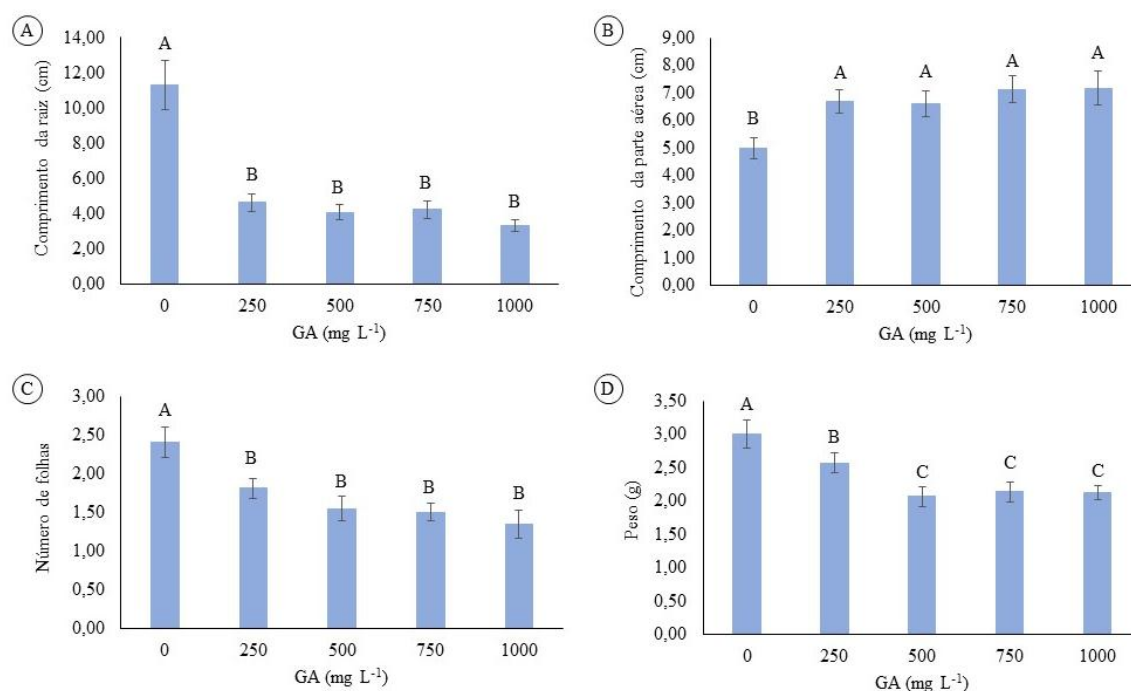
Dessa forma, a embebição por 24h e 48h são eficazes para a germinação de ravenala, independente da concentração de GA₃ utilizada. A embebição aliada a escarificação por ácido sulfúrico possibilitou um protocolo eficiente para germinação *in vitro* de ravenala, o que corrobora com um estudo realizado em sementes de ravenala *ex vitro* com interações de

escarificação e embebição por 24 horas, no qual obtiveram aumento nas porcentagens de germinação (média 75%) comparadas ao controle (HELAL; EISA, 2008). Além disso, um estudo realizado com sementes de estrelícia também teve resultados satisfatórios utilizando embebição por 24h, apresentando 78,10% de germinação (KUMAR et al., 2018).

O tratamento controle (sementes embebidas em água) apresentou plântulas com maior comprimento da raiz (FIGURA 7A), maior número de folhas e maior peso fresco (FIGURA 7D) em relação as plântulas cujas sementes foram embebidas em GA₃. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas para o comprimento da raiz (FIGURA 7A) e número de folhas (FIGURA 7C) em relação as diferentes concentrações de GA₃. Já em relação ao peso fresco a concentração de 250 mg L⁻¹ de GA₃, foi maior que as concentrações de 500, 750 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃, que não diferiram entre si (FIGURA 7D).

Quanto ao comprimento da parte aérea foi observado comportamento contrário. As sementes embebidas por GA₃ apresentaram um maior comprimento da parte aérea, quando comparadas as plântulas cujas sementes foram embebidas em água (FIGURA 7B). No entanto não foram observadas diferenças significativas no comprimento da parte aérea em relação as diferentes concentrações de GA₃ (FIGURA 7B).

Figura 7 – Análises de crescimento de plântulas de ravenala germinadas *in vitro* após 90 dias de cultivo, cujas sementes foram embebidas em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹).



Legenda: (A) Comprimento da raiz (cm). (B) Comprimento da parte aérea (cm). (C) Número de folhas (un). (D) Peso fresco (g). Barra 1 cm.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As barras correspondem ao erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2020).

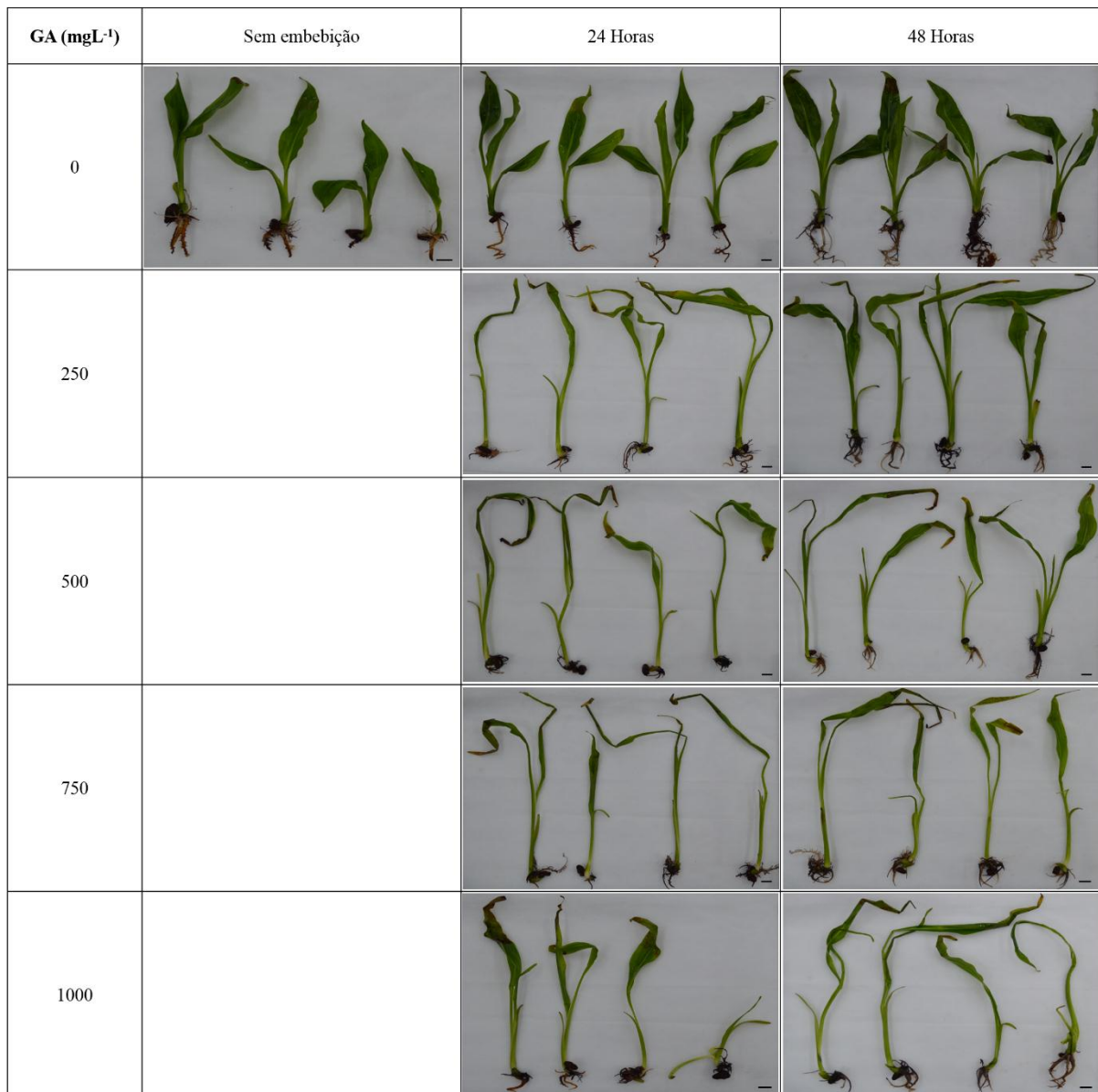
Diante desses resultados obtidos para o comprimento da raiz, número de folhas e peso fresco pode-se inferir que as concentrações 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃ resultam em redução da raiz, do número de folhas e conseqüentemente a diminuição do peso fresco. Possivelmente por essas concentrações serem tóxicas, pois esses reguladores vegetais, atuam em concentrações pequenas (ECCO et al., 2019), tendo em vista que em altas concentrações de GA₃ as raízes podem apresentar níveis quase saturados desse fitohormônio o que dificultaria o seu crescimento e desenvolvimento (TANIMOTO, 2012; TUAN et al., 2019). Provavelmente as concentrações de GA₃ testadas, afetaram o desenvolvimento foliar, visto que, em concentrações mais altas o GA₃ pode ser inibidor, dificultando a promoção do crescimento da planta, no qual pode ser observado pela diminuição do peso fresco, salientando que seus efeitos variam de acordo com cada espécie (ZHONG et al., 2015; TUAN et al., 2019). Contudo, em baixas concentrações o GA₃ tem a capacidade de promover o aumento do crescimento dos tecidos das plantas influenciando o seu desenvolvimento (PAPARELLI et al., 2013).

Já diante dos resultados encontrados para o comprimento da parte aérea pode-se inferir que as concentrações 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃ proporcionaram aumento na parte aérea. O GA₃ aumenta a plasticidade da parede celular e a divisão das células, proporcionando o alongamento de partes aéreas dos vegetais e sua aplicação dá origem a plantas mais alongadas (TUAN et al., 2019). A ação da giberelina na parte aérea é bem conhecida e relatada em diferentes espécies, promovendo maior crescimento da parte aérea (CAMPOS; ONO; RODRIGUES, 2009; TORRES; BORGES, 2013; PAIXÃO et al., 2018). Desse modo, pode-se observar que a principal ação benéfica do GA₃ está relacionada com o desenvolvimento da parte aérea (FIGURA 8), pois a principal ação exercida pela aplicação de giberelinas está relacionada ao desenvolvimento da parte aérea das mesmas, especialmente no alongamento do caule (TAIZ et al., 2017; ECCO et al., 2019). Há estudos que corroboram com os resultados encontrados onde a aplicação de GA₃ aumentou significativamente a parte aérea, porém houve diminuição da raiz (WANG et al., 2015).

A embebição em 24 e 48 horas em GA₃ nas concentrações (250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) proporcionaram aumento no comprimento da parte aérea (FIGURA 8), já a embebição sem GA₃ (24h e 48h) a parte aérea foi menor (FIGURA 8). De forma contrária no tratamento

sem GA₃ (24h e 48h) foi observado maiores valores para o comprimento da raiz, número de folhas e o peso fresco das plantas (FIGURA 8).

Figura 8 – Plântulas de ravenala após 90 dias de cultivo *in vitro*, cujas sementes foram embebidas em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹).



Legenda: Tabela com as diferentes concentrações 0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃, nos diferentes tempos 0, 24 e 48 horas de embebição.

Barra 1 cm.

Fonte: Do autor (2020).

Como observado nas diferentes concentrações de GA₃ no meio de cultivo, na embebição o principal efeito benéfico do GA₃ observado nas plântulas está relacionado com o desenvolvimento da parte aérea. E em altas concentrações o GA₃ pode afetar o crescimento e

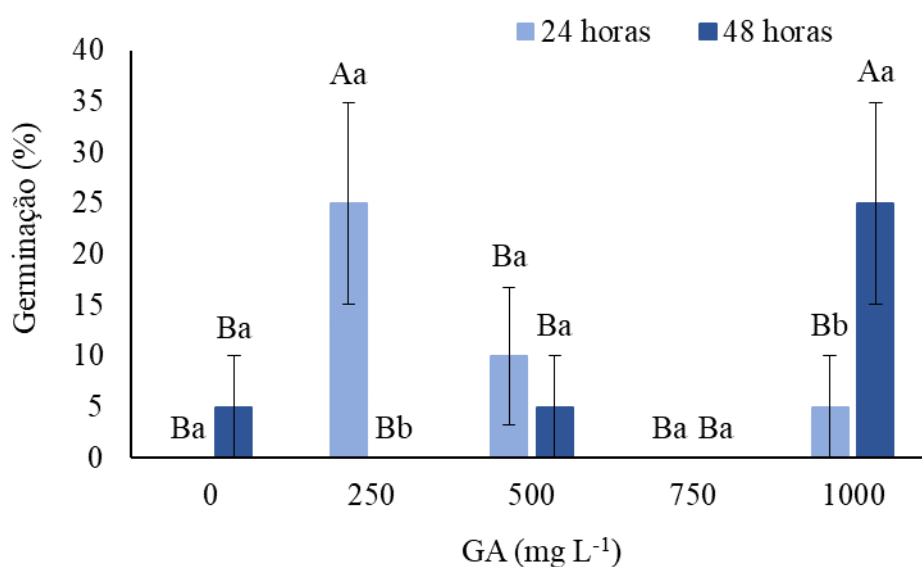
desenvolvimento das plântulas. Nos tratamentos sem a presença de GA₃ a parte aérea é menor, porém as raízes, o número de folhas e o peso fresco são maiores.

3.2 Efeito do ácido giberélico na germinação de ravenala crescimento das plântulas *ex vitro*.

3.2.1 Superação da dormência com embebição em diferentes concentrações de GA₃ *ex vitro*

Não foram observadas diferenças significativas quando comparado o tratamento sem embebição com os tratamentos de 24h e 48h de embebição em GA₃. Em relação ao tempo de 24h de embebição, a concentração de 250 mg L⁻¹ de GA₃ apresentou a maior (25%) porcentagem de germinação (Figura 17). No tempo de 48h, a concentração de 1000 mg L⁻¹ de GA₃ apresentou a maior (25%) porcentagem de germinação (Figura 9). Quando avaliado o tempo de embebição em relação a cada concentração de GA₃ observa-se que na concentração de 250 mg L⁻¹ o tratamento com 24h de embebição apresentou maior porcentagem de germinação do que o de 48h (Figura 9). E na concentração de 1000 mg L⁻¹ de GA₃, o tratamento com 48h apresentou maior porcentagem de germinação do que o de 24h (Figura 9). Nas concentrações de 0, 500 e 750 mg L⁻¹ de GA₃ não foram observadas diferenças significativas quanto a porcentagem de germinação.

Figura 9 – Porcentagem de germinação *ex vitro* de sementes de ravenala após 90 dias de cultivo, cujas sementes foram embebidas em diferentes concentrações (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) de GA₃ por diferentes tempos (24 e 48 horas).



Legenda: Médias seguidas da mesma letra maiúscula, dentro do mesmo tempo de embebição, e minúscula, dentro da mesma concentração de GA, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

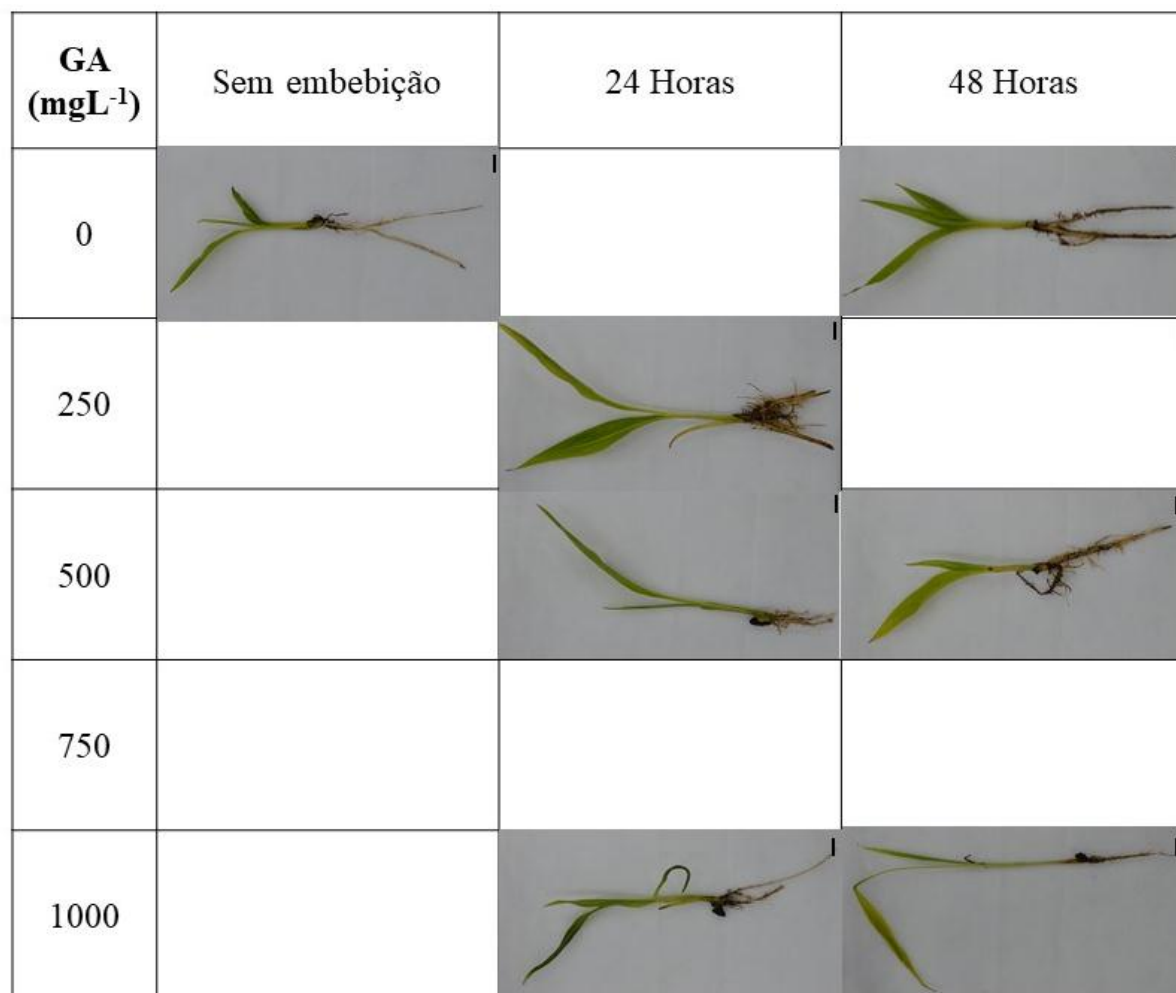
Os resultados obtidos com embebição em solução com diferentes concentrações de GA₃ *ex vitro* foram baixas. No processo de embebição ocorre a retomada das etapas de desenvolvimento das sementes, que consiste na reidratação dos tecidos destas, visto que, o entendimento desta fase permite inferências sobre o tempo e a quantidade de água necessária para uma semente emitir radícula, além de conceder informações sobre as influências dos tegumentos neste processo, servindo como subsídio para determinação do tempo de embebição, bem como, o início do processo de germinação (RABANNI et al., 2013).

As concentrações de GA₃ utilizadas podem ter sido insuficientes para a germinação *ex vitro*, visto que as giberelinas promovem quebra da dormência e germinação de sementes (TUAN et al., 2019). Os resultados obtidos contrariam um estudo em sementes de ravenala com embebição em 300 mg L⁻¹ de GA₃ que foi efetivo, onde tiveram efeito intensificador mais pronunciado sobre a porcentagem de germinação, apresentando aproximadamente 75% de germinação, entretanto as sementes foram submetidas anteriormente a imersão em água morna (28 °C) por 24 horas, e posteriormente imersas em solução com GA₃ (HELAL; EISA, 2008).

A maior porcentagem de germinação de sementes de ravenala, foi alcançada na germinação *in vitro*, isto ocorreu provavelmente pois na propagação *in vitro* as sementes têm disponível todos os nutrientes necessários no meio de cultura para a germinação (PINTO; LAMEIRA, 2001). A propagação *in vitro* pode ser vantajosa em detrimento da propagação convencional, visto que através da micropropagação é possível obter um elevado número de plantas em um curto período de tempo e espaço reduzido, permitindo também acelerar a germinação, (PIJUT et al., 2012). Sendo passível de aplicação tanto em escala comercial quanto em abordagens de estudos básicos de fisiologia vegetal (STASOLLA; THORPE, 2011).

Não foram observadas diferenças significativas nas análises de crescimento das plântulas de ravenala cultivadas *ex vitro* (FIGURA 10). As médias do comprimento da parte aérea e raiz das plântulas germinadas *ex vitro* correspondem a 7,14 e 4,23 cm, respectivamente. O número de folhas equivaliu a uma média de 1,73 e o peso fresco a 1,78 g.

Figura 10 – Plântulas de ravenala após 90 dias de cultivo *ex vitro*, cujas sementes foram embebidas em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹).



Legenda: Tabela com as diferentes concentrações 0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃, nos diferentes tempos 0, 24 e 48 horas de embebição
Barra 1 cm.

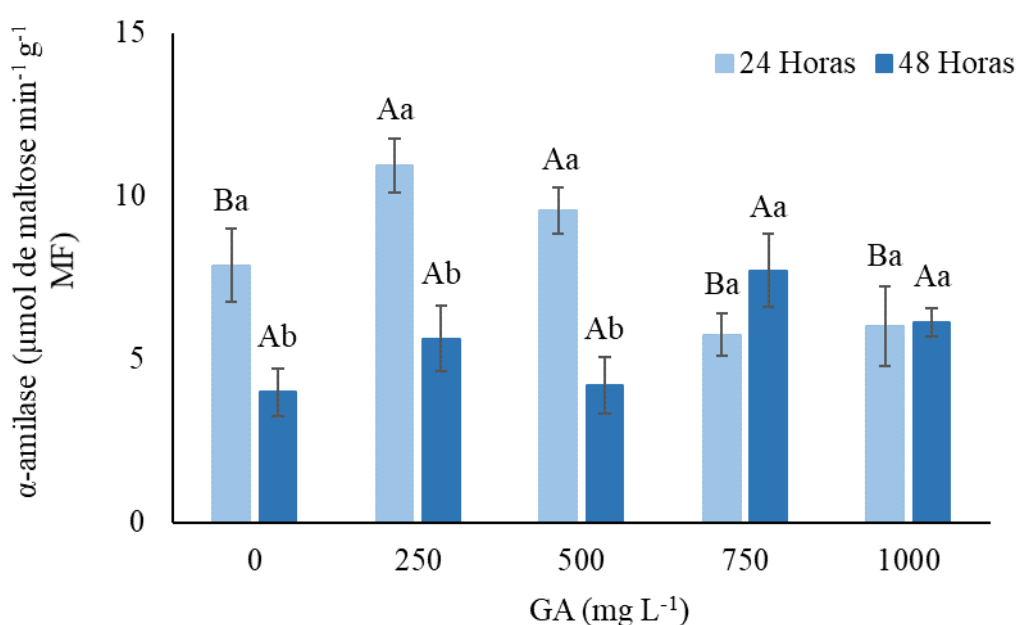
Fonte: Do autor (2020).

3.3 Determinação da atividade da α -amilase

A embebição das sementes de ravenala pelo tempo de 24 horas nas concentrações de 250 e 500 mg L⁻¹ de GA₃ ocasionaram em uma maior atividade da α -amilase quando comparados aos demais tratamentos. Em relação ao tempo de 48h de embebição, não foram

observadas diferenças significativas quanto a atividade da α -amilase em relação as concentrações de GA₃. No tratamento controle e nas concentrações de 250 e 500 mg L⁻¹ de GA₃ a atividade da α -amilase foi maior no tempo de 24h de embebição do que no tempo de 48h. Já nas concentrações de 750 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃ não foram observadas diferenças significativas quanto ao tempo de embebição (Figura 11).

Figura 11 – Determinação da atividade da α -amilase em sementes de ravenala, submetidas a embebição em diferentes concentrações de GA₃ (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L⁻¹) por diferentes tempos (24 e 48 horas).



Legenda: Médias seguidas da mesma letra maiúscula, dentro do mesmo tempo de embebição, e minúscula, dentro da mesma concentração de GA₃, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2020).

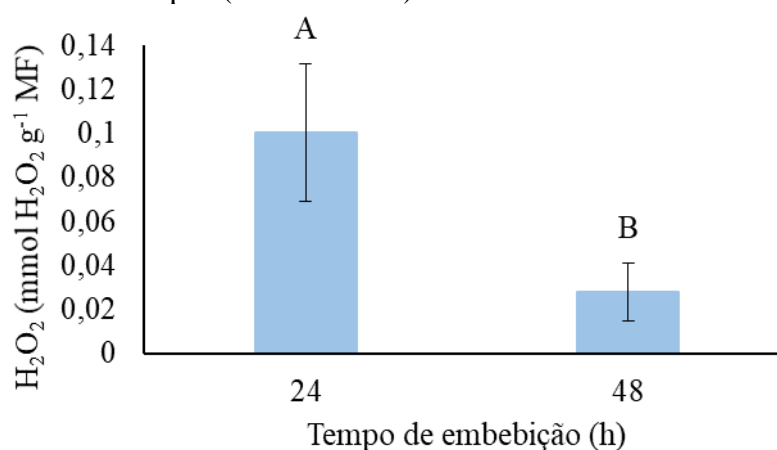
De acordo com os resultados obtidos, na concentração de 250 mg L⁻¹ e 500 mg L⁻¹ de GA₃, no tempo de 24 horas a atividade da enzima foi maior, podendo inferir que a quantidade de GA₃ bioativo nessas concentrações é maior, visto que no processo de germinação de sementes, os GAs bioativos induzem a expressão do gene da α -amilase e a síntese da α -amilase (LIU et al., 2018). O ácido giberélico ativa a síntese de α -amilase causando a degradação do endosperma e a mobilização de reservas. Com isso, provavelmente essas concentrações foram mais efetivas na ativação da síntese dessa enzima, e identificar a atividade da α -amilase é fundamental, visto que essa atividade pode ser detectada durante o início da germinação das sementes (OLIVEIRA et al., 2013).

Provavelmente no controle (0 mg L^{-1} de GA_3) a quantidade de GAs bioativos endógenos foram menos efetivos na ativação da síntese de α -amilase. Visto que a deficiência de GA_3 bioativo diminui a atividade da α -amilase por meio da regulação negativa da expressão do gene da α -amilase (BEWLEY et al., 2013; LIU et al., 2018). Em concentrações maiores o GA_3 pode ser fitotóxicos, visto que giberelinas em quantidades excessivas pode proporcionar efeitos negativos, podendo diminuir a atividade da α -amilase e conseqüentemente inibir a germinação das sementes (LIU et al., 2018), geralmente a redução na porcentagem de germinação é acompanhada por uma redução na atividade da α -amilase (LI; YANG, 2020).

3.4 Determinação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica

A embebição das sementes de ravenala em diferentes concentrações de GA_3 não alterou o teor de peróxido de hidrogênio das sementes, de forma que não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento controle e os tratamentos com GA_3 , independentemente da concentração. No entanto, o tempo de embebição de 24h promoveu um maior conteúdo de peróxido de hidrogênio quando comparado ao tempo de 48h de embebição (Figura 12).

Figura 12 – Determinação do peróxido de hidrogênio de sementes de ravenala, submetidas a embebição por diferentes tempos (24 e 48 horas).



Legenda: Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

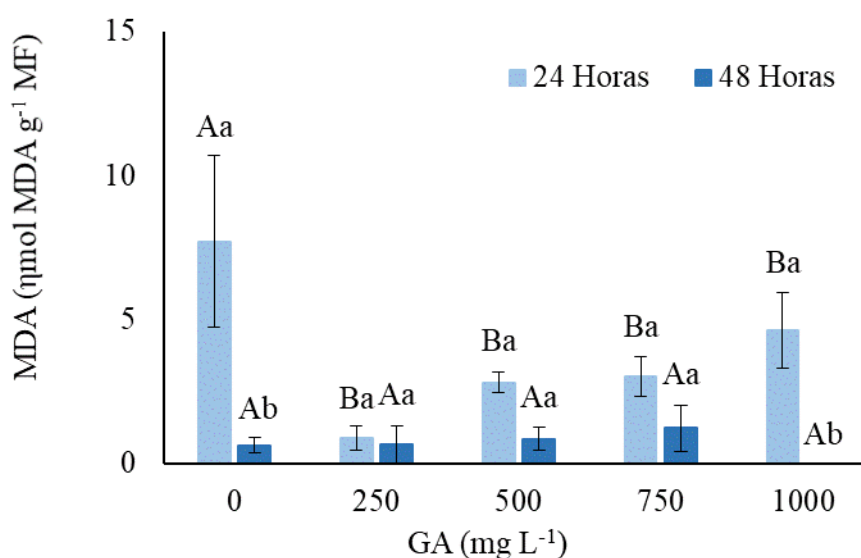
Fonte: Do autor (2020).

De acordo com os resultados o tempo de 24 horas de embebição promoveu um maior conteúdo de peróxido de hidrogênio que o tempo de 48 horas de embebição. Possivelmente a partir desse período iniciou o processo de germinação e foi suficiente para a quebra da

dormência, visto que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) considerado centro de sinalização para a regulação e superação da dormência e germinação com ação de GA e ABA (MULLER et al., 2009). Para a regulação é essencial um acúmulo de H_2O_2 pelo maquinário antioxidante celular e assim atingir um equilíbrio entre a sinalização oxidativa que promove a germinação e o dano oxidativo que previne ou retarda a germinação (WOJTYLA et al., 2016). A produção de EROs durante o processo de germinação contribui para a mobilização de reserva por meio de modificações oxidativas das proteínas armazenadas (ISHIBASHI et al., 2017).

A peroxidação lipídica no tratamento controle foi maior do que nos tratamentos cujas sementes foram embebidas em GA_3 (Figura 13). Em relação ao tempo de 48 horas não foram observadas diferenças significativas, quanto a peroxidação lipídica, entre o tratamento controle e as diferentes concentrações de GA_3 (Figura 13). No tratamento controle observa-se que a maior peroxidação lipídica ocorre no tempo de 24 horas em relação ao tempo de 48 horas, o mesmo ocorre no tratamento com 1000 mg L^{-1} de GA_3 . Nos demais tratamentos não são observadas diferenças significativas em relação ao tempo de embebição das sementes e a concentração de GA_3 (Figura 13).

Figura 13 – Determinação da peroxidação lipídica em sementes de ravenala, submetidas a embebição em diferentes concentrações (0, 250, 500, 750 e 1000 mg L^{-1}) de GA_3 por diferentes tempos (24 e 48 horas).



Legenda: Médias seguidas da mesma letra maiúscula, dentro do mesmo tempo de embebição, e minúscula, dentro da mesma concentração de GA_3 , não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: do autor (2020).

De acordo com os resultados observados, a presença de GA₃ reduz a peroxidação lipídica, e no tempo de 24 horas há maior peroxidação lipídica do que no tempo de 48 horas com o peróxido de hidrogênio. Tendo assim maior peroxidação lipídica onde se tem maior teor de peróxido de hidrogênio. Visto que o estresse causado pelas EROs ocasiona a degradação oxidativa de lipídios, conhecida como peroxidação lipídica (SAISANTHOSH et al., 2018; SCHWEMBER; BRADFORD, 2010). Reguladores vegetais podem agir como protetores contra o estresse, apresentando maiores atividades de enzimas antioxidantes no fim do ciclo, mantendo assim baixo nível de peroxidação de lipídios (SOUSA et al., 2016). A presença de giberelina pode diminuir os efeitos deletérios do estresse oxidativo pela redução da peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio, aliado ao aumento nas atividades de enzimas antioxidantes (YU et al., 2009).

4 CONCLUSÕES

Sementes submetidas à imersão em álcool 70% por 30 segundos, e posteriormente submersas por 15 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5%, com posterior tríplice lavagem em água destilada e autoclavada é eficaz para a desinfestação de sementes de ravenala.

Para superação da dormência de sementes de ravenala e germinação *in vitro* recomenda-se o uso de 20 µM de GA₃ no meio de cultura, e embebição a partir de 24 horas independente do uso de GA₃. Diante disso, a embebição se torna mais vantajosa visto que não há necessidade de uso de GA₃.

Para propagação *ex vitro* a embebição nas concentrações de GA₃ testadas proporcionaram baixas porcentagens de germinação. E dessa forma, a propagação *in vitro* se mostrou mais eficaz.

Na determinação da α-amilase, do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica o tempo de embebição de 24h nas diferentes concentrações de GA₃ testadas promoveu maior atividade enzimática.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. M.; RODRIGUES, J.G.L. Desenvolvimento de plantas através da interferência de auxinas, citocininas, etileno e giberelinas. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v. 9, n. 3, p. 111-117, 2016.
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 2. ed. San Diego, Academic/Elsevier, p. 1602, 2014.
- BEWLEY, D. et al. Germination. In: **Seeds: Physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. Berlin: Springer Science & Business Media, p. 133–181, 2013.
- CAMPOS, M. F. DE; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento da parte aérea de plantas de soja em função de reguladores vegetais. **Revista Ceres**. v.56, n.1, p. 74-79. 2009.
- CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, p. 619-631, 2009.
- DA SILVA, C. P., PISTORI, M. F., BLINI, R. C. B., DE SANTANA, A. P. L. Reguladores vegetais no crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro*. **Agricultura 4.0**, 2020.
- DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action**. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands, p. 750 2004.
- DIAS, G. M. Quality maintenance Tropical Plants. **Ornamental Horticulture**, v. 22, n. 3, p. 256-258, 2016.
- ECCO, Martios et al. Uso de diferentes tratamentos de bioestimulante vegetal na cultura da soja. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 2, p. 269-286, 2019.
- EDWARD, F.G. et al. *Ravenala madagascariensis*: **Travelers-tree**. IFAS, Univ. Florida. 2006. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/ST/ST56500.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2020.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.
- GASPARINI, K. et al. Elevated CO₂ induces age-dependent restoration of growth and metabolism in gibberellin-deficient plants. **Planta**, v. 250, n. 4, p. 1147-1161, 2019.
- HELAL, A. E.; EISA, G. Germination and seedling growth of traveler's tree as affected by some pre-germination treatments. **Journal of Productivity and Development**, v. 13, n. 2, p. 271-287, 2008.
- ISHIBASHI, Y. et al. The interrelationship between abscisic acid and reactive oxygen species plays a key role in barley seed dormancy and germination. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 275, 2017.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Brazilian consumption of flowers and ornamental plants: habits, practices and trends. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 2, p. 178-184, 2017.

KUMAR, S. S. et al. Effect of growth regulators on seed germination o paradise. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 7, n.1, p. 101-104, 2018.

LI, Q.; YANG, A. Comparative studies on seed germination of two rice genotypes with different tolerances to low temperature. **Environmental and Experimental Botany**, v. 179, p. 104216, 2020.

LIU, L. et al. Salinity inhibits rice seed germination by reducing α -amylase activity via decreased bioactive gibberellin content. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 275, 2018.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed., Londrina: ABRATES, p. 660, 2015.

MCLENDON, C. *Ravenala madagascariensis*. Florida, USA. 2005. Disponível em: <http://www.floridata.com/ref/R/rave_mad.cfm>. Acesso em: 15 out. 2020.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

MULLER, L. et al. In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 150, n. 4, p. 1855-1865, 2009.

OLIVEIRA, G. E. et al. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 37, n. 1, p. 40-48, 2013.

PAIVA, P. D. O. et al. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1031-1037, 2004.

PAIXÃO, M. V. S. et al. ÁCIDO GIBERÉLICO NO DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE ROMÂZEIRA. **Anais da 30ª Semana Acadêmica do Curso de Agronomia do CCAE/UFES-SEAGRO**, 2018.

PAPARELLI, E.; et al. Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in Arabidopsis. **Plant Cell.**, v. 25, n. 10, p. 3760-3769, 2013.

PIJUT, Paula M. et al. *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species - A review (2001-2011). **Propagation of Ornamental Plants**, v. 12, n. 1, p. 25-51, 2012.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, v. 58, n. 1, p. 73-78, 2001.

QUEIROZ, J. R. G.; SILVA, JR., A. C.; MARTINS, D. Herbicide Selectivity in Tropical Ornamental Species. **Planta daninha**, v. 34, n. 4, p. 795-802, 2016.

RABBANI, A. R. C.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A.; VASCONCELOS, M. C. Pré-embebição em sementes de moringa. **Scientia Plena**, v.9, n.5, 2013.

SAISANTHOSH, K. et al. Role of enzymatic antioxidants defense system in seeds. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 7, n. 1, p. 584-594, 2018.

SANTOS et al. Characterization of genetic diversity of bird-of-paradise accessions. **Ornamental Horticulture**, v. 24, p. 50-57, 2018.

SCHWEMBER, A.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 15, p. 4423-4436, 2010.

SINGH, R. et al. Advances in understanding the role of growth regulators in plant growth and development *in vitro*-III. Inhibitors of growth regulators. **Indian Forester**, v. 142, n. 11, p. 1065-1072, 2016.

SOTTIRATTANAPAN, P. et al. Purification and characterization of amylase from roots of *Paederia foetida* Linn. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 10, p. 329-335, 2017.

SOUSA, M. C. **Reguladores vegetais e nutrientes minerais no metabolismo de plantas de tomateiro**. Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil, 2016.

STASOLLA, C.; THORPE, T. Tissue culture: historical perspectives and applications. In: KUMAR, A.; SOPORY, S. (Ed.). **Applications of Plant Biotechnology**. Dordrecht: The Netherlands Kluwer Academic Publishes, 2011.

SUROOWAN, S.; MAHOMOODALLY, F. *Ravenala madagascariensis*. In: Underexplored Medicinal Plants from Sub-Saharan Africa. **Academic Press**, p. 247-252, 2020.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6th. Porto Alegre, Artmed, 2017.

TANIMOTO, E. Tall or short? Slender or thick? A plant strategy for regulating elongation growth of roots by low concentrations of gibberellin. **Annals of Botany**, v. 110, p. 373-381, 2012.

THOMPSON, K.; MORGAN, H. D. **Seed Germination Database**. Washington, USA. 2008. Disponível em: <<http://www.backyardgardener.com/tm.html>>. Acesso em: 15 out. 2020.

TORRES, S. B. et al. Germination of *Ravenala madagascariensis* (Strelitziaceae) seeds submitted to chemical scarification. **Seed Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 154-157, 2013.

TORRES, R.C.; BORGES, K.C.A. de S. Ação da giberelina no crescimento de pimenta (*Capsicum frutescens*). **Cadernos UniFOA**. Edição especial Ciências da Saúde e Biológicas. n.1. 2013.

TUAN, P. A. et al. Molecular mechanisms of seed germination. In: **Sprouted Grains**. AACC International Press, p. 1-24, 2019.

VELIKOVA, V. et al. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid raintreated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

WANG, G. L. et al. Exogenous gibberellin altered morphology, anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in carrot root and shoot. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 290, 2015.

WOJTYLA, L. et al. Different modes of hydrogen peroxide action during seed germination. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 66, p. 1-16, 2016.

YU, K. et al. Senescence of aerial parts is impeded by exogenous gibberellic acid in herbaceous perennial *Paris polyphylla*. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 8, p. 819830, 2009.

ZHONG, C.; et al. Gibberellic acid-stimulated Arabidopsis serves as an integrator of gibberellin, abscisic acid, and glucose signaling during seed germination in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 169, p. 2288–2303, 2015.