



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

CULTIVO DE EMBRIÃO *IN VITRO* DA GUARIROBEIRA

[*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

BERILDO DE MELO

2000

BERILDO DE MELO

CULTIVO DE EMBRIÃO *IN VITRO* DA GUARIROBEIRA

[*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL
2000

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da UFLA

Melo, Berildo de

Cultivo de embrião *in vitro* da Guarirobeira. [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] / Berildo de Melo.- Lavras: UFLA, 2000.

117p.: il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Tese (Doutorado)-UFLA.

Bibliografia.

1.*Syagrus*. 2.Guarirobeira. 3.Guariroba. 4.Micropropagação. 5.Embrião. 6.Biotecnologia. 7.Palmito. 8.*in vitro*. 9.Cultura de tecido. I.Universidade de Federal de Lavras. II.Título.

CDD- 634.9745

BERILDO DE MELO

**CULTIVO DE EMBRIÃO *IN VITRO* DA GUARIROBEIRA
[*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do programa de pós-
graduação em Agronomia, área de concentração em
Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

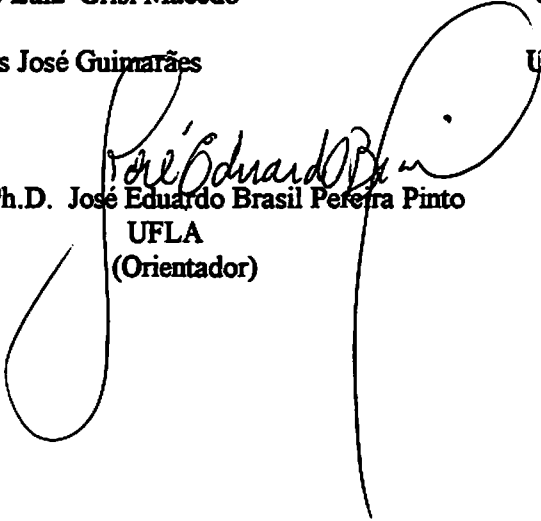
APROVADA em 18 de fevereiro de 2000

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz UFU

Prof. Dr. José Ricardo Peixoto UnB

Prof. Dr. Renato Luiz Grisi Macedo UFLA

Prof. Dr. Rubens José Guimarães UFLA



Prof. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais

Samuel e Izolêta,

À minha esposa

Maria do Desterro,

Aos meus irmãos, irmã e amigos

DEDICO

Ao progresso da Ciência

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade federal de Uberlândia-MG-UFU pela oportunidade concedida para realização deste curso.

À Universidade Federal de Lavras-UFLA, através de seus dirigentes e professores, pela orientação e ensinamentos ministrados.

Ao Programa Institucional de Capacitação de Docentes e Técnicos-PICDT-CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela excelente orientação, incentivo e amizade.

A prof. Ofélia Creuza Rosante Gomes pelo apoio na liberação junto ao Departamento de Agronomia da UFU.

Aos professores, José Magno Queiroz Luz, José Ricardo Peixoto, Janice Guedes de Carvalho, Renato Luiz Grisi Macedo e Rubens José Guimarães pela participação na banca de defesa de tese.

Ao funcionário Evaldo Souza Arantes do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura-UFLA pela valiosa colaboração na condução dos experimentos.

Aos prof. Antônio Cláudio Davide e à entomologista Lenira Viana Costa Santa Cecília pelo apoio na execução de experimentos.

Aos colegas: Alan, Artiaga, André, Bárbara, Evaristo, Flávia, Francisco, Haroldo, Heráclito, Humberto, Paulo Sérgio, Paulo Roberto e Regina.

Ao mano Benjamim, pela colaboração e apoio recebido.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

BERILDO DE MELO, filho de Samuel de Melo e Izolêta Rodrigues de Melo, nasceu em Monte Carmelo- MG, no dia 08 de março de 1953.

Conclui os curso de Mestre agrícola no Colégio Agrícola de Rio Verde-GO, em 1971, e de Técnico Agrícola no Colégio Agrícola de Brasília-DF., em 1974.

Graduou-se em Agronomia pela Escola Superior de Agricultura de Lavras-ESAL, em junho de 1978.

Realizou o curso de pós-graduação, Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, no período de 1978 a 1980, na Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Em 1981 foi contratado pela Universidade Federal do Amazonas-Manaus-AM para exercer a função de professor, permanecendo na Instituição até dezembro de 1989. A partir desta data, foi contratado pela Universidade Federal de Uberlândia-MG como professor.

Em março de 1996, iniciou, na Universidade Federal de Lavras-UFLA, o curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, concluindo-o em fevereiro de 2000.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii

CAPÍTULO 1:

1 Introdução geral.....	1
2 Referencial Teórico geral.....	4
3 Referências Bibliográficas.....	12

CAPÍTULO 2: Uso de diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas *in vitro* na cultura do embrião da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

1 Resumo.....	18
2 Abstract.....	19
3 Introdução.....	20
4 Referencial teórico.....	20
5 Material e Métodos.....	24
6 Resultados e Discussão.....	26
7 Conclusões.....	36
8 Referências Bibliográficas.....	37

CAPÍTULO 3: Controle da contaminação para a germinação *in vitro* do embrião da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

1 Resumo.....	43
2 Abstract.....	44
3 Introdução.....	45
4 Referencial teórico.....	46
5 Material e Métodos.....	50
6 Resultados e Discussão.....	52
7 Conclusões.....	58
8 Referências Bibliográficas.....	59

CAPÍTULO 4: Cultura de embrião *in vitro* em combinações de MS com TDZ e BAP no desenvolvimento da plântula da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

1	Resumo.....	62
2	Abstract.....	63
3	Introdução.....	64
4	Referencial teórico.....	65
5	Materiais e Métodos.....	70
5.1	Aspecto gerais.....	70
5.2	Estabelecimento da guarirobeira <i>in vitro</i> , a partir do embrião em diferentes combinações de MS com BAP.....	72
5.3	Estabelecimento da guarirobeira <i>in vitro</i> , a partir do embrião em diferentes combinações de MS com TDZ.....	72
6	Resultados e Discussão.....	73
6.1	Estabelecimento da guarirobeira <i>in vitro</i> , a partir do embrião em diferentes combinações de MS com BAP.....	73
6.2	Estabelecimento da guarirobeira <i>in vitro</i> , a partir do embrião em diferentes combinações de MS com TDZ.....	82
7	Conclusões.....	94
8	Referências Bibliográficas.....	94

CAPÍTULO 5: Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no comprimento e peso das matérias secas das raízes e parte aérea da plântula da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

1	Resumo.....	100
2	Abstract.....	101
3	Introdução.....	102
4	Referencial teórico.....	102
5	Material e Métodos.....	105
6	Resultados e discussão.....	106
7	Conclusões.....	112
8	Referências Bibliográficas.....	113
	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ANA= ácido α -naftalenoacético**
- **AIB= ácido indolbutírico**
- **AIA= ácido 3-indolacético**
- **BAP= 6- benzilaminopurina**
- **TDZ= N-phenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia**
- **MS= Murashige e Skoog (1962)**
- **PVP= Polivinilpirrolidone**

RESUMO

MELO, Berildo de. Cultivo de embrião *in vitro* da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. Lavras: UFLA, 2000. 117p. (Tese de Doutorado em Agronomia).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o cultivo *in vitro* da guarirobeira. Foram efetuados diversos experimentos na Universidade Federal de Lavras-MG. No capítulo 1, foram compilados os informes genéricos sobre as palmeiras produtoras de palmito normal e amargo, no capítulo 2 avaliou-se o uso de antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento da plântula da guarirobeira, *in vitro*. Concluiu-se que o ácido ascórbico foi o antioxidante mais eficiente no controle da oxidação e que proporcionou a maior porcentagem de germinação dos embriões, seguido do carvão ativado; o PVP-40 e o ambiente escuro, foram pouco eficientes no controle da oxidação e as porcentagens de germinação foram sensivelmente reduzidas; o número e tamanho médios das folhas da plântula foram superiores para os antioxidantes: PVP-40, ácido ascórbico, carvão ativado e ambiente claro do que o ambiente escuro-14 dias; a quebra de dormência e o cultivo do embrião *in vitro* viabilizaram um alto índice de germinação; e não houve enraizamento de forma natural, até aos 110 dias de cultivo *in vitro*. No capítulo 3, avaliou-se o controle da contaminação sobre a germinação *in vitro* do embrião da guarirobeira. Verificou-se que o álcool etílico-70% usado na desinfestação do fruto semente associado com benomyl (1g/L) no embrião, reduziram drasticamente a contaminação fúngica e redundaram em alto índice de germinação dos embriões, *in vitro*; o benomyl (1g/L) não controlou com eficiência o *Fusarium sp*, na desinfestação do embrião, reduzindo acentuadamente a porcentagem de germinação *in vitro*; é inviável a cultura da guarirobeira *in vitro* a partir de fruto semente e embrião contaminados com fungo saprofítico, sem a desinfestação com álcool etílico-70% e do benomyl (1g/L), respectivamente. O capítulo 4, objetivou o estabelecimento da guarirobeira através da cultura de embrião *in vitro* em diferentes combinações de MS com TDZ e BAP. Concluiu-se que a redução na concentração dos sais de MS até 1/4 da força total diminuiu gradativamente o tamanho médio da folha da plântula; o peso médio da matéria seca da plântula, aumentou gradativamente na proporção em que as concentrações dos sais do MS foi até aproximadamente 75% da força total; à medida que aumentou a concentração do BAP e TDZ, ocorreu uma redução no

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto-UFLA, Lavras-MG

tamanho médio da folha e peso da matéria seca da plântula, também o número médio de folha reduziu com aumento da concentração do TDZ; o BAP e o TDZ nas concentrações utilizadas não induziram a brotação lateral (perfilho) na plântula. O capítulo 5 avaliou-se os efeitos de ANA e AIB *in vitro* no comprimento médio das raízes e peso da matéria seca da parte aérea e raízes da plântula da guarirobeira. Concluiu-se que o ANA foi eficiente na formação das raízes fasciculadas *in vitro* na plântula da guarirobeira, enquanto o AIB foi ineficiente; o ANA promoveu uma maior produção de matéria seca da parte aérea da plântula do que o AIB; o MS-completo acrescido de ANA proporcionaram um enraizamento adequado *in vitro* da plântula da guarirobeira em toda as fases da rizogênese.

ABSTRACT

MELO, Berildo de. *In vitro* embryo cultivation of the guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. Lavras: UFLA, 2000. 117p. (Thesis- Doctorate in Agronomy).

The present experiments were designed to evaluate the *in vitro* cultivation of the guarirobeira. Several works were performed at the Universidade Federal de Lavras-MG. In Chapter 1, the generic reports on palm trees bearing normal and bitter palmetto were compiled. In chapter 2, the use of antioxidants in the control of oxidation, germination and development of the guarirobeira seedling was evaluated *in vitro*. It followed that ascorbic acid was the most efficient antioxidant in oxidation control and which provided the highest percentage of germination of the embryos, followed by the activated charcoal; both PVP-40 and the dark environment were poorly efficient in oxidation control and the percentages of germination were markedly reduced, the number and average sizes of the leaves of the seedling were superior for the antioxidants: PVP-40, ascorbic acid, activated charcoal and light environment than the dark environment-14 days, dormancy break and the *in vitro* embryo cultivation make a high index of germination viable and there was no rooting in the natural form until at 110 days' *in vitro* cultivation. In chapter 3, the control of the contamination upon the *in vitro* germination of the guarirobeira embryo was evaluated. It was found that 70% ethylic alcohol used in the deinfestation

of the seed fruit associated with benomyl (1g/L) in embryo deinfestation markedly reduced the fungal contamination and caused a high germination index of the embryos, *in vitro*; benomyl (1g/L) did not control efficiently *Fusarium sp* in embryo deinfestation, drastically reducing the *in vitro* germination percentage; *in vitro* guarirobeira crop is unfeasible from seed fruit and embryo contaminated with saprophytic fungi without the deinfestation with 70% ethylic alcohol and of benomyl (1g/L), respectively. Chapter 4 aimed at the establishment of the guarirobeira through *in vitro* embryo culture at different combinations of MS with TDZ and BAP. It followed that reduced concentration of the MS salts up to 1/4 of the total strength decreased gradually the average size of the leaf of the seedling, the average weight of the dry matter of the seedling, gradually increased at the ratio in which the concentrations of MS salts was up to about 75% of the total strength as the concentration of BAP and TDZ increased, a reduction in the average size of the leaf and dry matter weight of the seedling occurred and in addition the average number of leaf reduced with increase of the concentration of TDZ, BAP and TDZ at the concentrations employed did not induce the lateral sprouting (tiller) in the seedling. In chapter 5, the *in vitro* effects of NAA and IBA on the average length of the roots and weights of the dry matters of the aerial part and root of the guarirobeira seedling. It followed that NAA was the most efficient in forming fasciculate roots *in vitro* on the guarirobeira seedling whereas IBA was inefficient, NAA promoted a greater dry matter yield of the aerial part of the seedling than IBA, complete-MS, added from NAA provided a suitable *in vitro* rooting, of the guarirobeira seedling in all the phases of rhizogenesis.

Adviser: José Eduardo Brasil Pereira Pinto–UFLA, Lavras-MG.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

A guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], família palmae, sub-família cocosoídeae, produtora de palmito com sabor amargo, tem grande importância econômica, particularmente em regiões tropicais, notadamente na área de cerrado. Por isso, plantações de genótipos superiores com rendimento acima da média poderão contribuir de forma significativa para o incremento da produtividade e uma maior lucratividade para o produtor de palmito.

O Brasil é o maior produtor e exportador de palmito em conserva do mundo. Contudo, a exploração na sua maioria é resultante de uma atividade extrativista das reservas naturais, ainda existentes (Bovi, 1993).

De acordo com o IBGE (1996), a produção anual de palmito foi de 21.596 toneladas, sendo a maioria produzida em regime extrativista na floresta amazônica, notadamente no Estado do Pará (83%).

O Brasil participa com 95% da exportação mundial de palmito com receitas médias anuais de 30 milhões de dólares e com tendência de expansão constante, além do mercado interno do palmito em conserva ser estimado em pelo menos seis vezes maior do que o internacional (Brasil - 180 milhões de dólares), ainda assim o preço para comercialização tem sido idêntico no mercado interno e externo (Bovi, 1993).

Os principais importadores do Brasil são: França, Espanha, E.U.A., Argentina, Itália, Canadá e Uruguai (Cronberg, 1993).

As palmeiras de maior importância no mercado internacional em conformidade com o que é produzido economicamente (Reinolds, 1982) e pelas pesquisas realizadas (Brackpool, Branton e Blake, 1986) são: Dendzeiro *Elaeis guineensis* Jacq. como fonte de óleo comestível; o coqueiro *Cocos nucifera* L. na produção de óleo comestível e outros produtos como coco ralado, água in

natura e a tamareira *Phoenix dactylifera L.*, como fornecedora de alimento tipo “passa”. Mais recentemente em plantios comerciais de palmito normal (doce) para o mercado internacional e no Brasil, tem sido utilizado a pupunheira *Bactris gasipaes H. B. K.*; (Bovi, 1993), sendo a Costa Rica o maior produtor e exportador mundial desta palmeira (Cronberg, 1993). Neste contexto vem aumentando significativamente os plantios comerciais da guarirobeira [*Syagrus oleracea (Mart.) Becc.*] no Estado de Goiás, maior produtor do Brasil com 4.000 ha (Nascente e Peixoto, 1999), e Minas Gerais (Triângulo Mineiro), com 350 ha¹, visando precipuamente o palmito amargo.

As pesquisas a respeito de multiplicação *in vitro* de espécies de interesse econômico são cada vez mais promissoras. A guarirobeira é uma dessas plantas, devido ao seu grande interesse no mercado interno de consumo de palmito e para gerar excedente exportável.

As dificuldades de multiplicação podem ser minimizadas por intermédio da propagação *in vitro*, pois permite a multiplicação rápida, seleção de material superior precocemente; produção em larga escala e pequeno espaço físico, por isso, é uma tecnologia adequada para cultura de ciclo longo, assim como a guarirobeira, visando a produção de mudas para matrizes e plantios comerciais.

A técnica de cultivo *in vitro* apresenta-se também como uma alternativa para a guarirobeira [*Syagrus oleracea (Mart.) Becc.*], visando a criação de um protocolo para intercâmbio de material genético; resgate de germoplasma e preservação de material ameaçado; redução no período de germinação; isenção de pragas e doenças; e uniformização nas plântulas obtidas, inclusive com completo enraizamento *in vitro*.

Dentre os diversos problemas que são apresentados pelas espécies economicamente viáveis, são aqueles relacionados com a propagação os de

¹ Comunicação Pessoal- Santos, W.V.-Coord. técnico de Horticultura em Uberlândia-MG-EMATER, em Agosto de 1999.

maior importância. Desta forma, a guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], como uma palmácea e várias outras espécies, possuem inúmeros entraves para a propagação em larga escala e cultivo comercial. Dentre estes a existência de praga destruidora do embrião e endosperma, após a formação fisiológica da semente fruto (Gallo, 1988; Diniz e Sá, 1995); perda rápida do poder germinativo e baixa percentagem de germinação (Silva et al., 1992); endocarpo duro, impermeável com 3 poros, somente um funcional, dificultando a penetração d'água e troca gasosa para o endosperma e embrião (Carvalho e Nakagawa, 1983; Popinigis, 1985; Pinheiro, 1986; Alves e Demattê, 1987; Lorenzi, 1996); alto índice de oxidação no embrião em cultivo *in vitro* (Tisserat, 1979; Reynolds, 1982); alta incidência de fungos no fruto semente e contaminação durante a retirada do embrião (Cameiro, 1986; Machado, 1988; Gibson, 1957, citado por Sales, 1992); ausência de perfilhamento natural (Lorenzi, 1996); dificuldade no enraizamento natural *in vitro* (Al-Salih et al., 1987), falta de informes a respeito de meio de cultura adequado com relação à concentração de macro e microelementos, também reguladores de crescimento na propagação *in vitro* (Tisserat, 1984; Grattapaglia e Machado, 1990).

Neste sentido, os objetivos dos experimentos realizados foram:

- Avaliação de diferentes antioxidantes no controle de oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embrião da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.];
- Efeitos da desinfestação do fruto semente com álcool etílico-70%, associado a do embrião com benomyl, sobre a contaminação e germinação em cultura de embrião *in vitro*;
- Estabelecimento da guarirobeira através da cultura de embrião *in vitro* em diferentes combinações de MS com BAP e TDZ; e
- Efeitos de ANA e AIB na indução, comprimento e pesos das matérias secas das partes aérea e raízes da plântula da guarirobeira obtida *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

2.1. Palmeiras produtoras de palmito amargo e normal

2.1.1. Aspectos gerais das palmeira

No mundo são conhecidos no momento em torno de 240 gêneros e 3500 espécies de palmeiras, sendo a maioria utilizadas como ornamental; e no Brasil existem acima de 300 espécies e híbridos (Lorenzi, 1996). A flora brasileira de palmeiras é muito rica, e tem sido amplamente caracterizada em termos geográficos. Desta forma, deve-se dar maior atenção para os estudos regionais, sendo que esses representam componentes fundamentais para uma catalogação detalhada da distribuição das espécies no País (Fernandes, 1994), também, o valor econômico das palmeiras é muito grande, fornecendo diversos produtos, tais como: palmito, óleos, amêndoas, fibras, além de material para construção de habitações rústicas, como folhas e estipes, bem como palmeira ornamental para zonas urbana e rural (Alves e Demattê, 1987; Dimiz e Sá, 1995; Noblick, 1996).

2.1.2. Característica botânica da guarirobeira

A guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] é originária do Brasil (Toledo Filho, Rosa e Neme, 1994; Noblick, 1996), com número de cromossomos, $2n = 2x = 32$ (Lam et. al. 1997), família Palmae (ou Arecaceae),

monocotiledônea (Lorenzi, 1996; Mendonça, 1998). Encontra-se de forma natural compondo a vegetação das matas em diversos Estados, tais como: Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Paraná (Abreu, 1982; Diniz e Sá, 1995; Lorenzi, 1996).

A raiz é do tipo fasciculado originando-se na zona rizogênica (base do estipe), tendo ramificação primária e secundária, cilíndrica e espessada (Alves e Demattê, 1987). Caule tipo característico de palmeiras denominado de estipe, cilíndrico ou colunar simples (sem perfilho) com 10-20 m de altura e 20-30 cm de diâmetro, resistente (duro), medula central (esponjosa), envolvida por um anel de proteção, fibroso, resistente, anexo ao tecido vascular, constituído pelo xilema e floema, contudo não possui o câmbio, e por isso não ocorre aumento no diâmetro à medida que a palmeira vai aumentando em altura. Portanto, várias palmáceas alcançam o máximo de diâmetro no caule antes de iniciar o alongamento, não tendo crescimento secundário (Lorenzi, 1996). O Meristema apical do caule é o responsável pelo crescimento da palmeira em comprimento e notadamente pela constituição do palmito amargo (caule tenro + gema apical + primórdios foliares + folhas tenras) que consiste na parte de maior rentabilidade econômica da guarirobeira em cultivos comerciais.

Conforme Lorenzi (1996), as palmeiras possuem caules simples ou tipo entoucerados através do perfilhamento, como [*Syagrus flexuosa* (Mart.) Becc.], sendo, portanto, as brotações subterrâneas, a partir de gemas no estipe, é que dão origem aos caules múltiplos.

2.1.3. Sementes e Germinação

A semente (amêndoa) da guarirobeira está inserida dentro do fruto, com tegumento amarronzado, envolvendo o endosperma sólido, branco, oleoso, carnoso, com cavidade interna, contendo o embrião (branco, cilíndrico,

comprimento e diâmetro médios 2,5 e 1,2 mm, respectivamente) uma extremidade direcionada para o poro funcional de germinação, Figura 1 (foto a). O formato da semente acompanha a do endocarpo duro do fruto, que é ovóide. Perde o poder germinativo rapidamente; não suporta o dessecação; e atualmente é multiplicada exclusivamente por via sexuada (Lorenzi, 1996).

A destruição do endosperma e embrião em palmeiras (dendezeiro e babaçuzeiro) é ocasionado pelo coleóptero *Pachymerus nucleorom* (Fabr., 1792), conhecido popularmente como bicho do coco, medindo de 12 a 15 mm de comprimento, coloração cinzenta, élitros estriados, coxas posteriores ovóides e denteadas. Somente uma larva, raramente duas, conseguem penetrar pelo hilo (poro funcional) . Os ovos são depositados após a queda do coco (fruto semente) ao solo (Gallo, 1988).

Para Labouriau (1983), a germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado sob o aspecto botânico como a retomada do crescimento do embrião. Enquanto sob o ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica (Borges e Rena, 1993). No processo de germinação da guarirobeira, o cotilédone forma para o interior do endosperma, o haustório (tecido responsável pela nutrição do embrião); para o exterior via poro germinativo o pecíolo cotiledonar, que se vai alongar por vários centímetros, Figura 1(foto b); posteriormente, há a formação do limbo cotiledonar, que possui a gema apical e de onde se origina a radícula e a gêmula (folhas primárias), sendo a primeira tipo coleóptilo, chamada de eófila, as demais simples e posteriormente compostas como em planta jovem e adulta (Tomlinson, 1960; Lorenzi, 1996).

A guarirobeira é monóica, com inflorescência tipo panícula ou ráculo axilar, denominada de espádice formada pela bráctea (tipo espata, protege as flores masculina e feminina), Figura 1(foto c), ráquis (eixo principal da inflorescência), ráquila (ramificação que contém as flores, na extremidade, flor

masculina e na base flor feminina), a flor é pequena unissexuada em grande quantidade (Alves e Demattê, 1987).

O fruto é uma drupa constituído pelo epicarpo (casca verde amarelada); mesocarpo (caroso, amarelado, fibroso); endocarpo (espesso, lignificado, celulósico, muito duro, formato ovóide, impermeável, cor marrom, com 3 poros, sendo somente um funcional para troca gasosa, entrada d'água e saída do embrião com diâmetro que oscila de 0,5 a 2,0 milímetros). O fruto tem um comprimento e diâmetro que oscilam de 3,0 a 7,0 e 2,5 a 4,5cm, respectivamente, Figura 1(foto b), (Lorenzi, 1996; Passos, 1997).

As características do fruto (cor, tamanho e desprendimento do cacho) em guarirobeira são os principais indicadores do momento da colheita dos frutos sementes, os quais devem estar relacionados com a maturação fisiológica. Pois, conforme Popinigis (1985), no ponto de maturação fisiológica a semente deverá conter o máximo de matéria seca, momento este que coincidirá com o máximo vigor e poder de germinação das sementes. A partir deste instante, o processo passa a ser degradativo, e por conseguinte as reservas das sementes são consumidas até a completa perda de vigor e da capacidade de germinação.

Silva et al. (1992) e Diniz e Sá (1995) obtiveram para o fruto semente da guarirobeira (*Syagrus oleracea*) um índice de germinação de 50-60%, com início aos 60 dias e término aos 120 dias; enquanto no coquinho (*Syagrus flexuosa*), o período de germinação oscila de 120 a 180 dias (Koebernick, 1971 e Lorenzi, 1996) e na pupunheira (*Bactris gasipaes*) tem período e percentagem de germinação de 60 a 120 dias e de 70-80% respectivamente (Jordan, 1970 e Bovi, 1993).

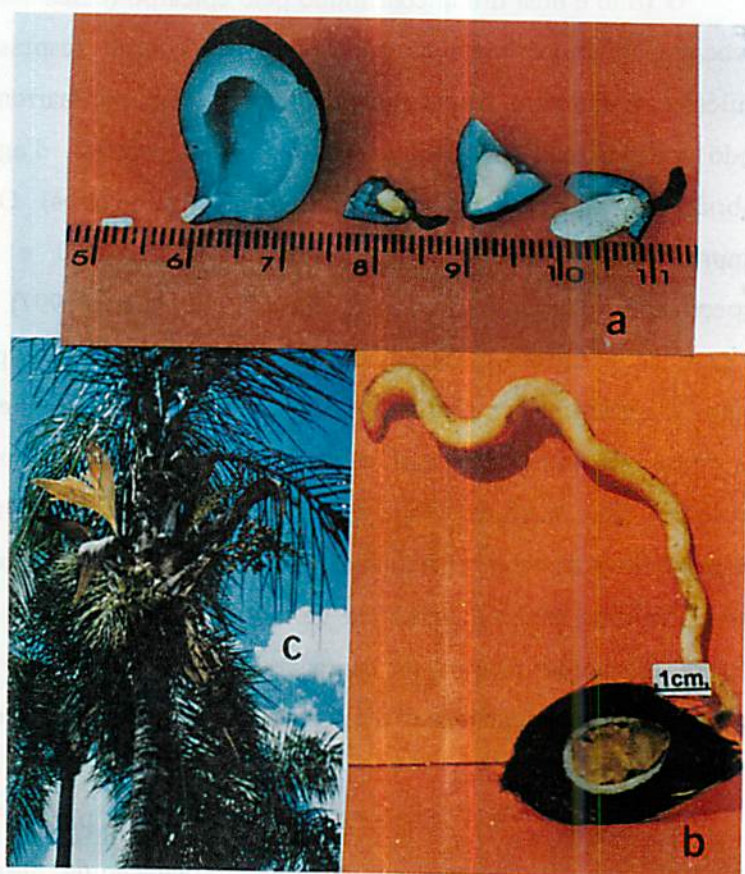


FIGURA 1. Foto-a: Localização no endosperma, tamanho do embrião e o desenvolvimento do haustório(Massa branca); b: Pecíolo cotiledonar(Filamento branco), endocarpo fibroso, escuro, impermeável; endosperma sendo extraído pelo haustório(Massa amarelada no interior do fruto semente); e c: Guarirrobeira adulta em floração e frutificação. UFLA, Lavras, MG, 2000.

2.1.4. Dormência em palmeiras

A dormência é a habilidade da semente de retardar a germinação até que o momento e o lugar sejam adequados para tal finalidade. É um mecanismo que distribui a germinação no tempo para favorecer e garantir a sobrevivência das espécies. No entanto é um mecanismo desvantajoso porque induz grande desuniformidade entre as plântulas e, por conseguinte, também nas mudas por via sexual (Carvalho e Nakagawa, 1983; Popinigis, 1985; Malavasi, 1988).

Para Carvalho e Nakagawa (1983), ocorrem pelo menos 3 mecanismos de dormência de sementes: a) sistema de controle de entrada de água no interior da semente; b) sistema de controle de desenvolvimento do eixo embrionário; e c) sistema de controle do equilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras do crescimento. Por outro lado, Amen citado por Carvalho e Nakagawa (1983), reconhece apenas 2 mecanismos: a) aquele que ocorre em sementes albuminosas (rica em proteína) devido ao equilíbrio de hormônios promotores-inibidores; e b) o que ocorre nas sementes exalbuminosas em função da impermeabilidade do tegumento a penetração d'água.

Conforme Pinheiro (1986), diversas espécies de palmeiras possuem dormência, notadamente do tipo obstáculo à penetração d'água para o embrião e endosperma. Para Diniz e Sá (1995), a guariroba tem dormência, o que dificulta a germinação.

Neste sentido a propagação da guarirobeira por fruto semente apresenta sérios obstáculos aos métodos convencionais utilizados devido a semente (amêndoa) estar coberta com envoltório lignificado, duro, espesso, denominado de endocarpo, botanicamente, possuindo somente um pequeno orifício de poucos milímetros de diâmetro por onde ocorre a entrada d'água, trocas gasosas e a saída da estrutura de germinação.

A dormência de inúmeras sementes pode ser, entre outras, devido à resistência mecânica presente nas estruturas que recobrem o embrião. Desta forma, a cultura de embrião pode superar estes tipos de dormência (Hu e Ferreira, 1998).

2.1.5. Cultura de embriões em palmeiras

A cultura do tecido em palmeiras pode ser dividida em três categorias com finalidades distintas: cultura de embriões; propagação clonal e estudos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento (Tisserat, 1987). Os tecidos embrionários normalmente têm alta capacidade regenerativa. Desta forma, os embriões e as sementes são utilizadas frequentemente como material para o cultivo *in vitro* (Pierik, 1990), e a utilização de embriões evita destruição de matrizes e pode ser bastante eficiente para a propagação *in vitro* de plantas (Pierik, 1987).

Conforme Pinheiro (1986), citando Hodel (1977), a cultura de embrião em palmeiras com lento processo de germinação, devido a um espesso e duro endocarpo do fruto, é de suma importância para obtenção de plântulas enraizadas, em menor espaço de tempo.

O cultivo de embriões *in vitro* para o coqueiro *Cocos nucifera L.* é muito interessante, principalmente no que se refere a intercâmbio de germoplasma; programas de melhoramento genético; qualidade fitossanitária; e conservação de material (Ashburner, Thompson e Burch, 1993).

De Guzman (1969) recomendou que embriões zigóticos de coqueiro *Cocos nucifera L.* deveriam ser a forma de intercâmbio de germoplasma dessa palmeira, em substituição às sementes, pois a semente é recalcitrante, não suporta armazenamento; há riscos de introdução de pragas e doenças; e tem

menor custo de produção para esta finalidade (Siqueira et al., 1997).

Sittolin e Cunha (1987) utilizaram a técnica de cultura de embriões *in vitro* para produzir mudas, visando a implantação de um banco de germoplasma para possibilitar o acompanhamento e avaliação do potencial da cultura de macaúba *Acrocomia aculeata* para produção do óleo. Também, Tabai, Melo e Crocomo (1990) utilizaram a técnica de cultura de embriões *in vitro* para reduzir o tempo de germinação das sementes de macaúba, sendo que as plântulas ficaram prontas para serem transferidas para a casa de vegetação após 16 semanas da inoculação.

2.1.6. Características do palmito

Diversos tipos de palmeiras podem fornecer palmito de boa qualidade, que se diferenciam pela precocidade, cor e pelos sabores diferentes. Desta forma, o palmito da guarirubeira (*Syagrus oleracea*) caracteriza-se pelo sabor amargo e diferente dos gêneros *Euterpe* (Açaizeiro e Juçara) e a pupunheira (*Bactris gasipaes*), que é de textura mais firme, sabor adocicado, o que é previsto na classificação de tipos de sabores no padrão para palmito do Codex pela inclusão dos sabores doce e amargo (FAO/Who, citado por Ferreira e Paschoalino, 1987).

As principais espécies de palmáceas usadas na obtenção de palmito normal são: Juçara (*Euterpe edulis*) comum na mata atlântica, sem perfilho, estipe ereto, excelente palmito; Açaizeiro (*Euterpe oleracea*), abundante na Amazônia, produz diversos perfilhos, estipe ereto, longo e fino, fruto é apreciado na alimentação humana (Furia, 1993); Pupunheira (*Bactris gasipaes*) alógama, perfilhamento abundante, palmito adocicado, estipe ereto, ideal sem espinho (Barbosa, 1993 Nogueira et al., 1995). Também a palmeira australiana

seafórtia (*Archontophoenix alexandrae*) estipe ereto, com anéis e base com dilatação (barriga), sem perfilho, cultivada notadamente em Santa Catarina (Stegemann e Ramos, 1997).

O período para início de produção de palmito e a periodicidade para cortes sucessivos em espécies que perfilham é variável. Desta forma para Juçara (*Euterpe edulis*) e Açaizeiro (*Euterpe oleracea*), início de 8 a 12 anos e intervalos de 4 anos; híbrido de *Euterpe*, início e períodos de 6 e 3 anos, respectivamente; para Pupunheira (*Bactris gasipaes*), primeiro corte de 2 a 3 anos e intervalos de 1 a 2 anos; Palmeira australiana (*Archontophoenix alexandrae*), corte com 3-4 anos e Guarirobeira (*Syagrus oleracea*) sem perfilho, arranquio com 2-4 anos, única com palmito de sabor amargo entre as cultivadas (Gislene e Bovi, 1991; Bovi, 1993; Diniz e Sá, 1995; Lourenço, 1996; Stegemann e Ramos, 1997).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, N.A. *Cultura da guariroba*. São Luiz de Montes Belos: EMATER-GO, 1982. 7p.
- AL-SALIH, A.A.; BADER, S.M.; JARRAH, A.Z.; AL-DADI, M.T. A comparative morphological and anatomical study of seed embryo culture derived seedling of *Phoenix dactylifera* L. *Date Palm Journal*, Baghdad, v. 4, n.2, p.137-152, 1987.
- ALVES, M.R.P.; DEMATTÊ, M.E.S.P. *Palmeiras: Características botânicas e evolução*. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 129p.
- ASHUBURNER, G.R.; THOMPSON, W.K.; BURCH, J.M. Effect of α -naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.35, p.157-163, 1993.

BARBOSA, A.M.M. Pupunha (*Bactris gasipaes*). In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE PALMITO, 1, 1993, Piracicaba. Anais ... Piracicaba:CALQ, 1993. p. 8-11.

BORGES, E.E. de L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B. de; PIÑA-RODRIGUEZ, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES. 1993. p.83-135.

BOVI, M.L.A. Híbridos de palmito. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE PALMITO,1.,1993, Piracicaba. Anais ... Piracicaba: CALQ, 1993. p. 39-48, 1993.

BRACKPOOL, A.L.; BRANTON, R.L.; BLAKE, J. Regeneration in palms. In: VASIL, I.A. (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plant. Orlando: Academic Press, 1986. v.3, p.207-222,

CARNEIRO, J.S. Microflora associada às sementes de essências florestais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.11, n.3, p.557-566, out. 1986.

CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 429p.

CRONBERG, V.V. Aspectos econômicos do cultivo e produção de palmito. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE PALMITO,1.,1993, Piracicaba. Anais ... Piracicaba: CALQ, 1993. p.24-38.

DE GUZMAN, E.V. The growth development of coconut "makapuno" embryo "in vitro": the induction of rooting. *Philippine Agriculturist*, Manila, n.53, p.65-78, 1969.

DINIZ, J.H.; SÁ, L.F.de. A Cultura da guariroba. Goiânia: EMATER-GO, 1995. 16p. (EMATER. Boletim Técnico, 003).

FERNANDES, H.K.B. Geographic distribution of Palms. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.360, p.63-69, 1994.

FERREIRA, V.L.P.; PASCHOALINO, J.E. Pesquisa sobre palmito no Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISADORES EM PALMITO,1.,1987, Curitiba. Anais ... Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1988, p.45-55.

FURIA, L.R.K. Características e uso do Juçara (*Euterpe edulis*) e Açaí (*Euterpe oleracea*). In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE PALMITO, 1., 1993, Piracicaba. Anais ... Piracicaba: CALQ, 1993. p.1-7.

X GALLO, D. Manual de entomologia agrícola. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649p.

GISLENE, S.; BOVI, M.L.A. Palmito: à sombra da lei. *Globo Rural*, Rio de Janeiro, n.69, p.47-51, 1991.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-169.

X INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Anuário estatístico. Rio de Janeiro, 1996. n.56

X HU, C.Y. ; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 371-393.

JORDAN, C.B. A study of germination and use in twelve palm of northeastern Peru. *Principes*, Lawrence, v.14, n.1, p.26-33, 1970.

KOEBERNICK, J. Germination of palms seed. *Principes*, Lawrence, v.15, n.4, p.134-137, 1971.

X LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Washington: OEA, 1983. 174p.

X LAM, V.; GERALDO, J.S.; SILVA, M.A.S.; MATAQUEIRO, M.F.; MORO, J.R. Determinação do número de cromossomos de *Syagrus oleracea*, *Syagrus romanzoffiana* e seu híbrido (*arecaceae*). In: ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PÓS-GRADUANDO DA FCAV/UNESP, 1, 1997, Jaboticabal. Anais... p. 15.

LORENZI, H. Palmeiras no Brasil: exóticas e nativas. Nova Odessa: Plantarum, 1996. 303p.

LOURENÇO, M. Gueroba: o sabor amargo do campo. **Globo Rural**, Rio de Janeiro, n.124, p.37-41, 1996.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106p.

MALAVASI, M. de M. Germinação de sementes. In: PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. **Manual de análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 25-48.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T. et al. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.289-539.

NASCENTE, A.S.; PEIXOTO, N. Introdução e caracterização de germoplasma de guariroba (*Syagrus oleracea*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 39. **Resumos...** Tubarão-SC, 1999

NOBLICK, L.R. *Syagrus*. **The Palm J.**, Fallbrook, n.126, p.12-45, 1996.

NOGUEIRA, O.L.; CALZAVARA, B.B.G.; MÜLLER, C.H. et al. **A cultura da pupunha**. Brasília: EMBRAPA-CPAAO, 1995. 50p.

PASSOS, E.E.M. Morfologia do coqueiro. In: FERREIRA, J.M.S; WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A. (eds.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2.ed.. Brasília: EMBRAPA-CPATC, 1997. p.57-64.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. 3.ed.. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p. Tradução de: *In vitro culture of higher plants*.

PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht: Martinus Nyjhoff Publishers, 1987. 344p.

PINHEIRO, C.M.B. **Germinação de sementes de palmeiras: revisão bibliográfica**. Teresina: EMBRAPA-UEPAE, 1986. 102p.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

REINOLDS, J.F. Vegetativa propagation of palm trees. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.). **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1982. p.182-207,

- SALES, N.L.P. Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê amarelo, ipê roxo e barbatimão. Lavras: ESAL, 1992. 89p. (Dissertação Mestrado em Fitossanidade).
- X SILVA, J.A.da; SILVA, D.B.da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.K.M. de. Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas nativas dos cerrados: informações exploratórias. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992. 23p.
- SIQUEIRA, E.R.; RIBEIRO, F.E.; ARAGÃO, W.M.; TUPINAMBÁ, E.A. Melhoramento genético do coqueiro. In: FERREIRA, J.M.S.; WARWICK, D.R.N.; SIQUEIRA, L.A. (eds.). A cultura do coqueiro no Brasil. 2.ed. Brasília: EMBRAPA-CPATC, 1997. p.57-64.
- SITTOLIN, I.M.; CUNHA, L.H.S. Cultura de embriões de macaúba (*Acrocomia sp*) "in vitro" visando a implantação de um banco ativo de germoplasma. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília. Resumos... Brasília: ABCTP, 1987. p.13.
- STEGEMANN, C.; RAMOS, M. Palmito:do jardim ao campo. Globo rural, Rio de Janeiro, n.138, p.46-48, 1997.
- TABAI, S.; MELO, M.; CROCOMO, O.J. Control of somatic embryos formation the palm macaúba (*Acrocomia aculeata*). In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7. 1990 Amsterdam.. Abstracts... Amsterdam: IAPTC, 1990. p.248.
- TISSERAT, B. Date palm. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. New York: Mc Millan, 1984. v. 2, p.505-545.
- TISSERAT, B. Palm. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.). Cell and tissue culture in forestry. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, p. 339-356.
- TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) in vitro. Journal Experimental Botany, v.30, n.119, p.1275-1283, 1979.

TOLEDO FILHO, D.V.; ROSA, P.R.F.da; NEME, A.M. Damage caused by frost on palms (Arecaceae): a case study. Acta Horticulturae, Wageningen, n.360, p.235-240, 1994.

TOMLINSON, P.B. Essays on the morphology of palms, germination and seedlings. Principes, Lawrence, v.4, n.2, p. 56-61, 1960.

CAPÍTULO 2

USO DE DIFERENTES ANTIOXIDANTES NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO, GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DAS PLÂNTULAS *IN VITRO* NA CULTURA DE EMBRIÃO DA GUARIROBEIRA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

RESUMO

Com objetivo de avaliar diferentes antioxidantes na oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embrião da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], conduziu-se um experimento no Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA). O explante utilizado foi embrião extraído do fruto maduro da guarirrobeira. Os embriões foram acondicionados em recipientes, tipo telado, e colocados em água corrente durante 3 horas, visando a reidratação e pré-limpeza. Foram desinfestados em solução comercial-2% de hipoclorito de sódio na proporção de 20% (v/v) mais 1g/L de benomyl durante 20 minutos sob agitação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, 5 repetições e 25 parcelas, sendo cada parcela constituída por 4 tubos e um embrião/tubo. Os tratamentos foram: T1: MS (Murashige e Skoog, 1962) no claro; T2: MS no escuro-14 dias; T3: MS+PVP-40-400mg/L; T4: MS+carvão ativado-1,5%; T5: MS+ácido ascórbico-100mg/L. Os embriões foram inoculados na câmara de fluxo laminar após 4 lavados em água destilada e autoclavada, usando-se tubos de ensaio, os quais foram fechados com tampa plástica e vedados com filme plástico. As características avaliadas foram: oxidação (aos 15 dias), germinação (aos 30 dias) e número, tamanho médios das folhas da guarirrobeira, aos 110 dias. Pelos dados obtidos o ácido ascórbico foi o antioxidante mais eficiente no controle da oxidação e também, o que proporcionou a maior porcentagem de germinação dos embriões da guarirrobeira, seguido pelo carvão ativado; o ambiente escuro e o PVP-40, foram pouco eficientes no controle da oxidação e as porcentagens de germinação foram sensivelmente reduzidas; o número e tamanho médio das folhas da plântula da guarirrobeira foram superiores para os antioxidantes: PVP-40, ácido ascórbico e ambiente claro do que o ambiente escuro-14 dias; a quebra de dormência e o cultivo de embrião *in vitro* viabilizaram um alto índice de germinação; e não houve enraizamento de forma natural, até aos 110 dias de cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: Antioxidante, embrião, guariroba, guarirrobeira, gueroba, *Syagrus*, PVP-40, ácido ascórbico, carvão ativado

USE OF DIFFERENT ANTIOXIDANTS IN THE CONTROL OF OXIDATION, GERMINATION AND DEVELOPMENT OF THE SEEDLINGS *IN VITRO* OF EMBRYO CULTURE OF THE GUARIROBEIRA. [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

ABSTRACT

With the objective of evaluating different antioxidants in the oxidation, germination and development of the seedlings in the *in vitro* embryo culture of the guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], an experiment was conducted in the plant tissue culture laboratory of the Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA). The explant utilized was embryo extracted from the ripe guarirobeira fruit. The embryos were packed in screened-type pots and put into running water for 3 hours, aiming at the rehydration and pre-cleaning. they were deinfested in commercial solution-2% sodium hypochlorite at the ratio of 20 % (V/V) plus 1g/L de benomyl for 20 minutes under stirring. The experimental design utilized was the completely randomized one with five treatments, 5 (five) replications and 25 plots, each plot being made up of four tubes and one embryo/tube. The treatments were: T1: MS (Murashige and Skoog, 1962) in the light; T2: MS in the dark-14 days; T3: MS+PVP-40-40mg/L; T4: MS + activated charcoal-1.5%; T5: MS+ ascorbic acid-100 mg/L. The embryos were inoculated in the laminar flux chamber after four washings in distilled water and autoclaved, using test tubes which were closed, with plastic cap and sealed with plastic film. The characteristics evaluated were oxidation (at 15 days), germination (at 30 days) and number, average size of the guarirobeira leaves at 110 days. by the data obtained, ascorbic acid was the most efficient antioxidant in oxidation control and also the one which provided the greatest percentage of germination of the guarirobeira embryos followed by activated charcoal; the dark environment and PV-40 were little efficient in oxidation control and the percentages of germination were markedly reduced, the average number and size of the leaves of the guarirobeira seedling were superior to the antioxidants: PVP-40, ascorbic acid and light environment than the dark environment-14 days; dormancy break and *in vitro* embryo culture made a high index of germination viable and there was no rooting in a natural form up to 110 day's *in vitro* culture.

Key words: antioxidant, embryo, guariroba, guerobera, guarirobeira, *Syagrus*, PVP-40, ascorbic acid, activated charcoal

3 INTRODUÇÃO

A oxidação do explante é considerado um dos aspectos mais sérios relacionados com a cultura de tecidos de palmeiras. O escurecimento tem sido atribuído à liberação e oxidação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante.

Um dos maiores problemas em espécies lenhosas está relacionado com a oxidação fenólica. Conforme George e Sherrington (1984), a oxidação dos compostos fenólicos ocorre em tecidos lesionados devido à ação de enzimas oxidases. As extremidades dos tecidos escurecem rapidamente e são liberados produtos tóxicos da oxidação. Esse problema é particularmente agravado no isolamento de explantes de espécies lenhosas devido à uma maior síntese de lignina nos tecidos (Grattapaglia e Machado, 1990).

A oxidação é um problema grave na cultura de tecidos de palmeiras. A dificuldade do processo é tão grande que fica impossível o cultivo sem a utilização de uma técnica para controlar a oxidação do explante.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar diferentes antioxidantes no controle de oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embrião da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.].

4 REFERENCIAL TEÓRICO

O termo oxidação corresponde à mudança de coloração do meio devido à liberação de compostos fenólicos pelo explante (Gould e Murashige, 1985).

Preece e Compton (1991) caracterizaram as substâncias encontradas em meio de cultura para algumas espécies lenhosas e as identificaram como sendo fenóis, flavonóides e taninos, como responsáveis pela oxidação.

A liberação de exudatos pelas plantas se constitui em um dos maiores

problemas para o cultivo *in vitro* (Queralt et al., 1991).

Várias medidas são citadas por George e Sherrington (1984) na prevenção da oxidação fenólica, tais como: A remoção dos compostos fenólicos produzidos, através de água corrente como pré-tratamento de explantes, e a utilização no meio de cultura de antioxidantes.

Para controlar a ocorrência da oxidação, recomenda-se que se minimizem os danos causados ao explante com a adição ao meio de substâncias antioxidantes; utilização de meios líquidos; de diferentes agentes de solidificação; e alteração da composição e concentração do meio de cultura (George, 1996).

Grattapaglia e Machado (1998) recomendam, para controlar a oxidação, as seguintes medidas: lavagem do material antes da desinfestação, em água corrente, auxiliando na lixiviação dos compostos fenólicos; utilização de antioxidantes: ácido ascórbico, polivinilpirrolidone (PVP) e carvão ativado; incubação inicial dos explantes no escuro.

Dos diferentes antioxidantes que são utilizados, assim como: ácido ascórbico; carvão ativado; PVP, ácido cítrico, o carvão ativado age promovendo adsorção dos exudatos liberados pelo explante, os quais provocam a oxidação; o PVP reage com os compostos oxidantes; e os ácidos cítrico e ascórbico reagem com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem (Jarret, Rodrigues e Fernandez, 1985; George, 1996).

O carvão ativado tem sido adicionado no meio de cultura devido a propriedade adsorptiva, por remover inibidores de crescimento em tecidos que apresentam metabólitos tóxicos (Ebert e Taylor, 1990). Além do efeito do carvão ativado sobre a prevenção da oxidação, este também possui a propriedade de absorver e reduzir a disponibilidade da auxina exógena no meio de cultura (Reinolds, 1982; Pannetier e Buffard-Morel, 1986; Ebert e Taylor,

1990).

Adição ao meio de cultura de ácidos, como ácido ascórbico e cítrico ou também cisteína, pode ser eficiente como antioxidantes. O ácido ascórbico normalmente é acrescentado ao meio de cultura com a finalidade de controlar a oxidação e ainda promover atividade metabólica dos tecidos tendo uma maior efetividade quanto adicionado ao meio em concentrações entre 10 e 140 mg/L, podendo reduzir drasticamente a oxidação (George, 1996). O ácido ascórbico tem sido acrescentado ao meio de cultura para explantes de bananeira em concentrações de 100mg/L (Mante e Tepper, 1983).

Siqueira e Inoue (1991) avaliaram diversas técnicas para o controle da oxidação na cultura de tecido do coqueiro *Cocos nucifera L.* e concluíram que o ácido ascórbico é eficiente no controle do processo de oxidação, enquanto o polivinilpirrolidone (PVP), não foi eficiente.

Em protocolos de cultura de tecido em palmeiras, o carvão ativado é que promoveu os melhores resultados, e por isso passou a ser incluído como procedimento padrão (Tisserat, 1987).

Adição de carvão ativado no meio de cultura para o desenvolvimento de embriões zigóticos do coqueiro, mutante "Makapuno", redundou num maior desenvolvimento das raízes (De Guzman e Manuel, 1975).

Gupta (1986), comparando ácido ascórbico, ácido cítrico e carvão ativado, verificou que o ácido ascórbico, controlou a oxidação fenólica em meristemas de bananeira. Lameira, Pinto e Pasqual (1988) verificaram que na fase de estabelecimento do explante de bananeira o ácido ascórbico, como antioxidante no meio de cultura, diminuiu a oxidação fenólica.

No meio de cultura o carvão ativado em concentrações que variam de 0,3 a 2% (Fridborg e Eriksson, 1965; Anagnostakis, 1974; Fridborg et al., 1978; Tisserat, 1979; Bon, Gendraud e Franclet, 1988; Guerra e Handro, 1988) é utilizado para adsorver os fenóis, além de induzir o processo de rizogênese

(Fridborg et al, 1978; George, 1996), e quando comparado com o PVP no controle da oxidação em explantes de palmeira, o carvão ativado foi mais eficiente (Tisserat, 1979).

A oxidação é um dos principais problemas da cultura de tecidos em palmeiras (Tisserat, 1979; Reynolds e Murashige, 1979). O escurecimento do explante em palmáceas ocorre devido à liberação e oxidação de compostos fenólicos (Reynolds, 1982; Choo, 1984). Para minimizar esse escurecimento é comum a adição de ácido ascórbico, carvão ativado, PVP (Tisserat, 1979; Hanover e Pannetier, 1982; Teixeira, 1990).

Ashburner, Thompson e Burch (1993) controlaram a oxidação por fenóis na cultura *in vitro* de embriões de coco (*Cocos nucifera L.*) efetuando a suplementação com carvão ativado a 0,2% no meio.

Embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, variedade pisifera de dendê desenvolveram rapidamente em plântulas em meio contendo carvão ativado. O desenvolvimento de raízes normalmente é ausente em meio sem carvão ativado (Paranjothy e Othaman, 1982).

Visando solucionar o problema de escurecimento no meio de cultura, que era limitante ao cultivo *in vitro* da tamareira, Tisserat (1979), avaliou o efeito da adição do carvão ativado e PVP (polivinilpirrolidone) como forma de prevenir a oxidação. Com a utilização do carvão ativado, foram obtidas plântulas adventícias a partir do cultivo de embriões, gemas laterais, ápices caulinares, pedaços de caule e de tecidos da ráquila, após 3 a 4 meses de cultivo *in vitro*.

O PVP geralmente é adicionado ao meio de cultura em concentrações que oscilam de 0,01 a 4%. A poliamina possui a capacidade de absorver os compostos fenólicos, evitando que os mesmos se oxidem e polimerizem. Também estimula a embriogênese, podendo ainda reagir com compostos fenólicos oxidados e prevenir a ocorrência de oxidação por enzimas fenolases (George, 1996). Entretanto, adição de PVP a 1,0 g/L não foi eficiente para o

controle de oxidação em explantes de coqueiro *Cocos nucifera* L. (Siqueira e Inoue, 1991).

A atividade das enzimas no que diz respeito à biossíntese (Davies, 1972) e oxidação de fenóis é aumentada pela luz (Creasy, 1968; Adams, Koenigsberg, e Langhans, 1979). Portanto, o escurecimento dos tecidos poderá ser reduzido e até mesmo impedido caso os explantes sejam cultivados, na fase inicial, no escuro por até 14 dias (Monaco et al., 1977).

Caldas e Taketomi (1993) avaliaram o controle da oxidação em explantes de jabuticabeiras e goiabeiras e recomendaram o cultivo no escuro ou a utilização de ácido ascórbico como prática para controlar a oxidação.

A oxidação fenólica tem sido controlada em diferentes espécies lenhosas pela redução da intensidade luminosa (Marks e Simpson, 1990); pela diminuição na concentração de sais no meio de cultura (Biasi, Koller e Kampf, 1994) e notadamente pela adição de antioxidantes ao meio (Reynolds e Murashige, 1979; Gupta et al., 1980; Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras-(UFLA).

Os frutos da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] foram obtidos no município de São Luís de Montes Belos-GO, os quais foram retirados em estágio de completa maturação, através da colheita de cachos previamente selecionados na planta .

O explante utilizado foi o embrião da guarirobeira, e para sua obtenção foi procedida a quebra do fruto, utilizando dois paralelepípedos (um com depressão para o encaixe do fruto de ± 8 Kg e outro com ± 2 Kg, para romper o fruto). Com o rompimento do endocarpo (parte dura do fruto) retirou-se a

amêndoa ou parte dela com embrião, sem dano. Posteriormente, os embriões foram colocados em placa de petri com papel de filtro umedecido para evitar a desidratação.

Os embriões foram acondicionados em pequenos recipientes de pano, tipo telado, e colocados em água corrente durante 3 horas para absorção de água e pré-limpeza. Logo após, foram desinfestados em solução comercial contendo 2% de hipoclorito de sódio na proporção de 20% (v/v), mais 1g/L de benomyl, durante 20 minutos, sob agitação constante.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, 5 repetições e 25 parcelas, sendo cada parcela constituída de 4 tubos e um embrião/tubo.

Os tratamentos foram: T1: MS (Murashige e Skoog, 1962) no claro; T2: MS-no escuro-14dias; T3: MS + PVP-40- 400mg/L ; T4: MS + carvão ativado – 1,5%; T5: MS + ácido ascórbico– 100mg/L. Ao meio foi acrescido sacarose na quantidade de 30g/L.

O pH dos meios foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$; e sendo solidificado com ágar a 0,7%, cada tubo de ensaio (25x150 mm), recebeu a quantidade de 10 mL do meio, de acordo com cada tratamento, e logo após foi fechado com tampa plástica. Posteriormente, foi submetido a autoclavagem, que foi efetuada a uma temperatura de 121°C , pelo período de 20 minutos, a uma pressão de 1 atm.

A lavagem e a inoculação dos embriões foram realizadas na câmara de fluxo laminar. Os embriões foram lavados por 4 vezes, no recipiente tipo telado, usando água destilada e autoclavada. Foi inoculado um embrião por tubo, e a seguir colocada a tampa plástica com a borda vedada com filme plástico. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria.

As características avaliadas foram: oxidação (em %, aos 15 dias); germinação (em %, aos 30 dias); sendo os dados, em porcentagens, transformados em arco seno da raiz quadrada de X/100; número médio de folha (aos 110 dias) e tamanho médio da folha (em cm, aos 110 dias), os dados foram transformados para raiz quadrada de X+0,5 , (Banzatto e Kronka, 1992).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância obtido para oxidação, germinação, número e tamanho médios das folhas das plântulas da guarirobeira encontra-se na Tabela 1.

Observa-se que, para oxidação, o efeito foi altamente significativo e para o número médio e tamanho médio da folha, houve diferença significativa, enquanto para o índice de germinação, não houve diferença estatística (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo das análises de variância para oxidação, germinação, número e tamanho médios das folhas obtidas no experimento sobre avaliação de diferentes antioxidantes na cultura *in vitro* do embrião da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.].UFLA, Lavras, MG, 2000.

Causas da variação	G.L.	Quadrados médios			
		Oxidação (%)	Germinação (%)	Número médio de folhas	Tamanho médio das folhas (cm)
Antioxidantes	4	710,7066**	571,4991 ^{n.s.}	0,0446*	0,6717
Resíduo	20	121,1805	306,0000	0,0093	0,2481
Coef. variação(%)		43,62	28,03	5,23	15,31

** ;*- Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Como alternativas para controlar a oxidação em explante (embrião) da guarirobeira, avaliaram-se os ambientes claro e escuro e os antioxidantes químicos: PVP-40; carvão ativado e ácido ascórbico. Verifica-se que não houve diferença significativa para os ambientes claro, escuro e o produto químico antioxidante PVP-40, assim como para os tratamentos escuro, PVP-40 e carvão ativado, não havendo, também, diferença significativa entre os antioxidantes e produtos químicos: ácido ascórbico, carvão ativado e PVP-40 (Figura 2).

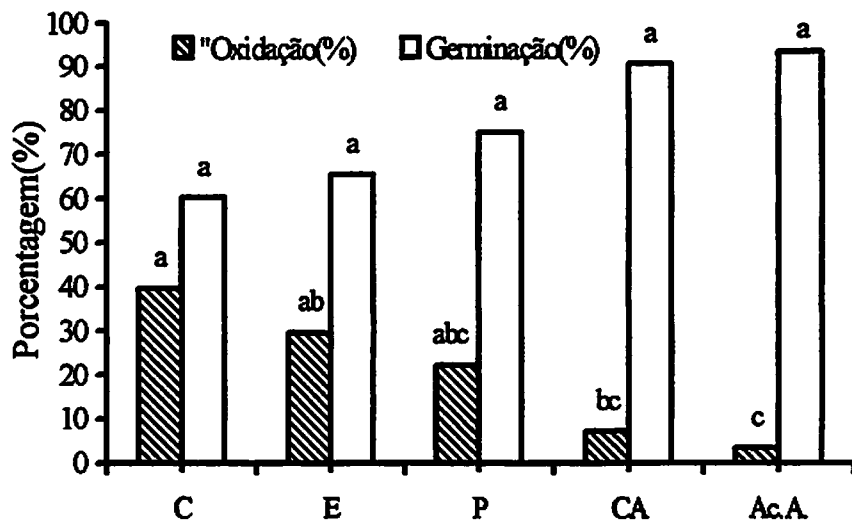


FIGURA 2. Efeito de diferentes antioxidantes: Ácido ascórbico(Ac.A.), Carvão ativado(CA), PVP-40(P) e do Claro(C) e Escuro(E) sobre a oxidação e germinação da plântula da guarirobeira em cultura de embrião, *in vitro* (Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%).UFLA, Lavras, MG, 2000.

Para a característica germinação, não houve diferença significativa (Figura 2), também para número médio de folha não ocorreu diferença significativa entre o ambiente claro, PVP-40, carvão ativado e ácido ascórbico; assim como entre os ambientes claro e escuro e carvão ativado (Figura 3). Para a variável tamanho da folha, não houve diferença significativa entre o ambiente claro, PVP-40, carvão ativado e ácido ascórbico, bem como os ambientes: claro e escuro, PVP-40 e ácido ascórbico (Figura 4).

Os antioxidantes PVP-40 (22,25% de oxidação), carvão ativado (7,09%) e ácido ascórbico (3,37%) mesmo apresentando as menores percentagens para variável oxidação, os resultados são de grande amplitude, ficando evidenciada a importância dos antioxidantes no controle da oxidação no embrião da guaribeira (testemunha- 39,60% de oxidação).

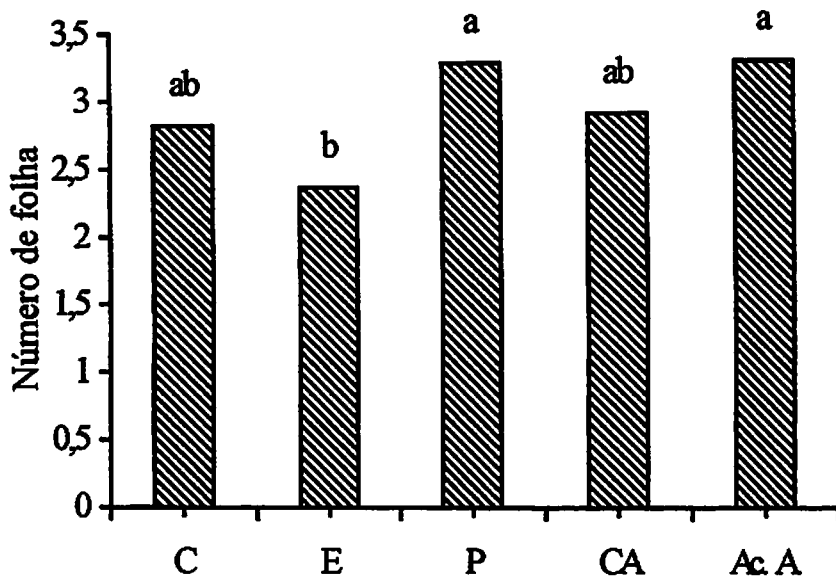


FIGURA 3. Efeito de diferentes antioxidantes: Ácido ascórbico(Ac.A.), Carvão ativado(CA), PVP-40(P) e do Claro(C) e Escuro(E) sobre o número de folhas na plântula da guarirobeira em cultura de embrião, *in vitro* (Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%).UFLA, Lavras, MG, 2000.

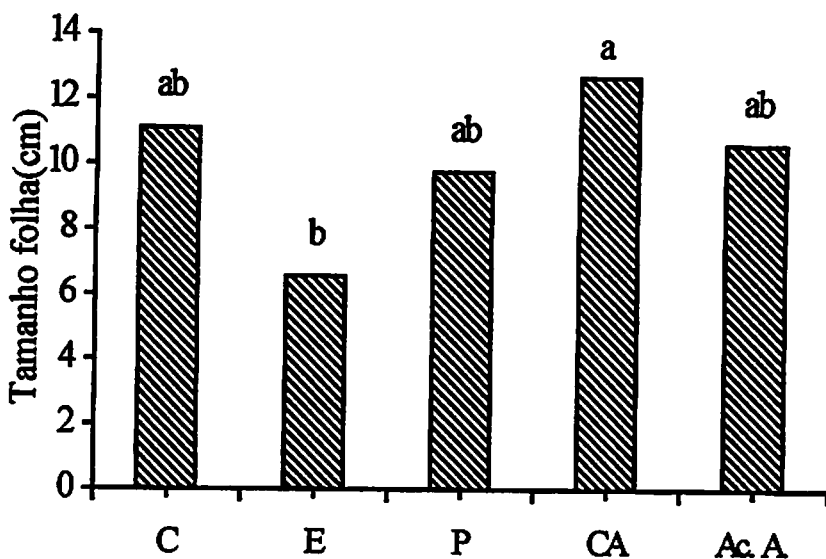


FIGURA 4. Efeito de diferentes antioxidantes: Ácido ascórbico (Ac.A.), Carvão ativado(CA), PVP-40(P) e do Claro(C) e Escuro(E) no tamanho da folha da plântula da guarirubeira em cultura de embrião, *in vitro* (Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%).UFLA, Lavras, MG, 2000.

A oxidação em palmeiras é um dos principais problemas (Tisserat, 1979; Reynolds e Murashige, 1979), sendo ocasionada principalmente, por compostos fenólicos liberados pelo explante no meio e redundando em compostos tóxicos e formação de uma coloração escura no meio e no explante (Reynolds, 1982; Choo, 1984; Gould e Murashige, 1985; Queralt et al., 1991; Preece e Compton, 1991), por isso, é imprescindível a utilização de mecanismos para o controle da oxidação em plantas lenhosas (Creasy, 1968 ; Davies, 1972 ; Monaco et al. 1977

Adams, Koenigsberg e Langhans, 1979; Reynolds e Murashige, 1979; George Sherrington, 1984; Marks e Simpson, 1990; Grattapaglia e Machado, 1990 e 1998; George, 1996; Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

A superioridade para o ácido ascórbico, somente (3,37% de oxidação) e carvão ativado (7,09%), em relação ao PVP-40 (22,25%), para o controle da oxidação no embrião da guarirobeira, é marcante (Figura 2).

Os antioxidantes químicos, notadamente utilizados em diversos protocolos são: carvão ativado, ácido ascórbico e PVP (Fridborg e Eriksson, 1965; Anagnostakis, 1974; Fridborg et al., 1978; Reynolds, 1982; Mante e Tepper, 1983; Jarret, Rodrigues, Fernandez, 1985; Gupta, 1986; Pannetier e Buffard-Morel, 1986; Bon, Gendraud e Franclet, 1988; Guerra e Handro, 1988; George, 1996; Lameira, Pinto e Pasqual, 1998). Para as palmáceas, o antioxidante mais utilizado no início dos trabalhos com a cultura de tecidos foi o carvão ativado em diferentes concentrações de até 2% (De Guzman e Manuel, 1975; Tisserat, 1979; Paranjoth e Othaman, 1982; Reynolds, 1982; Pannatier e Buffard-Morel, 1986; Tisserat, 1987; Ebert e Taylor, 1990; Ashuburner, Thompson e Burch, 1993). No entanto, pesquisas efetuadas usando ácido ascórbico e PVP, acrescido ao meio, mostraram excelentes resultados no controle da oxidação em palmeiras, usando-se o ácido ascórbico e resultados não muito promissores para o uso do PVP (Tisserat, 1979; Hanover e Pannetier, 1982; Teixeira, 1990; Siqueira e Inoue, 1991; George, 1996).

Para os ambientes claro (testemunha 39,60% de oxidação), escuro (29,66%) e o antioxidante produto químico PVP-40 (22,25%), o controle da oxidação efetuado pelo ambiente escuro e o PVP-40 foi de 9,94 e 17,35%, respectivamente, em relação à testemunha (claro), mostrando pouca eficiência para a cultura de embrião *in vitro* da guarirobeira.

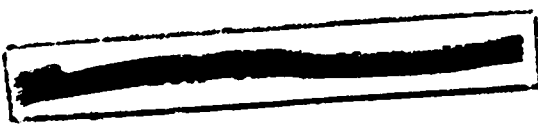
Para Davies (1972), as enzimas da biossíntese de fenóis e também da oxidação têm as atividades incrementadas na presença da luz (Creasy 1968;

Monaco et al. 1977; Adams, Koenigsberg e Langhans, 1979;), o que explica o fato do ambiente-claro (controle) apresentar 39,60% de oxidação para os embriões da guarirobeira. Contudo, uma medida visando a redução da oxidação tem sido a incubação na fase inicial no escuro (Marks e Simpson, 1990; Caldas e Taketomi, 1993) durante um período de 14 dias (Monaco et al., 1977), provocando uma redução relativamente pequena na oxidação dos embriões, ambiente escuro (29,66%), pois foi somente de 9,94% em relação ao controle (39,60% de oxidação).

Como os embriões da guarirobeira utilizados também no tratamento (testemunha-ambiente claro-39,60% de oxidação) foram submetidos a lavagem em água corrente, sob a torneira, por 3 horas consecutivas, ficou demonstrado que somente este procedimento não foi suficiente para contornar o problema de oxidação em cultura de embrião *in vitro* de guarirobeira, apesar das recomendações encontradas na literatura como uma das medidas para equacionar o problema da oxidação (George e Sherrington, 1984; Grattapaglia e Machado, 1998). Entretanto, pode-se considerar como uma medida complementar, além de promover a reidratação mais rápida do embrião da guarirobeira.

A germinação não foi afetada de forma significativa pelos ambientes claro (60,39% de germinação), escuro (65,45%) e os antioxidantes: PVP (75%), carvão ativado (90,45%) e ácido ascórbico (93,30%). Porém, o que fica caracterizado é o efeito no controle da oxidação pelo ambiente escuro (parcial) e de forma mais acentuada, pelos antioxidantes de natureza química, precipuamente para o carvão ativado e ácido ascórbico, promovendo um acréscimo na porcentagem de embriões viáveis sem oxidação, entre o ácido ascórbico (93,30% de germinação) e o controle-claro (60,39%) de 32,91% de embriões da guarirobeira viáveis a mais (Figura 2).

Pelos resultados obtidos, fica evidenciado que o embrião em condições



de cultivo *in vitro*, com a utilização de antioxidantes e meio adequado, permite uma maior viabilidade de germinação do que em condições *ex vitro*, possivelmente pela eliminação do mecanismo de dormência, ocasionado no fruto semente, além de reduzir substancialmente o tempo para germinação, que em *in vitro* foi de 30 dias.

Para Borges e Rena (1993) germinação é a saída do estado de repouso e entrada em atividade metabólica ou a retomada do crescimento do embrião (Labouriau, 1983).

O processo de germinação ocorreu como a descrição efetuada por Tolinson(1960) e Lorenzi (1996), exceto com relação ao fato de não ocorrer a formação do haustório (responsável pela extração das substâncias nutritivas do endosperma e transportá-las para o embrião), pois o mesmo ficou atrofiado; por isso, a absorção das substâncias e água foi efetuada diretamente pelo embrião e plântula da guarirobeira em contato direto com o meio de cultura, dentro do tubo de ensaio, Figura 5 (foto b).

A dormência em palmeira, Pinheiro (1986) e especificamente em guarirobeira, Diniz e Sá (1995) é ocasionada pelo fato do endocarpo do fruto semente, Figura 5 (foto a), funcionar como um mecanismo de controle da entrada de água para a semente (Carvalho e Nakagawa, 1983). Desta forma, o poder germinativo do fruto semente da guarirobeira oscila de 50-60%, num período de 60-120 dias (Silva et al., 1992; Diniz e Sá, 1995), tendo como um dos principais componentes da redução no poder germinativo em palmeiras a infestação pela colebroca (bicho do coco), *Pachymerus nucleorom*, Fabr., 1792 (Gallo, 1988), que também provocou a destruição do embrião e endosperma do fruto semente da guarirobeira, Figura 5(foto c). A identificação da praga, neste experimento, foi procedida no laboratório de entomologia da EPAMIG-UFLA, em Lavras-MG.



FIGURA 5. Foto-a: Fruto semente com endocarpo duro, fibroso, impermeável e com 3 poros germinativos, sendo somente um funcional; Foto-b: Plântula da guarirrobeira em meio com ácido ascórbico, mostrando o haustório atrofiado (ponto branco na extremidade da plântula); Foto-c: Coleobroca de *Pachymerus nucleorom*, destruidora do endosperma e embrião. UFLA, Lavras, MG, 2000.

A cultura de embrião *in vitro* da guarirobeira evita a destruição do embrião, pois é extraído do fruto semente antes de ser devorado pela coleobroca (*Pachymerus nucleorom*).

O PVP-40 (3,27 folhas) e o ácido ascórbico (3,09 folhas) foram os antioxidantes que permitiram a formação do maior número médio de folhas na plântula da guarirobeira, e o ambiente claro-controle (3,01 folhas). Contudo o carvão ativado (2,89 folhas) não resultou no mesmo benefício dentro do grupo dos antioxidantes químicos utilizados. Da mesma maneira, ocorreu com ambiente escuro (2,36 folhas), provocando a formação do menor número médio de folhas e também o menor tamanho da folha (6,57 cm) na plântula da guarirobeira, sendo que, para os tratamentos ácido ascórbico (10,68 cm); PVP-40 (9,97cm); ambiente claro (11,10cm); e carvão ativado (12,76cm), este último, foi o que apresentou o maior tamanho de folha, de 6,19 cm superior ao ambiente escuro-6,57cm (Figura 4).

Com relação ao ambiente claro ou escuro, ficou evidenciado que a luminosidade é benéfica ao desenvolvimento das plântulas da guarirobeira e é avaliada através das variáveis número e tamanho médios da folha da plântula, pois no claro e escuro o número médio de folhas foi de 3,01 e 2,36 e o tamanho de folha de 11,10 e 6,57 cm, respectivamente. Apesar da baixa taxa de fotossíntese que ocorre *in vitro*, as plântulas da guarirobeira provavelmente tiveram o desenvolvimento vegetativo beneficiado pela presença da luz na sala de crescimento (Figura 3 e 4).

As variáveis número e tamanho médio das folhas da plântula na guarirobeira são de suma importância pelo fato de que a parte economicamente rentável é o palmito, que é constituído pelas folhas tenras, primórdio foliar,

gema apical do caule, e estipe tenro (FAO/WHO, citado por Ferreira e Paschoalino, 1987; Bovi, 1993), portanto, a identificação de genótipos com maior número e tamanho de folha da plântula da guarirobeira irá permitir a seleção de genótipo superior de maior produtividade, precocemente. No experimento, a avaliação foi procedida aos 110 dias, haja visto que em condições *in vivo* o período necessário para este tipo de avaliação seria de 240 a 300 dias (formação da muda da guarirobeira).

Para todas as variáveis, o ácido ascórbico e o carvão ativado foram antioxidantes muito eficazes, tendo para oxidação (3,37 e 7,09%); germinação (93,30 e 90,45%); número médio de folha (3,09 e 2,89); e tamanho da folha (10,68 e 12,76 cm), respectivamente, Figuras(2, 3 e 4). Entretanto, o ácido ascórbico apresenta algumas vantagens em relação ao carvão ativado para uso *in vitro* na guarirobeira, tais como: praticidade no manuseio; não precipita quando em repouso, antes de geleificar; maior facilidade para visualizar o embrião em cultura *in vitro*; também das raízes, apesar de não ter havido enraizamento durante os 110 dias de duração total do experimento, discordando de resultados obtidos pelo uso do carvão ativado, como indutor de rizogênese (Fridborg et al., 1978) e em palmácea (Paranjothy e Othaman, 1982), o que não ocorreu nas plântulas da guarirobeira com qualquer tratamento (ambientes: claro e escuro-14 dias; PVP-40-400mg/L: carvão ativado-1,5%; e ácido ascórbico-100mg/L).

7 CONCLUSÕES

-O ácido ascórbico foi o antioxidante mais eficiente no controle da oxidação e que proporcionou a maior porcentagem de germinação dos embriões da guarirobeira, seguido pelo carvão ativado;

- O ambiente escuro e o PVP-40 foram pouco eficientes no controle da oxidação e as porcentagens de germinação foram sensivelmente reduzidas;
- O número e tamanho médio das folhas da plântula da guarirobeira foram superiores para os antioxidantes PVP-40, ácido ascórbico, carvão ativado e ambiente claro do que o ambiente escuro-14 dias;
- A quebra de dormência e o cultivo do embrião *in vitro* viabilizaram um elevado índice de germinação; e
- Não houve enraizamento de forma natural até aos 110 dias de cultivo *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- X ADAMS, R.M.; KOENIGSBERG, S.S.; LANGHANS, R.W. *In vitro* propagation of *Cephalotus follicularis* (Australian patcher plant). *Horticultural Science*, v.14, p.512-513, 1979.
- ANAGNOSTAKIS, S.L. Haploid plants from anthers of tobacco: enhancement with charcoal. *Planta*, Berlin, v.115, p.281-283, 1974.
- ASHUBURNER, G.R.; THOMPSON, W.K.; BURCH, J.M. Effect of α -naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.35, p.157-163, 1993.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. Experimentação agrícola. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247p.
- X BIASI, L.A.; KOLLER, O.C.; KAMPF, A.N. Micropropagação do abacateiro ouro verde a partir de segmentos nodais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.7, p.1051-1058, 1994.
- X BON, M.C.; GENDRAUD, M.; FRANCKET, A. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and nature clones of *Sequoiadendron giganteum*: influence of activated charcoal. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.34, n.3/4, p. 283-291, 1988.

BORGES, E.E. de L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.de; PIÑA-RODRIGUEZ, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES. 1993. p.83-135.

BOVI, M.L.A. Híbridos de palmito In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE PALMITO,1, 1993, Piracicaba. Anais ... Piracicaba: CALQ, 1993. p.29-48.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 87-132.

CALDAS, L.S.; TAKETOMI, C. Desinfestação e controle de oxidação de explantes lenhosos de Jabuticabeira e Goiabeira para cultura de tecidos. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasília, v.5, n.1, p.107. 1993.

CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 421 p.

CHOO, W.K. Palm tissue culture. In. SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE, TECHNOLOGY AND UTILIZATION, 1984, Norway. Proceedings... Norway: FAO, 1984. p.88-112.

CREASY, L.L. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disk and its correlation with flavonoids synthesis. Phytochemistry, Oxford, v.7, p.441-446, 1968.

DAVIES, M.E. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. Planta, Berlin, v.104, p.50-65, 1972.

DE GUZMAN, E.V.; MANUEL, G.C. Improved root growth in embryo and seedlings cultures of coconut "makapuno" by the incorporation of charcoal in the growth medium. Rome: FAO, 1975. 6 p.

DINIZ, J.A.; SÁ, L.F. de A cultura da guariroba. Goiânia: EMATER-GO, 1995. 16 p. (EMATER. Boletim técnico 003).

EBERT, A.; TAYLOR, H.F. Assessment of the changes of 2-4-D dichlophenoxyacetic acid concentration in plant tissue culture media in the presence of atived charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, n.20, p.165-172, 1990.

FERREIRA, V.L.P.; PASCHOALINO, J.E. Pesquisa sobre palmito no Instituto de tecnologia de alimentos – ITAL. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISADORES EM PALMITO, 1., 1997, Curitiba,. *Anais...* Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 45-55.

FRIDBORG, G; ERIKSSON, T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 34, p.306-308, 1965.

FRIDBORG, G.; PEDERSON, M.; LANDSTROM, L.E.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites, inhibition of morphogenesis. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.43, p.104-106, 1978.

GALLO, D. *Manual de Entomologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649p.

X GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture, part.2 In Practice*, 2. ed. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1361p.

X GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture*. England: Eastern Press, 1984. 709p.

X GOULD, J.H.; MURASHIGE, T. Morphogenic substances released by plant tissue cultures: I. Identification of berberine in *Nandino* culture medium, morphogenesis and factors influencing accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.4, n.1, p.29-42, 1985.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 183-260.

- GRATTAPALGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas: Parte II. Técnicas Básicas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-170.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis Mart.* (Palmae). *Plant Cell Reports*, Berlin, v.7, p.550-552, 1988.
- GUPTA, P.P. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.6, p.33-39, 1986.
- GUPTA, P.K.; NADGI, A.F.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis L.* by tissue culture. *Plant Sciences*, Knoxville, v.17, p.259-268, 1980.
- HANOVER, J.; PANNETIER, C. "In vitro" propagation of the oil palm *Elaeis guineensis Jacq.* In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURES, 5., 1982, Tokyo,. *Proceedings...* TOKYO: Japanese Association For Plant Tissue Culture, 1982. p.745-746.
- JARRET, R.L.; RODRIGUEZ, W; FERNANDEZ, R. Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of "Sabá" and "Pelipita" plantains in Costa Rica. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.25, p.137-147, 1985.
- LABOURIAU, L.G. A germinação das sementes. Washington: OEA, 1983. 174p.
- LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Efeito do tamanho do explante no desenvolvimento *in vitro* da bananeira (*Musa acuminata colla*) cultivares 'Prata' e 'Nanicão'. *Ciência e Prática*, Lavras, v.12, n.2, p.207-211, 1988.
- LORENZI, H. *Palmeiras no Brasil: exóticas e nativas*, Nova Odessa: Plantarum, 1996. 303p.
- MANTE, S.; TEPPER, H.B. Propagation of *Musa textilis* Neé plants from apical meristem slices *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.2, p.151-159, 1983.

- MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.65, n.2, p.103-111, 1990.
- MONACO, L.C.; SONDAHL, M.R.; CARVALHO, A.; CROCOMO, O.J. SHARP, W.R. Applications of tissue culture in the improvement of coffee In: REINERT, J. BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-129.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- PANNETIER, C.; BUFFARD-MOREL, J. Coconut palm (*Cocos nucifera* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: 1. Trees. I*. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.430-453.
- PARANJOTHY, K.; OTHAMAN, R. "*In vitro*" propagation of oil palm. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE, 5., 1982, Tokio. *Proceedings...* Tokio: Japanese Association For Plant Tissue Culture, 1982. p.747-748.
- PINHEIRO, C.M.B. *Germinação de semente de palmeiras: revisão bibliográfica*. Teresina: EMBRAPA-UEPAE, 1986. 102p.
- PREECE, F.E.; COMPTON, M.E.I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry: 17 - High-Tech and micropropagation I*. Berlin: Springer Verlag, 1991. p.168-189.
- QUERALT, M.C.; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; DEBERGH, P. C. Ornamentals. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds.). *micropropagation: technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.215-229.
- REYNOLDS, J.F.; MURASHIGE, T. Assexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In vitro*, Gaiphersberg, n.5, p.383-385, 1979.

- REINOLDS, J.F. Vegetativa propagation of palm trees. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (eds.) *Tissue culture in forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1982. p. 182-207.
- SILVA, J.A. da; SILVA, D.B. da; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M de Coleta de sementes, produção de mudas e plantio de espécies frutíferas nativas dos cerrados: informações exploratórias. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992. 23 p.
- SIQUEIRA, E.R.; INOUE, M.T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.26, n.7, p.949-953, 1991.
- TEIXEIRA, J.B. Development of "*in vitro*" techniques of oil palm (*Elaeis guineensis Jacq*). New Brunswick: Rutgers University, 1990. 152 p. (Ph D.-Rutgers University).
- TISSERAT, B. Palms. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D.J. *Cell and Tissue Culture in forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p.339-356.
- TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, v.30, n.19, p.1275-1283, 1979.
- TOMLINSON, P.B. Essays on the morphology of palms germination and seedlings. *Principes*, Lawrence, v.4, n.2, p.56-61, 1960.

CAPÍTULO 3

CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO PARA A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DO EMBRIÃO DA GUARIROBEIRA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

1 RESUMO

Com o objetivo de avaliar os efeitos da desinfestação do fruto semente com álcool-70%, associado a do embrião com benomyl sobre a contaminação e germinação *in vitro* do embrião da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], foi conduzido um experimento no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras-MG. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos (T1: Sem aplicação de álcool etílico-70% no fruto semente e sem benomyl na assepsia do embrião; T2: Sem álcool etílico-70% no fruto e com benomyl-1g/L na assepsia; T3: Com álcool etílico-70% no fruto e sem benomyl-1g/L na assepsia; e T4: Com álcool etílico-70% no fruto e com benomyl-1g/L na assepsia), 5 repetições, 20 parcelas, 4 tubos/parcela e um embrião/tubo. O explante utilizado foi o embrião extraído do fruto semente (com e sem aplicação de álcool etílico-70%) e submetido também à desinfestação (Todos os embriões foram colocados numa solução comercial de hipoclorito de sódio-2%, na proporção de 20% (v/v) na presença de benomyl-1g/L ou ausência, conforme cada tratamento). O meio utilizado foi MS (Murashige e Skoog, 1962). A inoculação dos embriões foi efetuada em câmara de fluxo laminar e transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas. As variáveis avaliadas foram: Contaminação (aos 8 dias) e germinação (aos 30 dias). O álcool etílico-70%, usado na desinfestação do fruto semente e o benomyl-1g/L no embrião da guarirobeira, reduziram drasticamente a contaminação fúngica (3,37%) e redundaram num alto índice de germinação dos embriões (98,80%); o benomyl-1g/L aplicado na desinfestação do embrião na ausência do álcool etílico-70%, no fruto semente, foi menos eficiente no controle da contaminação por fungos do que álcool etílico-70% sozinho; o benomyl-1g/L não controlou com eficiência o *Fusarium sp* na desinfestação do embrião da guarirobeira; é inviável a cultura da guarirobeira *in vitro*, a partir do fruto semente e embrião contaminados com fungo saprofítico, sem a desinfestação com álcool etílico-70% e com benomyl-1g/L, respectivamente.

Palavras-chave: *Syagrus*, guariroba, gueroba, guarirobeira, benomyl, embrião, álcool

CONTROL OF THE CONTAMINATION FOR THE *IN VITRO* GUARIROBEIRA EMBRYO GERMINATION [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

2 ABSTRACT

With the objective of evaluating the effects of the deinfestation of the seed fruit with 70% alcohol associated with that of the embryo with benomyl on the contamination and *in vitro* germination of the guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] an experiment was conducted in the plant tissue culture laboratory of the Universidade Federal de Lavras-MG. The experimental design utilized was the completely randomized with four treatments (T1: no application of 70 % ethylic alcohol in the seed fruit and no benomyl in the asepsis; T2: no 70% ethylic embryo and with benomyl-1g/L in the asepsis T3: with 70% ethilic alcohol in the fruit and no benomyl-1g/L in the asepsis and T4: with 70% ethilic alcohol in the fruit and with benomyl-1g/L in the asepsis), 5 replications and 20 plots, each plot being made up of four tubes and one embryo/tube. The explant utilized was the embryo from the seed fruit (with and without the application of 70% ethylic alcohol) and submitted also to the deinfestation (all the embryos were put into a commercial solution of 2% sodium hypochlorite at the ratio of 20% (v/v) in the presence of benomyl-1g/L or absence, according to each treatment) The medium utilized was MS (Murashige- Skoog, 1962). Embryo inoculation was performed in laminar flux chamber and transferred into the growth room with 16 hour photoperiod. The variables evaluated were: contamination (at 8 days) and germination (30 days). 70% ethylic alcohol used in the seed fruit deinfestation associated with benomyl-1g/L in the deinfestation of the guarirobeira embryo markedly reduced the fungal contamination (3.37%) and came to be a high index germination of embryos (98.80%), benomyl-1g/L applied in the embryo deinfestation in the absence of 70% ethylic alcohol in the seed fruit was less efficient in fungal contamination control than 70% ethylic alcohol alone; benomyl-1g/L did not control *Fusarium* sp in the deinfestation of the guarirobeira embryo; *in vitro* guarirobeira crop is unfeasible, from the seed fruit and fruits contaminated by saprophytic fungi with the deinfestation with 70% ethylic alcohol and deinfestation with benomyl-1g/L, respectively.

Key words: *Syagrus*, guariroba, guarirobeira, gueroa, embryo, benomyl, alcohol

3 INTRODUÇÃO

A escolha da técnica de desinfestação na guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] está diretamente vinculado à natureza do material vegetal propagativo, visando eliminar fungos presentes na superfície externa e na parte interna do fruto semente e explante.

A redução no período de permanência do fruto semente da guarirobeira no campo pode, em alguns casos, vir a ser uma estratégia para redução da taxa de inóculo, a qual determina o grau de contaminação. Acredita-se que o manejo pós colheita do fruto semente seria decisivo sob o ponto de vista de distribuição de inóculo entre os frutos sementes, ou mesmo na adequação de condições ambientais favoráveis para perpetuação da associação fungo-fruto semente (Machado, 1988).

Além dos fatores vinculados à composição do meio de cultura, as respostas morfogênicas são alteradas em conformidade com as condições a que são submetidas as plantas. Desta forma, diversos vetores, entre os quais as contaminações causadas por fungos e/ou bactérias, representam imensa dificuldade em programas de micropropagação, envolvendo notadamente plantas ainda não estabelecidas *in vitro*. Para minimizar tais problemas de contaminação, algumas tentativas têm sido efetuadas como o uso de fungicida e/ou bactericida no tratamento do material de propagação ou no meio (Ramos, 1994).

A contaminação com microorganismos é considerada como o mais importante fator para as perdas durante a cultura *in vitro* (Leifert e Waites, 1990).

Desta forma, a busca pela obtenção de fruto semente da guarirobeira e embrião descontaminados de fungos é necessária ao saber, que estes podem

servir como veículos de disseminação e provocar, no meio de cultura, a contaminação e destruição do explante (embrião).

O objetivo do trabalho realizado foi o de avaliar os efeitos da desinfestação do fruto semente com álcool etílico-70%, associado a do embrião com benomyl, sobre a contaminação e germinação *in vitro* do embrião da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

4 REFERENCIAL TEÓRICO

O inóculo do contaminante pode atingir a planta, notadamente o fruto e a semente, na fase inicial, sendo transportado por correntes aéreas, insetos, animais ou respingos de chuvas, partindo-se de uma fonte externa que pode ser o solo ou uma outra planta hospedeira (Machado, 1988)

As contaminações podem ser controladas com fungicidas durante a desinfestação; o benomyl é recomendado como fungicida devido a apresentar amplo espectro de ação, sendo também pouco tóxico às culturas nas concentrações para controlar fungos (Grattapaglia e Machado, 1990).

O benomyl é um fungicida sistêmico, sendo absorvido e translocado entre as células e órgãos vegetais e por isso protege, não só o meio de cultura, mas também o material vegetal da contaminação fúngica (Yang, 1976). Pertence ao grupo dos benzimidazóis, com poder residual de 1 a 3 semanas, com princípio ativo benomyl-50%. Impede a multiplicação de inúmeros fungos. No entanto, algumas espécies e raças de fungos são tolerantes ao benomyl (Cardoso et al., 1979).

A soma de ações de várias populações fúngicas diferentes, sobre a semente, pode redundar em perda total ou parcial do poder germinativo. Gibson

(1957), citado por Sales (1992), referindo-se a sementes de *Pinus patula*, relatou que fungos saprófitas, tais como *Aspergillus* e *Mucor*, presentes nas sementes, podem, sob certas condições, invadir os tecidos de sementes germinadas e até matar as plântulas.

Martins (1991), trabalhando com espécies florestais, encontrou uma grande incidência de *Fusarium sp* e *Phomopsis sp* em sementes de Ipê roxo, tanto colhidas nas plantas quanto coletadas no solo, admitindo maior contaminação das sementes quando ainda no campo. Os dois gêneros de fungos provocaram uma maior redução na altura de plântulas de ipê roxo quando inoculados via solo ou mesmo quando imersas em suspensão de esporos. Quando inoculado via solo, *Fusarium sp* mostrou-se mais agressivo, reduzindo a emergência em 33%. Para todas as espécies avaliadas, a germinação das sementes coletadas no solo foi inferior à das colhidas na árvore.

Carneiro (1986), estudando a sanidade de sementes de 18 gêneros e/ou espécies florestais, dentre estas o ipê (*Tabebuia sp*), provenientes dos Estados do Amazonas, Pará, Distrito Federal, Espírito Santo e Santa Catarina, observou que entre os 30 gêneros de fungos identificados, alguns são fitopatogênicos, tais como: *Fusarium*, *Curvularia*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia*, *Phoma*. Relata também que o *Fusarium*, foi o gênero mais encontrado (52,3% das sementes), com a maioria colonizando as sementes internamente, além dos gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium* reduzirem em 40% a germinação das sementes de *Pinus taeda*.

Nobre (1994) identificou, em sementes de angico vermelho *Anadenanthera macrocarpa*, através do "Blotter Test", os seguintes fungos: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botryodiplodia Theobromae*. As sementes danificadas foram mais severamente atacadas pelo gênero *Fusarium*. E quanto aos tratamentos, o benomyl provocou uma redução na percentagem de infestação fúngica (exceto para o *Fusarium*), enquanto o hipoclorito de sódio não promoveu nenhum controle dos fungos.

Singh (1985) reporta que há possibilidade de transmissão de doenças via sementes. Cita como exemplos: *Botryodiplodia palmarum* e *Fusarium semitectum*, sendo que este último causou a morte em plântulas e regenerantes de área degradada, e é disseminado de uma região para outra.

Mittal (1983) relata que *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus*, reduziram a porcentagem de germinação em sementes de *Cedrus deodora* na Índia.

Medeiros et al. (1992) trabalhando com sementes de aroeira. *Astronium urundeuva*, coletadas em 122 árvores, nos Estados do Piauí e Bahia, identificaram e quantificaram 25 espécies e/ou gêneros fúngicos, sendo que os mais freqüentes foram: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Phoma* e *Curvularia*.

Para Carneiro (1987) os gêneros *Fusarium*, *Curvularia*, *Rhizoctonia* e *Botryodiplodia* são os patógenos mais encontrados, em espécies florestais, colonizando as sementes.

O controle químico de fungos nas sementes; permite a manutenção da germinação, dependendo obviamente de vigor das mesmas, contudo, com relação ao *Fusarium*, somente controlou parcialmente (Novembre e Marcos Filho, 1991).

O benomyl, no tratamento químico de sementes florestais, foi o mais efetivo exceto para os fungos *Cephalosporium sp* e *Fusarium spp*, pois, a diversidade dos fungos presentes nas sementes é muito grande, o que dificulta um controle de todos os microorganismos patogênicos (Hassal, 1982).

Wittenbach e Bukovac (1980) reduziram a contaminação por microorganismos fitopatogênicos na cultura da cerejeira *in vitro* com adição de 100 mg/L de benomyl ao meio.

O benomyl adicionado ao meio, na concentração de 50 mg/L, conforme Hauptmann, Widholm e Paxton (1985), controlou a contaminação de *Penicillium* em cultura de protoplastos de inúmeras espécies.

Haldemann, Thomas e McKamy (1987) eliminaram a contaminação proveniente de fungos em ápices de *Camellia* oriundos do campo adicionando, ao meio, dosagens que oscilaram de 0,50 a 1,0 g/L de benomyl.

Carvalho, Pinto e Pasqual (1990) obtiveram uma redução de até 30% na contaminação quando utilizaram diferentes concentrações de benomyl na assepsia de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis*.

O benomyl- 2,5g/L como tratamento químico no ipê roxo *Tabebuia impetiginosa* reduziu a infestação de fungos nas sementes, no entanto, aumentou o número de plântulas anormais (Nobre, 1994).

O álcool etílico a 70%, conforme Thomas e Davey (1975), remove parte da cera do órgão e proporciona à superfície deste uma melhor penetração do agente esterilizante, entretanto, o período da esterilização deve ser determinado para cada espécie vegetal, em função dos microorganismos fitopatogênicos encontrados no material a ser utilizado.

Camargo (1997) trabalhou com diferentes sistemas de desinfestação de sementes de castanheira do Brasil *Bertholletia excelsa* e demonstrou a superioridade na utilização do álcool etílico diluído e hipoclorito de sódio, notadamente em fungos saprofiticos que contaminam frutos e sementes.

Lane (1987) obteve bons resultados de desinfestação empregando apenas álcool etílico a 70%, por cinco segundos, na assepsia de ápices caulinares de macieira.

Werner e Boe (1980), desinfestando ápices caulinares do porta-enxerto de macieira M-7 com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 0,5%, obtiveram uma contaminação de 15% no material inicial e apenas 5% em subcultivos posteriores.

Para Grattapaglia e Machado (1988), o álcool etílico é normalmente utilizado a 70%, pois acima desta concentração é menos eficiente como germicida e pode provocar a desidratação rápida dos tecidos vegetais.

A utilização somente de hipoclorito de sódio a 1% na desinfestação de explante de macieira, durante 15 minutos, foi eficiente (Sriskadarajah, Mullins e Nair, 1982).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA).

Os frutos maduros da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], foram obtidos no município de São Luis de Montes Belos-GO.

Os frutos necessários à instalação do experimento foram inicialmente divididos em 2 lotes, sendo um sem aplicação de álcool-70% e o outro com os frutos esparramados numa área cimentada em camada única. Foram submetidos a 9 aplicações de álcool etílico a 70%, com pulverizador manual, durante 3 dias, sendo 3 aplicações diárias, em intervalos de 4 horas.

O explante utilizado foi o embrião da guarirobeira, extraído do fruto com a quebra do endocarpo (parte dura do fruto), com auxílio de dois paralelepípedos (um grande com ± 8 Kg, com depressão e outro pequeno com ± 2 Kg para a quebra). Posteriormente, os embriões foram colocados em placa de petri com papel de filtro para evitar a desidratação.

Os embriões foram acondicionados em pequenos recipientes de pano, tipo tela, e colocados em água corrente durante 3 horas, para absorção da água e pré-limpeza.

Os embriões foram submetidos à assepsia em uma solução constituída de produto líquido comercial-2% de hipoclorito de sódio na proporção de 20% (v/v), acrescida da dose de benomyl-1g/L, durante 20 minutos, sob constante agitação ou sem benomyl, conforme cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos, 5 repetições e 20 parcelas, sendo cada parcela formada por 4 tubos e um embrião/tubo. Os tratamentos foram os seguintes: T1: sem aplicações do álcool etílico-70% no fruto semente e sem benomyl na assepsia do embrião; T2: sem álcool etílico-70% no fruto e com benomyl na assepsia; T3: com álcool etílico-70% no fruto e sem benomyl- 1g/L, na assepsia; e T4: com álcool etílico-70% no fruto e com benomyl 1g/L na assepsia.

O meio de cultura usado foi MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 30g/L de sacarose e ácido ascórbico-100 mg/L. O pH das soluções foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$. O meio foi solidificado com ágar a 0,7%. Cada tubo de ensaio (25x150 mm) recebeu 10 mL do meio de cultura e foi fechado com tampa plástica, posteriormente, foi autoclavado à temperatura de 121 °C, pelo tempo de 20 minutos, numa pressão de 1 atm.

Na câmara de fluxo laminar, os embriões, ainda nos recipientes, foram lavados por 4 vezes, em água destilada e autoclavada, conforme cada tratamento. Também foi procedido a inoculação, sendo um embrião para cada tubo, após, colocou-se uma tampa de plástico em cada tubo e com filme plástico realizou-se a vedação.

Em seguida o material foi transferido para sala de crescimento, onde os tubos foram mantidos com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecido por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria e temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ \text{C}$.

As características avaliadas foram: contaminação (%), com avaliação aos 8 dias; germinação (%), com avaliação aos 30 dias. Todos os dados foram transformados para arco seno raiz quadrada de X/100 (Banzatto e Kronka, 1992).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância encontra-se na (Tabela 2). Houve diferença altamente significativa para as variáveis contaminação e germinação.

TABELA 2. Resumo das análises de variância para a contaminação e germinação obtidas no experimento sobre o Controle da contaminação para a germinação *in vitro* do embrião da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.].UFLA, Lavras, MG, 2000.

Quadrados médios			
Causas de variação	G.L.	Contaminação (%)	Germinação (%)
Álcool-benomyl	3	4408,0686**	4537,0255**
Resíduo	16	143,2338	151,0190
Coef. Variação(%)		29,05	24,04

**; Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Os resultados para as características contaminação e germinação (Figura 6), mostram que não houve diferença significativa entre os tratamentos: (s/ álcool, s/ benomyl e s/ álcool, c/ benomyl) e (s/ álcool, c/ benomyl e c/ álcool, s/ benomyl) além de (c/ álcool, s/ benomyl e c/ álcool, c/ benomyl) para contaminação; enquanto na germinação, os resultados foram (s/ álcool, s/ benomyl e s/ álcool, c/ benomyl) e (s/ álcool, c/ benomyl e c/ álcool, s/ benomyl), além de (c/ álcool, s/ benomyl e c/ álcool, c/ benomyl) (Figura 6).

A contaminação do fruto semente, embriões da guarirobeira e do meio de cultura *in vitro* no experimento foi provocada por fungos, notadamente

saprotíficos, conforme a identificação efetuada na clínica fitossanitária da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os fungos encontrados, em ordem decrescente, foram: *Fusarium sp* (57,60%); *Aspergillus sp* (15,40%); *Rhizopus sp* (15,40%) e *Curvularia sp* (11,60%) (Tabela 3).

Um dos grandes entraves para trabalhar com o embrião da guarirrobeira foi a contaminação ocasionada no meio de cultura e embrião, oriunda de microorganismos fúngicos procedentes, precipuamente de frutos sementes. Há relatos, na literatura, de que os fungos contaminam os frutos sementes já no campo, em inúmeras espécies vegetais (Singh, 1985; Carneiro, 1987; Machado, 1988; Martins, 1991; Medeiros et al. 1992).

TABELA 3. Fungos presentes no fruto semente, embrião e meio de cultura *in vitro* da guarirrobeira. UFLA, Lavras, MG, 2000.

FUNGO/GENERO	PORCENTAGEM(%)
<i>Fusarium sp</i>	57,60
<i>Aspergillus sp</i>	15,40
<i>Rhizopus sp</i>	15,40
<i>Curvularia sp</i>	11,60

*Identificação efetuada no Laboratório de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras-MG.

Sendo portanto os mais relevantes (*Fusarium sp*; *Aspergillus sp*; *Rhizopus sp*; e *Curvularia sp*), em outras espécies vegetais, assim como ocorreu no fruto semente e embrião da guarirobeira (Carneiro, 1986; Martins, 1991; Medeiros et al. 1992; Nobre, 1994). Tendo ainda como o fungo saprófita de maior ocorrência *Fusarium sp*, bem como de maior dificuldade de controle químico, conforme os mesmos pesquisadores.

O álcool etílico- 70%, pulverizado na superfície total do fruto semente, com nove aplicações, sendo 3 por dia, no intervalo de 4 horas, durante o dia, reduziu drasticamente a contaminação fúngica (<19%) e redundou num índice de germinação dos embriões da guarirobeira acima de 83%. Entretanto, a utilização do benomyl- 1g/L, sozinho, foi menos eficiente no controle fúngico, pois permitiu uma contaminação de 60,39%, com índice de germinação dos embriões da guarirobeira de 39,60%; portanto, bem inferior às porcentagens obtidas para álcool etílico-70% sozinho, (Figura 6). No entanto, resultados superiores foram obtidos com associação do álcool etílico- 70%, pulverizado no fruto semente e benomyl- 1g/L na desinfestação do embrião durante 20 minutos, antes da inoculação, mostrando um efeito sinérgico dos fungicidas (benomyl e álcool), havendo uma diferença significativa para a contaminação, em que a testemunha (s/ álcool, s/ benomyl) foi de 95,67% e o tratamento (c/ álcool e c/ benomyl) de 3,37%. Da mesma forma ocorreu para o índice de germinação, pois (c/ álcool e c/ benomyl) foi de 98,90% e a testemunha de somente 7,09% de germinação para os embriões da guarirobeira *in vitro*. A germinação dos embriões podem ser drasticamente afetada como ocorreu na guarirobeira *in vitro*.

Gibson (1957), citado por Sales (1992) observou uma redução drástica da germinação ocasionada por fungos saprófitas entre os mesmos (*Fusarium sp*, *Aspergillus sp*, *Rhizopus sp*, *Curvularia sp*), assim como outros autores

observaram nas espécies vegetais: Martins (1991) em ipê roxo; Carneiro (1986) em 18 gêneros de espécies vegetais, Mittal (1983) em *Cedrus odorata* na Índia.

O álcool etílico- 70% e o benomyl têm sido recomendados em vários trabalhos de pesquisa com cultura de tecidos vegetais para efetuar o controle dos fungos *ex vitro* e *in vitro*, pois caso contrário seria praticamente impossível o estabelecimento *in vitro* de embriões da guarirobeira de forma racional, devido à contaminação no fruto semente e embrião.

Para Thomas e Davey (1975) e Grattapaglia e Machado (1998), o álcool etílico-70% apresenta maior eficiência como fungicida do que o álcool puro, pois não desidrata rapidamente os tecidos vegetais e retira a camada de cêra da superfície do órgão para facilitar a penetração do agente esterilizante.

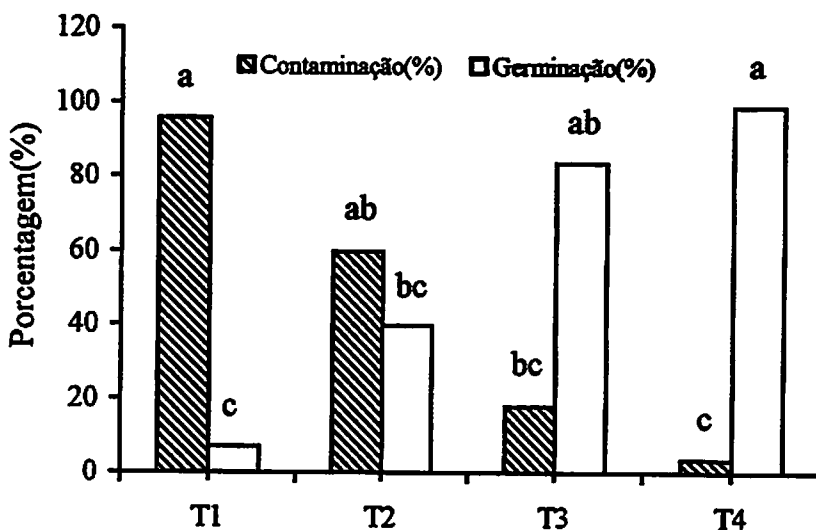


FIGURA 6. Efeitos da desinfestação com álcool etílico-70%, pulverizado no fruto semente da guarirobeira e benomyl aplicado no embrião nas combinações: T1(S/ álcool e S/ benomyl); T2 (S/álcool e C/ benomyl); T3(C/ álcool e S/ benomyl); T4(C/ álcool e C/ benomyl), sobre as variáveis contaminação e germinação (Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%).UFLA, Lavras, MG, 2000.

Vários trabalhos utilizando o álcool etílico-70% na desinfestação têm mostrado a sua eficácia, assim como: Camargo (1997) usando álcool etílico-70% na desinfestação de semente e fruto da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*); Werner e Boe (1980); Lane (1987) em ápices caulinares de macieira.

Outro fungicida utilizado em desinfestação na maioria das culturas de tecidos vegetais com problema de contaminação, e por conseguinte redução no índice de germinação, é o benomyl, por ser sistêmico, amplo espectro de ação, pouco fitotóxico (Yang, 1976; Grattapaglia e Machado, 1990), com poder residual de 1 a 3 semanas (Cardoso et al., 1979), sendo utilizado, no meio, nas dosagens: 100 mg/L em cerejeira (Wittenbach e Bukovac, 1980); 50 mg/L em culturas de protoplastos de inúmeras espécies, Hauptmann, Widholm e Paxton (1985); e na assepsia com as dosagens: em ápices caulinares de *Camellia*, oriundos do campo, doses que variaram de 1 a 2g/L de benlate (50% de benomyl), Haldemann, Thomas e McKamy (1987); em segmentos nodais de *Eucalyptus grandis*, Carvalho, Pinto e Pasqual (1990); em sementes de *Tabebuia impetiginosa* na dose de 2,54g/L de benomyl (Nobre, 1994).

No entanto, há inúmeros relatos demonstrando que o benomyl não controla com alta eficiência o fungo *Fusarium spp* (Cardoso et al., 1979; Hassal, 1982; Novembre e Marcos Filho, 1991; Nobre, 1994). Este fungo saprófita foi o mais frequente no fruto semente, embrião da guarirobeira e meio de cultura (Tabela 3), mostrando que a contaminação, quando se utilizou somente o benomyl, redundou em mais de 60% de contaminação, enquanto o álcool etílico- 70% sozinho reduziu a contaminação para 18,05%. Todavia, o uso de álcool etílico- 70% com benomyl, devido ao efeito sinérgico, é que proporcionou um alto índice de controle da contaminação (3,73%) (Figura 6). O hipoclorito de sódio foi ineficiente no controle dos fungos identificados no fruto semente e embrião da guarirobeira (Tabela 3), pelo fato de que a testemunha (s/ álcool, s/ benomyl) teve assepsia efetuada com a utilização do hipoclorito de sódio (20% do produto comercial-v/v), tendo um índice de contaminação de 95,67% e o pior índice de germinação (7,09%) (Figura 6). Resultado semelhante foi obtido por Nobre (1994) com sementes de angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*). Porém, Camargo (1997) obteve bons

resultados no controle de fungos saprófitas que contaminam frutos e sementes de *Bertholletia excelsa* e Sriskadarajah, Mullins e Nair (1982) na desinfestação de explante de macieira com hipoclorito de sódio.

7 CONCLUSÕES

-O álcool etílico- 70% usado na desinfestação do fruto semente, associado com benomyl-1g/L no embrião da guarirobeira, reduziram drasticamente a contaminação fúngica (3,37%) e garantiram um alto índice de germinação dos embriões (98,90%), *in vitro*;

-O benomyl-1g/L aplicado na desinfestação do embrião na ausência do álcool etílico- 70%, no fruto semente, foi menos eficiente no controle da contaminação por fungos do que álcool etílico- 70% sozinho;

-O benomyl-1g/L não controlou com eficiência o *Fusarium sp* na desinfestação do embrião, reduzindo acentuadamente a porcentagem de germinação *in vitro* ;e

-É inviável a cultura *in vitro* da guarirobeira a partir de fruto semente e embrião contaminados com fungo saprofítico sem a desinfestação com álcool etílico- 70% e benomyl- 1g/L, respectivamente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. *Experimentação agrícola*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247p.
- CAMARGO, I.P.de. *Estudos sobre a propagação da castanheira do Brasil (Bertholletia excelsa Humb. & Bonpl.)*. Lavras: UFLA, 1997. 127p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- CARDOSO, C.O.N.; CARDOSO, E.J.B.N.; TOLEDO, A.C.D. de; KIMATI, H.; SOAVE, J. Benomyl. In: CARDOSO, C.O.N. *Guia de fungicidas*. 2.ed. São Paulo: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1979. p.17-81.
- CARNEIRO, J.S. Microflora associada às sementes de essências florestais. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.11, n.3, p.557-566, out. 1986.
- CARNEIRO, J.S. Teste de sanidade em essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. *Patologia de Sementes*. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.386-394.
- CARVALHO, D. de; PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex maiden. *Ciência e Prática*, Lavras, v.14, n.1, p.97-106, 1990.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas*.(eds.). Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: CNPq, 1998. p.183-260.
- HALDEMAN, J.H.; THOMAS, R.L., Mc KAMY, D.L. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. Japonica*. *HortScience*, Alexandria, v.22, p.306-307, 1987.

- HASSAL, K.A. Fungicides: general principles, inorganic and heavy metal fungicides. In: HASSAL, K. A. *The chemistry of pesticides: their metabolism mode of action and uses in crop protection*. London: Macmillan Press, 1982. Cap.8, p.176-196.
- HAUPTMANN, R.M.; WIDHOLM, J.M.; PAXTON, J.D. Benomyl: a broad spectrum fungicide for use in plant cell and protoplast culture. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.4, p.129-132, 1985.
- LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters*, New York, v.13, p.281-285, 1987.
- LEIFERT, E; WAITES, W.M. Bacteria and yeasts; important contaminants in micropropagated plant cultures. In: *INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE*, 7., 1990, Dordrecht. Abstracts ... Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p.112.
- MACHADO, J.C. *Patologia de sementes: fundamentos e aplicações*. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 106 p.
- MARTINS, S.H. Microflora associada as sementes de barbatimão, ipê amarelo e ipê roxo da região de Lavras- MG: ocorrência e patogenicidade de espécimes. Lavras: ESAL, 1991. 72p. (Dissertação - Mestrado em Fitossanidade).
- MEDEIROS, A.C.S.; MENDES, M.S.S.; FERREIRA, M.A.S.V.; ARAGÃO, F. J.L. Avaliação quali-quantitativa de fungos associados a sementes de aroeira (*Astronium urundeuva*). *Revista Brasileira Sementes*, Brasília, v.14, n.1, p.51-55, 1992.
- MITTAL, R.K. Studies on the mycoflora and its control on the seeds of some forest trees: *Cedrus deodora*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.61, n.1, p.197-201, Jan. 1983.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

NOBRE, S.A.M. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de ipê roxo (*Tabebuia impetiginosa*) e angico vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*) em função de tratamentos diferenciados de frutos e sementes. Lavras: ESAL, 1994. 73p. (Dissertação- Mestrado em Fitotecnia).

NOVEMBRE, A.D.L.; MARCOS FILHO, J. Tratamento fungicida e conservação de sementes de feijão. *Revista Brasileira Sementes*, Brasília, v.13, n.2, p.105-113, 1991.

RAMOS, J.D. Caracterização fenotípica do fruto, micropropagação e germinação de sementes do porta-enxerto tangerina "sunki" (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.). Lavras: ESAL, 1994. 85p. (Tese -Doutorado em Fitotecnia).

SALES, N.L.P. Efeito da População fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê amarelo, ipê roxo e barbatimão. Lavras: ESAL, 1992. 89p. (Dissertação- Mestrado em Fitotecnia).

61

SINGH, S. Forest pathology in Índia: problems and control strategies. *The Indian Forester*, Dehra Dum, v.3, n.11, p.1038-1052, nov. 1985.

SRISKADARAJAH, S.; MULLINS, M.E.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. *Plant Science Letters*, New York, v.24, p.1-9, 1982.

THOMAS, E.; DAVEY, M.R. From single cells to plants. London: Wykeham Publications, 1975. 171p.

WERNER, E.M.; BOE, A.A. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. *HortScience*, Alexandria, v.15, n.4, p. 509-510, 1980.

WITTENBACH, V.A.; BUKOVAC, M.J. *In vitro* culture of sour cherry fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.105, n.2, p. 277-279, 1980.

YANG, H.J. Effect of Benomyl on *Asparagus officinalis* L. shoot and root development in culture média. *HortScience*, Virginia, v.11, n.5, p.473-474, 1976.

CAPÍTULO 4

CULTURA DE EMBRIÃO *IN VITRO* EM COMBINAÇÕES DE MS COM TDZ E BAP NO DESENVOLVIMENTO DA PLÂNTULA DA GUARIROBEIRA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

1 RESUMO

Com o objetivo de avaliar a cultura de embrião *in vitro* em diferentes combinações de MS com TDZ e BAP no desenvolvimento da plântula da guarirobeira, foram conduzidos 2(dois) experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA). O explante utilizado foi o embrião extraído do fruto semente, pulverizado com álcool etílico-70% para descontaminação fúngica. A desinfestação foi procedida com solução comercial com hipoclorito de sódio-2% na proporção de 20% (v/v), acrescido de 1g/L de benomyl, com agitação/20 minutos, após a inoculação dos embriões em câmara de fluxo laminar, foi efetuada a transferência para a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas. Para os 2 (dois) experimentos, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3x3, com 5 repetições e a parcela constituída de 4 tubos e um embrião/tubo, com as combinações: MS(1/1; 1/2; e 1/4 com BAP: 0,00; 4,43; 13,31 μM) e MS (1/1; 1/2; e 1/4 com TDZ: 0,00; 2,27; e 11,35 μM). As características avaliadas aos 100 dias, após a inoculação foram: número, tamanho médio da folha e peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira. Conforme os dados, concluiu-se que a redução dos sais do MS até 1/4 da força total diminuiu gradativamente o tamanho médio da folha; o peso médio da plântula da guarirobeira aumentou gradativamente na proporção em que a concentração dos sais do MS foi aumentando até aproximadamente 75% da força total; à medida que aumentou a concentração do BAP, acrescido ao meio, ocorreu uma redução gradual no tamanho médio da folha e peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira; o BAP e TDZ nas concentrações utilizadas não induziram a brotação lateral (perfilho) na plântula da guarirobeira; e com aumento na concentração do TDZ, acrescido ao meio, houve uma redução no número, tamanho médio da folha e peso médio da matéria seca da plântula.

Palavras-chave: *Syagrus*, guariroba, gueroba, guarirobeira, embrião, TDZ, MS, BAP

IN VITRO EMBRYO CULTURE IN COMBINATIONS OF MS WITH TDZ AND BAP IN THE DEVELOPMENT OF THE SEEDLING OF GUARIROBEIRA [*Syagrus oleracea* (Mart .) Becc.]

ABSTRACT

With the objective of evaluating the *in vitro* embryo culture in different combinations of MS with TDZ and BAP in the development of the guarirobeira seedling, 2(two) experiments were conducted in the plant tissue culture laboratory of the Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA). The explant utilized was the embryo extracted from the seed fruit, sprayed with 70% ethylic acid for fungal decontamination. The deinfestation was proceeded with commercial solution with 2% sodium hypochlorite at the ratio of 20% increased of 1g/L of benomyl with stirring/ 20 minutes. After inoculation of the embryos in laminar flux chamber, the transfer was performed to the growth room with 16-hour photoperiod. For the 2 (two experiments, the experimental design employed was the completely randomized in a 3x3 factorial scheme, with five replications and the plot made up of 4 tubes and one embryo per tube. With the combinations: MS(1/1; 1/2; 1/4 with BAP: 0,00; 4,43; 13,31 μ M) and MS(1/1; 1/2; 1/4 with TDZ: 0,00; 2,27; 11,35 μ M. The characteristics evaluated at 100 days, after inoculation, were number, average size of the leaf, and average weight of the dry matter of the guarirobeira seedling. According to the data, it was found that reduction of the MS salts up to 1/ 4 of the total strength, decreased gradually the average size of the leaf, the average weight of the guarirobeira seedling at the rate which the concentration of MS salts was increasing up to approximately 75% of the total strength, as the concentration of BAP was raised, added to the medium, a gradual reduction took place in the average size of the leaf and average dry weight of the guarirobeira seedling, both BAP and TDZ at the concentrations utilized did not induce lateral sprouting (tiller) on the guarirobeira seedling and with increase at the concentration of TDZ, added to the medium, there was a reduction of the number, average size of the leaf and average weight of the dry matter of the seedling.

Key words: *Syagrus*, embryo, guariroba, gueroba, guarirobeira, TDZ, BAP, MS

3 INTRODUÇÃO

Na cultura de tecidos vegetais *in vitro*, o meio de cultura é de suma importância porque fornece as substâncias imprescindíveis para o desenvolvimento e crescimento de células, tecidos e órgãos. A qualidade do material vegetal obtido está diretamente relacionada aos componentes utilizados no meio. Desta forma, resultados positivos são obtidos no desenvolvimento até a formação da plântula quando se processa uma composição variável dos componentes do meio de cultura, atingindo um adequado equilíbrio entre os mesmos (Cambrony e Snoeck, 1983).

Os meios nutritivos atendem, como princípio, as exigências de uma planta inteira (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998) e os fitorreguladores são comumente adicionados ao meio para suprir possíveis carências endógenas, pois o explante encontra-se isolado das regiões produtoras de hormônios na planta matriz (Grattapaglia e Machado, 1990).

As citocininas em cultura de tecidos têm sido indicadas como indutoras de brotação em diversas espécies de plantas. Há também evidências de que as citocininas possuem importância fisiológica. Pois, além de estimular em a brotação, provocam a liberação de brotos ou gemas que estão inibidas (Sachs e Thimann, 1967).

A dominância apical é removida e o desenvolvimento precoce de gemas axilares é estimulado através da incorporação de reguladores de crescimento (citocininas) no meio de cultura (George e Sherrington, 1984).

A proliferação de gemas axilares é geralmente selecionada em função de reproduzir *in vitro* um fenômeno natural e com alta fidelidade genética (Grattapaglia e Machado, 1990).

Mohammed (1978), reportando a respeito dos problemas de propagação da palmácea tamareira, concluiu que a utilização de brotos maduros era, na época, o único método de uso comercial em larga escala, sendo que a propagação por pequenas brotações, sob condições de umidade controlada, era muito interessante.

As necessidades nutricionais para o ótimo crescimento do explante *in vitro* variam com as espécies (Bhojwani e Razdan, 1983).

A composição do meio de cultura é extremamente importante para o desenvolvimento *in vitro*, por isso, é necessário que se determine as concentrações adequadas dos componentes do meio de cultura, tais como os macro e microelementos e os reguladores de crescimento.

O trabalho realizado teve como objetivo o estabelecimento da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc] através da cultura de embrião *in vitro* em diferentes combinações de MS com TDZ e BAP.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

As informações são insuficientes para formulação de um meio de cultura específico para palmeiras e as comparações entre várias composições de meios e seus efeitos nestas espécies de palmáceas não foram realizados com a intensidade adequada (Tisserat, 1984). O meio de cultura frequentemente utilizado para a maior parte dos sistemas *in vitro* de palmeiras fundamenta-se na formulação inorgânica de Murashige e Skoog, (1962) MS, na forma completa (Omar, 1986) ou modificada (Nwankwo e Krikorian, 1986; Cid, 1987; Valverde, Arias e Thorpe, 1987).



A variação na composição dos componentes do meio constitui a chave do sucesso da iniciação e do desenvolvimento da organogênese até a obtenção da plântula (Cambrony e Snoeck, 1983).

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas, porém, não há uma formulação padrão, mas o meio de Murashige e Skoog, (1962) MS, suas modificações e diluições, têm apresentado resultados adequados em diversas espécies (Grattapaglia e Machado, 1990).

Uma das propriedades do meio de cultura é suprir os nutrientes necessários para o crescimento dos explantes. Foram realizadas várias modificações nos primeiros meios de cultura até se chegar ao meio Murashige e Skoog, em 1962 (Murashige e Skoog, 1962). O meio MS, desenvolvido inicialmente, tinha o propósito de cultivo de calos de tabaco (*Nicotiana tabacum*). No momento está sendo utilizado para o desenvolvimento *in vitro* de diversas espécies e diferentes tipos de propagação (George, 1996). A concentração dos nutrientes do meio MS é geralmente considerada elevada; por isso, muitas modificações têm sido avaliadas com a finalidade de reduzir os níveis dos nutrientes, permitindo, desta maneira, uma maior adaptação de culturas *in vitro* (Pierik, 1987; Samartin, 1989). Entretanto, para Krikorian (1991), a alta salinidade do MS é eficiente para cultivos que exigem concentrações mais elevadas de íons.

Para Andreoli (1986), diferentes meios de cultura são utilizados no cultivo de embriões *in vitro*, no entanto, o mais frequente é o MS (Murashige e Skoog, 1962).

Para algumas espécies de palmeiras, a redução dos macronutrientes para a metade da concentração promoveu resultados favoráveis para germinação e desenvolvimento de plântulas obtidas a partir de cultura de embriões zigóticos (Nwankwo e Krikorian, 1986).

Hasegawa (1980); Werner e Boe (1980), citados por Grattapaglia e Machado (1990), indicaram, para um adequado enraizamento, a diluição de meio de cultura MS para (1/2;1/3; ou 1/4), com variação de acordo com cada espécie.

O meio MS a 50%, tem dado resultados positivos, em inúmeras espécies, para promover o enraizamento *in vitro* (Thorpe, 1980).

Cooper e Cohen (1994) avaliaram seis diferentes meios de cultura para a micropropagação do caquizeiro *Diospyros kaki L.*, e concluíram que o meio MS, foi o mais responsivo para o desenvolvimento do explante.

Para a micropropagação do caquizeiro *Diospyros kaki L.*, o meio MS é o mais utilizado, sendo como MS-completo (Tao, Ito e Sugiura, 1994) ou com a concentração de sais reduzida pela metade (Tamura, Tao e Sugiura, 1992; Tao e Sugiura, 1992).

Um dos meios básicos mais utilizados para a micropropagação de inúmeras fruteiras lenhosas, tais como a macieira *Malus sp.* (Yepes e Aldwinckle, 1994); a pereira *Pyrus sp.* (Baraldi et al., 1995), e o meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

O crescimento e a morfogênese são controlados pela interação e balanço entre os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura e as substâncias de crescimento endógenas do explante. As citocininas são utilizadas em cultura de tecidos para estimular a divisão celular e atuarem no processo de morfogênese (George, 1996).

As citocininas formam o grupo de fitorreguladores indispensáveis para o quebra da dominância apical e promover a brotação de gemas axilares. Contudo, o tipo e a concentração utilizada têm influência no sucesso de multiplicação *in vitro*. (Grattapaglia e Machado, 1990).

De acordo com Blakesley (1991), as citocininas estimulam a iniciação e o crescimento de brotações *in vitro*. Conseqüentemente, são normalmente

adicionadas ao meio de cultura para estimular a produção de gemas auxiliares ou adventícias.

Krasnyanski et al. (1992) trabalharam com cultivo de embriões de *Heliantus giganteus L.* num meio de cultura com MS na presença e ausência de reguladores de crescimento, mostrando a importância destas substâncias no desenvolvimento da espécie vegetal.

O Thidiazuron (TDZ) foi registrado em 1976 como um desfolhante de algodão (Arndt et al., 1976). A molécula é um derivado da uréia e não contém o anel purina, comum às citocininas, tipo adenina, bem como o BAP (Benzilaminopurina), cinetina e zeatina. Em 1992, o TDZ foi reportado por ter alta atividade na promoção do crescimento de cultura de calos em *Phaseolus lunatus L. cv. Kingston* (Mok et al., 1982).

O Thidiazuron é um herbicida que tem sido utilizado em muitos trabalhos de micropropagação como um regulador de crescimento que apresenta efeitos semelhantes às citocininas sendo muito eficiente na micropropagação de várias espécies, notadamente em arbóreas; como indutor de brotos apicais e axilares (Visser et al., 1992; Lu, 1993; Huettelman e Preece, 1993).

Thidiazuron é resistente a degradação por citocinina oxidase (Mok, Mok e Turner, 1987). Desta forma, a molécula é estável no meio de cultura, sendo biologicamente mais ativo do que BAP e Zeatina. Para Thomas e Katterman (1986), o TDZ estimula a síntese de citocininas purinas endógenas ou inibe a degradação das mesmas, sendo acrescido ao meio em concentrações baixas. (Lu, 1993).

O TDZ tem sido altamente eficiente em inúmeras espécies lenhosas (Lu, 1993), sendo capaz de induzir multiplicação em gemas de espécies como: *Prunus* (Mante, Scorza e Cordts, 1989), *Cydonia oblonga L.* (Dolcet - Sanjuan, Mok e Mok, 1991).

Para Wang, Steffens e Faust (1986), a quebra de dormência em gemas de maçã *Malus domestica* pelo TDZ, assim como a transição do estado dormente para o biologicamente ativo, envolve a síntese de DNA, RNA e proteínas.

Innecco, Pinto e Dechamps (1993) avaliaram o efeito do TDZ em relação ao BAP em pimentão *Capsicum annum L.*, e verificaram que o TDZ foi mais ativo que o BAP, proporcionando melhores respostas morfogênicas em todas as concentrações testadas.

O TDZ tem a habilidade de estimular a divisão celular, e também induzir a formação de brotações axilares em fragmentos de folhas de fumo *Nicotiana tabacum* (Thomas e Katterman, 1986).

O TDZ tem sido utilizado na formação de brotos adventícios em espécies de plantas lenhosas, assim como a videira *Vitis vinifera L.*, a partir de segmento nodal (Gribaudo e Fronda, 1991).

Em certas espécies, algumas desvantagens têm sido relatadas e associadas ao uso do TDZ, tais como: vitrificação (Gribaudo e Fronda, 1991), anormalidades em folhas (Vannieuwkerk, Zimmerman e Fordham, 1986; Badzian et al., 1989; Kim et al., 1997).

Gribaudo e Fronda (1991) concluíram que sintomas de vitrificação e má formação de folhas tornaram-se mais intensas à medida que se aumentou a concentração de TDZ no meio, para cultivo de *Vitis vinifera L.*

Declerck e Korban (1995) também concluíram que o TDZ originou brotações de menor comprimento quando comparadas com aquelas advindas de meio contendo BAP.

Carvalho e Pinto (1993) também identificaram a formação de brotos com tamanho reduzidos, folhas pequenas, vitrificação, além de algumas folhas apresentarem queimaduras e com aspecto de enrijecimento para *Heliconia spp in vitro*, em concentrações de TDZ de 0,5 e 1,0 mg/L.

Sintomas de vitrificação e má formação de folhas foram observadas em azaléia *Rhododendron sp.*, originadas em meio de cultura suplementado com TDZ (Briggs, McCulloch e Edick, 1988).

Também na classe das citocininas, o BAP (6-Benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para diversas espécies na multiplicação da parte aérea e indução de gemas adventícias devido à sua efetividade, além de apresentar um custo mais acessível em relação aos outros reguladores de crescimento (Grattapaglia e Machado, 1990; Krikorian, 1991).

Segundo Godinho et al. (1991), o BAP, uma citocinina sintética ativa, possui uma relevante função na divisão e diferenciação celular. Por isso, tem sido amplamente utilizada na propagação *in vitro* da bananeira, acrescida ao meio de cultura visando o incremento no número de brotações.

Para o cultivo *in vitro* do kiwi, cultivar "Tomuri", a faixa mais adequada de BAP oscila de 1,5 a 2,0 mg/L (Zecca et al., 1993; Nachtigal et al., 1995).

Sugiura, Ryutaro e Murayama (1986), testaram o efeito de BAP (22,5 μ M) em meio MS no estabelecimento de ápices caulinares e gemas laterais de caqui (*Diospiros kaki L.*), concluíram que o melhor estabelecimento foi observado quando gemas laterais e BAP foram combinados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Aspectos gerais:

Os frutos maduros da guarirrobeira [*Syagrus oleracea (Mart.) Becc.*], foram obtidos no município de São Luís de Montes Belos-GO.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras-MG, UFLA.

Os frutos maduros foram submetidos antes de serem quebrados, a uma desinfestação com pulverização de álcool etílico-70%, procedendo-se 3(três) aplicações/dia, com intervalo de 4 horas, durante 3 dias consecutivos.

Com auxílio de dois paralelepípedos (um grande- ± 8 Kg com depressão e outro pequeno ± 2 Kg, para romper o fruto), o endocarpo (duro) foi rompido e o embrião, que se encontrava na amêndoa, foi extraído para ser utilizado como explante. Após a retirada, foram colocados em placa de petri com papel de filtro umidecido para evitar a desidratação. Em seguida, introduzidos em pequenos recipientes de pano, tipo telado, e colocados em água corrente, durante 3 horas, para absorção da água e pré-limpeza. Posteriormente, foram desinfestados em solução comercial, contendo 2% de hipoclorito de sódio, na proporção de 20% (v/v), acrescido de 1g/L de benomyl, durante 20 minutos, sob agitação constante.

Os meios de cultura dos experimentos, conforme cada tratamento, tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, acrescidos de sacarose-30g/L e ácido ascórbico-100 mg/L, como antioxidante. A solidificação foi efetuada com ágar-0,7%. Cada tubo de ensaio (25x150 mm) recebeu a quantidade de 10 mL do meio e foi fechado com tampa plástica. Após, foram submetidos à autoclavagem à temperatura de 121 °C, durante 20 minutos, a uma pressão de 1 atm.

Na câmara de fluxo laminar, os embriões ensacados foram lavados por 4 vezes em água destilada e autoclavada, sendo inoculado um embrião por tubo e, em seguida, o mesmo foi fechado com tampa plástica e com a borda vedada com filme plástico.

Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e uma intensidade luminosa de $25 \mu \text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpada do tipo fluorescente branca fria, com temperatura ambiente controlada de $26 \pm 1^{\circ} \text{C}$.

5.2. Estabelecimento da guarirrobeira *in vitro*, a partir do embrião, em diferentes combinações de MS com BAP.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos em esquema fatorial de 3x3, constituídos pelas combinações dos fatores: MS (1/1; 1/2; e 1/4) Murashige e Skoog (1962) e de BAP (0,0; 4,43; 13,31 μ M), com 5 repetições. A parcela foi formada de 4 tubos e um embrião por tubo.

As características avaliadas foram: número médio de folhas; tamanho médio da folha (cm); e peso médio da matéria seca da plântula (em g), efetuadas aos 100 dias de idade da plântula da guarirrobeira.

Para todas as características, os dados foram transformados para raiz quadrada de $X+0,5$ (Banzatto e Kronka, 1992).

5.3. Estabelecimento *in vitro* da guarirrobeira, a partir do embrião, em diferentes combinações de MS com TDZ.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3x3, e constituídos pelas combinações dos fatores: MS (1/1; 1/2; e 1/4), Murashige e Skoog (1962) e de TDZ (0,0 ; 2,27;e 11,35 μ M), com 5 repetições, e cada parcela foi formada por 4 tubos e um embrião por tubo.

As características avaliadas: Número médio de folhas; tamanho médio da folha (cm); e peso médio da matéria seca da plântula (em g), avaliadas aos 100 dias de idade da plântula guarirrobeira.

Os dados para todas as características foram transformados para raiz quadrada de $X+0,5$ (Banzatto e Kronka, 1992).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Estabelecimento da guarirobeira *in vitro*, a partir do embrião em diferentes combinações de MS com BAP.

O resumo das análises de variância para as variáveis número e tamanho médios das folhas e peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira encontra-se na Tabela 4. Verifica-se que houve diferença significativa para a característica tamanho médio da folha e altamente significativa para peso médio da matéria seca da plântula, enquanto não houve significância para o número médio da folha da plântula da guarirobeira no meio MS (MS- completo; MS-1/2; e MS-1/4 da força) (Tabela 4). Para o BAP (0,0; 4,43; e 13,31 μM), houve diferença altamente significativa somente para tamanho médio da folha, enquanto para a interação (MSx BAP) houve diferença estatística unicamente para a característica peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira (Tabela 4).

TABELA 4. Resumo das análises de variância para número, tamanho médios das folhas, e peso médio da matéria seca da plântula, obtidas no experimento sobre efeito de diferentes concentrações *in vitro* de MS e BAP na guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] UFLA, Lavras, MG, 2000.

Causa da variação	G.L.	Quadrados médios		
		Número médio de folha	Tamanho médio da folha (cm)	Peso médio da matéria seca da plântula (g)
MS	2	1,0339 ^{ns}	16,6547*	0,0033**
BAP	2	0,8569 ^{ns}	42,7170**	0,0011 ^{ns}
MSxBAP	4	0,2275 ^{ns}	6,5269 ^{ns}	0,0016*
Resíduo	36	0,5403	4,5444	0,00054
Coef. Variação(%)		27,71	45,89	41,96

** ,* -Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

A equação de regressão para variável tamanho médio da folha da plântula da guarirobeira, conforme os dados obtidos, (meio MS diluído), apresentou um efeito linear significativo, sendo que à medida que ocorreu a diluição dos sais do meio MS (MS-1/1-completo; MS-1/2; MS-1/4 da força total), houve uma redução gradativa no tamanho médio da folha da plântula da guarirobeira, caracterizando a exigência nutricional da palmeira em nutrientes para formação de metabólitos, crescimento e desenvolvimento da plântula (Figura 7).

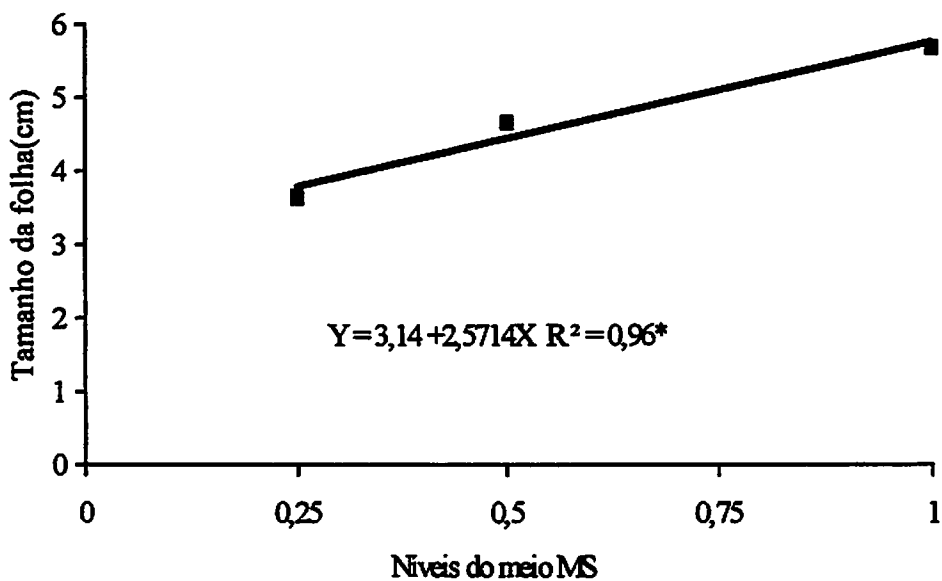


FIGURA 7. Representação gráfica e equação de regressão para tamanho de folha da plântula da guarirobeira em diferentes níveis do meio MS. UFLA, Lavras, MG, 2000.

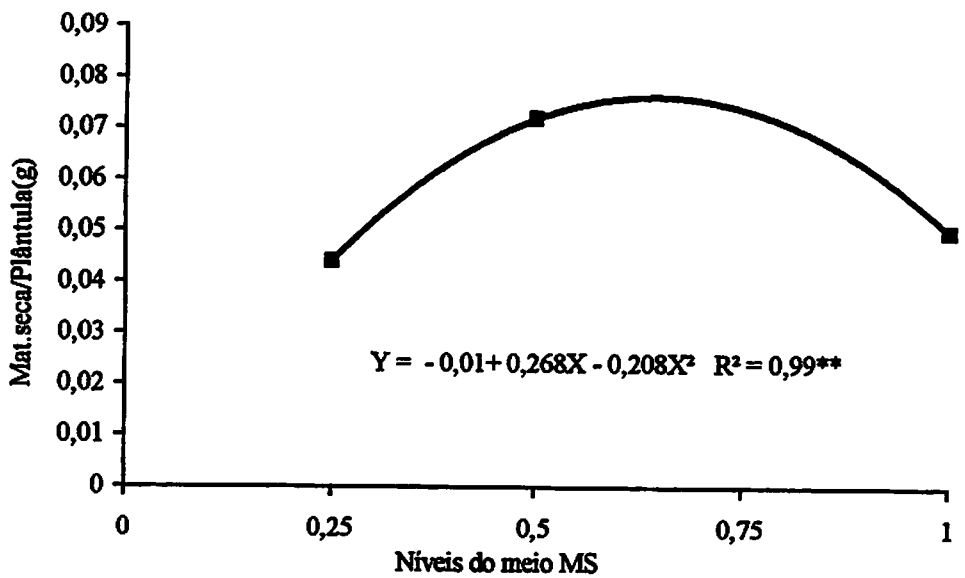


FIGURA 8. Representação gráfica e equação de regressão para peso da matéria seca/plântula da guarirrobeira em diferentes níveis do meio MS. UFLA, Lavras, MG, 2000.

A equação de regressão para a variável peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira em níveis do meio MS encontra-se na Figura 8. Observa-se que houve um efeito quadrático, altamente significativo. Conforme os dados obtidos, ocorreu uma tendência quadrática de aumento no peso médio da matéria seca da plântula à medida que houve um incremento na concentração dos sais do meio MS (1/4; 1/2 e 1/1 da força), mostrando, portanto, que a plântula da guarirobeira, obtida a partir de embrião zigótico, comporta-se melhor e também com maior acúmulo de matéria seca quanto maior for a concentração dos sais do meio MS, de acordo com os resultados, foi até aproximadamente 75% da força total, neste experimento (Figura 8).

A equação de regressão para a característica tamanho médio da folha da plântula da guarirobeira, obtida para diferentes níveis de BAP (0,0; 4,43; e 13,31 μ M), encontra-se na Figura 9. Verifica que houve um efeito linear altamente significativo, ocorrendo uma redução gradativa no tamanho médio da folha da plântula da guarirobeira à medida que se aumentou a concentração do BAP, acrescido ao meio de 4,43 para 13,31 μ M (Figura 9).

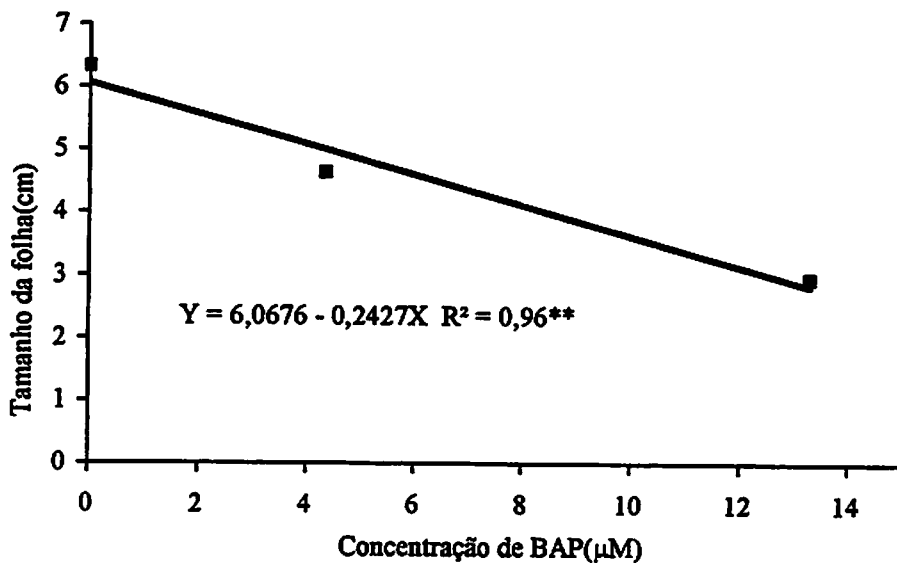


FIGURA 9. Representação gráfica e equação de regressão para tamanho da folha da plântula da guarirobeira em diferentes concentrações de BAP, acrescido ao meio. UFLA, Lavras, MG, 2000.

No desdobramento da interação (MS x BAP) para variável peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira, houve efeito linear significativo para BAP dentro de MS (1/1) e também BAP dentro de MS-1/2 (Figura 10 e 11).

Nota-se que o BAP (0,0; 4,43; e 13,31 μ M) apresentou um comportamento linear, similar tanto para MS (1/1- completo) como para MS (1/2- meia força), ocasionando uma redução gradativa no peso matéria seca da plântula da guarirrobeira à medida que ocorreu um aumento na concentração do BAP, dentro do meio MS (total ou com meia força).

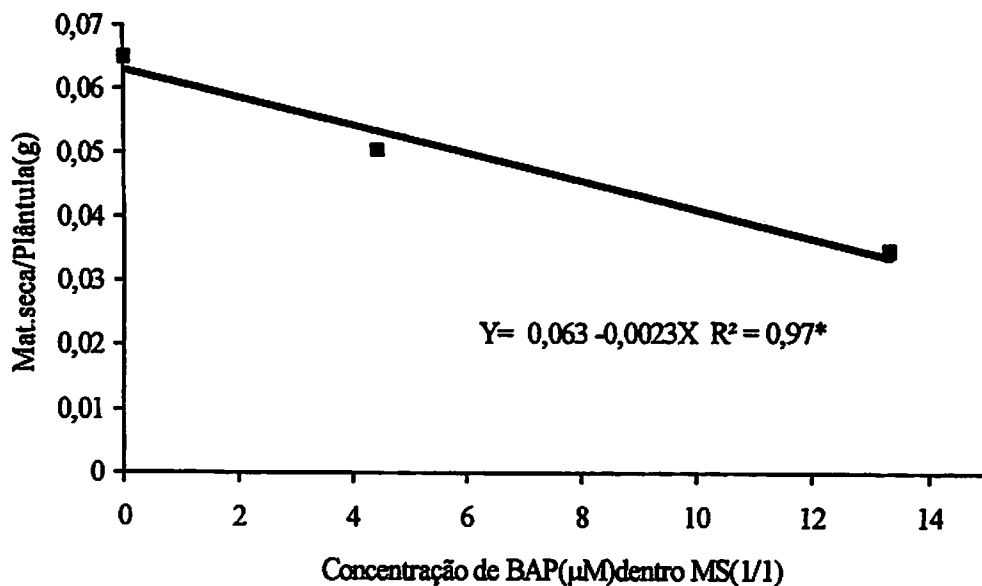


FIGURA 10. Representação gráfica e equação de regressão para o peso da matéria seca/plântula da guarirrobeira em MS completo, suplementado com diferentes concentrações de BAP. UFLA. Lavras, MG, 2000.

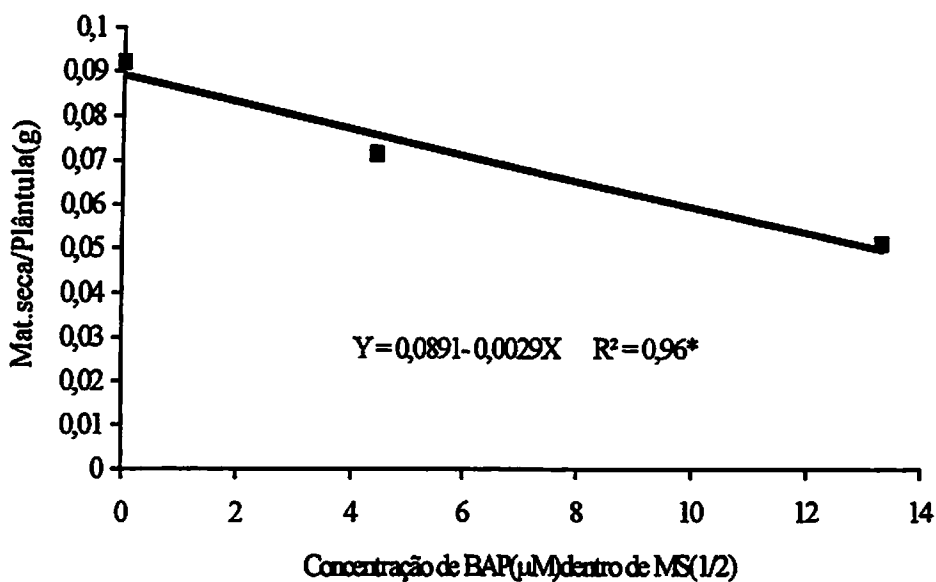


FIGURA 11. Representação gráfica e equação de regressão para o peso da matéria seca/plântula da guarirobeira na metade da força do MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2000.

O BAP tem sido utilizado para a indução na multiplicação da parte aérea (Grattapaglia e Machado, 1990; Krikorian, 1991) com grande eficiência nas espécies lenhosas, tais como a bananeira (Godinho et al., 1991); Kiwi, cultivar "Tomuri", em dose que oscila de 1,5 a 2,0mg/L (Zecca et al., 1993; Nachtigal et al., 1995); e no estabelecimento de gemas laterais e ápices caulinares de caquizeiro(*Diospyros kaki L.*) na dose de BAP de 22,5 µM (Sugiura, Ryutaro e Murayama, 1986).

Com a utilização do BAP até a dose de 13,31µM, não houve ocorrência de vitrificação e produção de folhas anormais nas plântulas da guarirobeira até aos 100 dias após a inoculação dos embriões .

Foi possível observar, também, que nas doses (0,0; 4,43 e 13,31µM de BAP), além de ocorrer uma diminuição no tamanho médio da folha da plântula da guarirobeira de forma altamente significativa, o BAP não induziu a formação de brotos laterais na plântula da guarirobeira, assim como têm ocorrido multibrotações laterais de forma natural em várias espécies de plantas lenhosas (palmeiras: *Syagrus spp* e *Bactris spp*) e outras.

Entretanto, é imprescindível que as pesquisas com os reguladores de crescimento da classe das citocininas, notadamente o TDZ e BAP e também o meio MS, continuem a ser realizadas em novas concentrações, pois há um grande potencial para obtenção de plântula de guarirobeira com brotação lateral e desenvolvimento vegetativo, quanto a número, tamanho de folhas e matéria seca de plântula adequada, com identificação precoce de genótipo superior para produção de palmito amargo com alta produtividade, visando a constituição de um plantio de matrizes para produção de sementes melhoradas e/ou plantio comercial da guarirobeira para obtenção de palmito.

6.2. Estabelecimento *in vitro* da guarirobeira, a partir do embrião em diferentes combinações de MS com TDZ.

O resumo das análises de variância para as variáveis número e tamanho médio das folhas, bem como peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira, encontra-se na Tabela 5. Observa-se que para as características número médio de folha e peso médio da matéria seca da plântula, não houve significância, no entanto, para tamanho médio da folha ocorreu diferença altamente significativa entre as concentrações utilizadas no meio MS (1/1-completo, 1/2; e 1/4 da força). Para o TDZ em doses (0,00; 2,27 e 11,35 μ M), houve diferença altamente significativa para todas as variáveis: número, tamanho médio da folha e peso médio da matéria seca da plântula. A interação (MS x TDZ) foi altamente significativa somente para variável peso médio na matéria seca da plântula (Tabela 5).

TABELA 5. Resumo das análises de variância para número, tamanho médios das folhas, e peso médio da matéria seca da plântula, obtidas no experimento sobre efeito de diferentes concentrações *in vitro* de MS e TDZ na guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Causas da variação	G.L.	Quadrados médios		
		Número médio de folha	Tamanho médio da folha (cm)	Peso médio da matéria seca da plântula (g)
MS	2	0,72868 ^{n.s.}	21,63717**	0,00048 ^{n.s.}
TDZ	2	3,99022**	72,30502**	0,00507**
MSxTDZ	4	0,09487 ^{n.s.}	5,37513 ^{n.s.}	0,00191**
Resíduo	36	0,53330	3,09003	0,00035
Coef. de variação(%)		30,99	44,50	40,93

****,*-**Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

A equação de regressão para a variável tamanho médio da folha para o meio MS diluído apresentou um efeito linear altamente significativo (Figura 12). Observa-se uma redução gradativa no tamanho das folhas da plântula da guarirobeira à medida que ocorreu uma diluição dos sais no meio MS (1/1-completo; 1/2; e 1/4 da força), evidenciando, portanto, a elevada necessidade

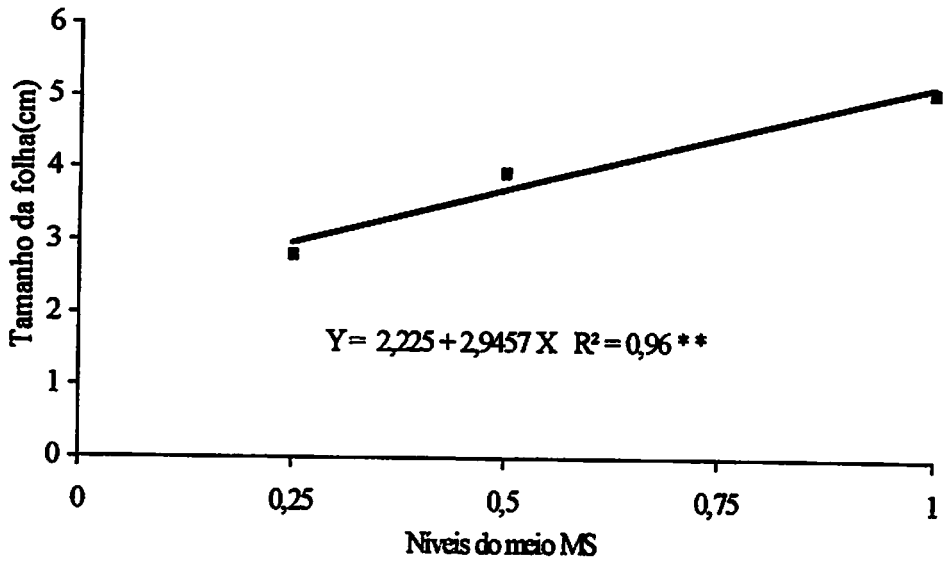


FIGURA 12. Representação gráfica e equação de regressão para o tamanho da folha da guarirobeira em diferentes níveis de MS. UFLA, Lavras, MG, 2000.

pelos nutrientes visando a formação de compostos orgânicos para o crescimento e desenvolvimento da plântula da guarirobeira e caracterizando, também, que esta espécie é exigente em nutrientes na fase inicial de crescimento vegetativo.

O meio MS (Murashige e Skoog, 1962) tem sido recomendado na formulação completa ou modificada (Cambrony e Snoeck, 1983; Andreoli, 1986 Pierik, 1987; Samartin, 1989; Grattapaglia e Machado, 1990; Krikorian, 1991; George, 1996), sendo utilizado com eficiência em diversas espécies, Cooper e

Cohen (1994) avaliaram seis meios de cultura na micropropagação do caquizeiro *Diospyros kaki*, L., e concluíram que o MS foi o mais responsivo no desenvolvimento do explante, sendo na fórmula completa (Tao, Ito, Sugiura, 1994) ou na metade da força (Tamura, Tao e Sugiura, 1992; Tao e Sugiura, 1992) e para outras lenhosas, como a macieira, *Malus sp* (Yepes e Aldwinckle, 1994) e a pereira, *Pyrus sp* (Baraldi, Bertaza e Bregoli, 1995), o meio MS também tem sido recomendado. Portanto, para as espécies de palmáceas, o meio usualmente utilizado é o MS-completo (Omar, 1986) ou modificado (Hwankwo e Krikorian, 1986; Cid, 1987; Valverde, Arias e Thorpe, 1987). No entanto, para Tisserat (1984), os detalhes a respeito de um meio específico para as espécies de palmeiras, ainda não foram estudados com a intensidade necessária. Por isso, estudos desta magnitude com a guarirobeira como representante do gênero *Syagrus*, um dos menos pesquisados em cultura de tecido vegetal de palmeiras, tomam-se interessantes. Desta forma, verifica-se que o resultado obtido com relação ao fato de que a redução dos sais no meio MS redundou, numa redução gradativa do tamanho médio da folha das plântulas da guarirobeira de maneira altamente significativa e sem aumento significativo no número de folha e peso seco da matéria seca da plântula (Tabela 12). Isso mostra um resultado discordante do obtido em outra palmeira por Nwankwo e Krikorian (1986), que reduzindo a concentração dos macronutrientes do MS para a metade, obtiveram um maior desenvolvimento de plântulas de *Elaeis guineensis* a partir de cultura de embrião zigótico do dendezeiro. Também observou-se que no final do experimento, aos 100 dias, não havia a formação de nenhuma raiz fasciculada na plântula de guarirobeira. Resultado também diferente do obtido por vários pesquisadores, de que redução na concentração dos íons do MS, para (1/2; 1/3; e 1/4 da força total), estimulou um adequado enraizamento para inúmeras espécies (Thorpe, 1980; Hasegawa, 1980; Werner e Boe, 1980, citados por Grattapaglia e Machado,

1990), o que não ocorreu no experimento com a plântula da guarirrobeira de maneira natural, para o MS (1/1-completo; 1/2; e 1/4 da concentração dos sais de Murashige e Skoog, 1962).

As equações de regressão para variáveis número e tamanho médios das folhas e peso médio da matéria seca da plântula de guarirrobeira apresentaram um efeito linear altamente significativo, (Figuras 13, 14 e 16), respectivamente. Verifica-se, portanto, à medida que aumentou concentração do TDZ (0,0; 2,27; e 11,35 μM) acrescido ao meio de cultura, que houve, conforme os dados obtidos, uma tendência linear de redução no número, tamanho médios das folhas e peso médio da matéria seca da plântula da guarirrobeira.

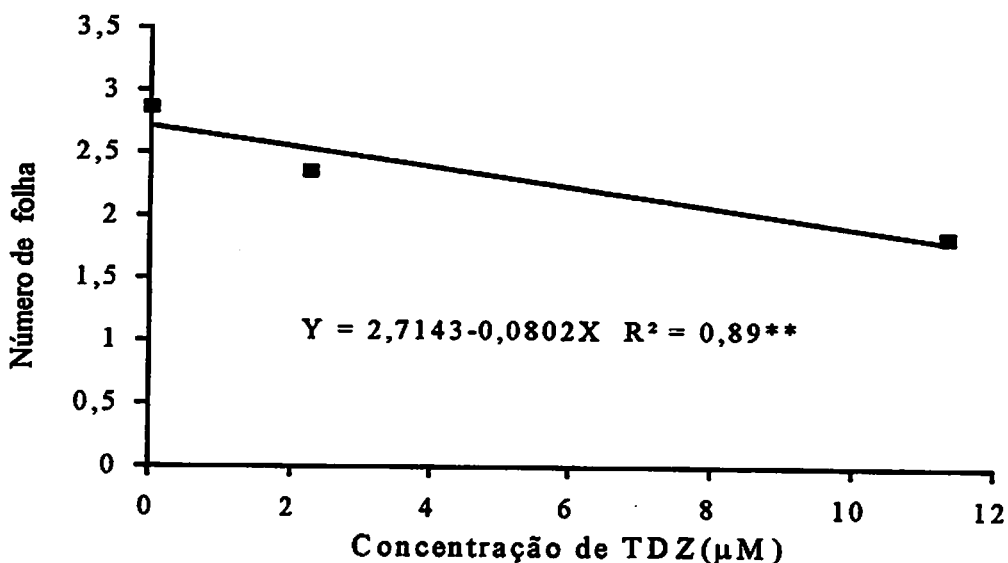


FIGURA 13. Representação gráfica e equação de regressão para o número de médio de folhas da guarirrobeira em diferentes concentrações de TDZ, acrescido ao meio. UFLA, Lavras, MG, 2000.

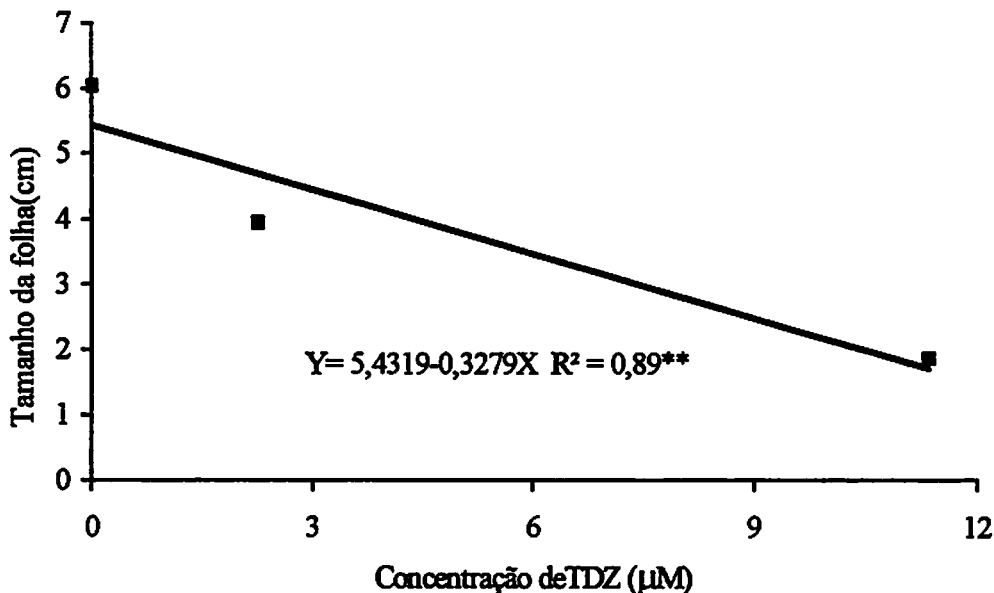


FIGURA 14. Representação gráfica e equação de regressão para o tamanho médio da folha da plântula guarirobeira em diferentes concentrações de TDZ, acrescido ao meio. UFLA, Lavras, MG, 2000.

A utilização do TDZ neste experimento foi para avaliar o comportamento da guarirobeira quanto ao número e tamanho de folhas; produção de matéria seca pela plântula; obtenção de brotos laterais na palmeira e quebra da dominância apical, como tem sido obtido com grande eficiência em inúmeras outras espécies de plantas lenhosas (Grattapaglia e Machado, 1990);

Blaskesley, 1991; Krasnyanski et al., 1992; George, 1996), notadamente em arbóreas (Visser et al., 1992; Lu, 1993; Huettemann e Preece, 1993), espécies frutíferas: *Prunus sp* (Mante, Scorza e Cordsts, 1989); *Cydonia oblonga L.* (Dolcet – Sanjuan, Mok e Mok, 1991); *Vitis vinifera L.* (Gribaudo e Fronda, 1991); na macieira *Malus doméstica*, na quebra de dormência (Wang, Steffens e Faust, 1986), pelo fato do TDZ ser uma citocinina altamente estável e reativa biologicamente (Mok, Mok e Turner, 1987) e sendo acrescido ao meio em pequenas doses (Lu, 1993), conforme as utilizadas neste experimento. Além de ser usado com elevada eficiência em solanáceas, tais como: Pimentão *Capsicum annuum* (Innecco, Pinto e Dechamps, 1993) e fumo, *Nicotiana tabacum* (Thomas e Katterman, 1986), sendo, portanto, altamente responsivo. Porém, com a plântula da guarirobeira, obtida a partir da cultura do embrião, nas doses de TDZ utilizados, os resultados foram adversos aos obtidos pelos diferentes trabalhos efetuados, conforme relatados para inúmeras espécies, pois, o TDZ, além de reduzir de forma substancial o número e tamanho médios da folha, e o peso médio da matéria seca da plântula, (Figuras 13, 14 e 16). Também não proporcionou nenhuma brotação lateral, mostrando, ainda, um aspecto sintomático de folha espessa, tamanho reduzido, bainha com tecido aquoso dilatado Figura 15(Fotos a e b).

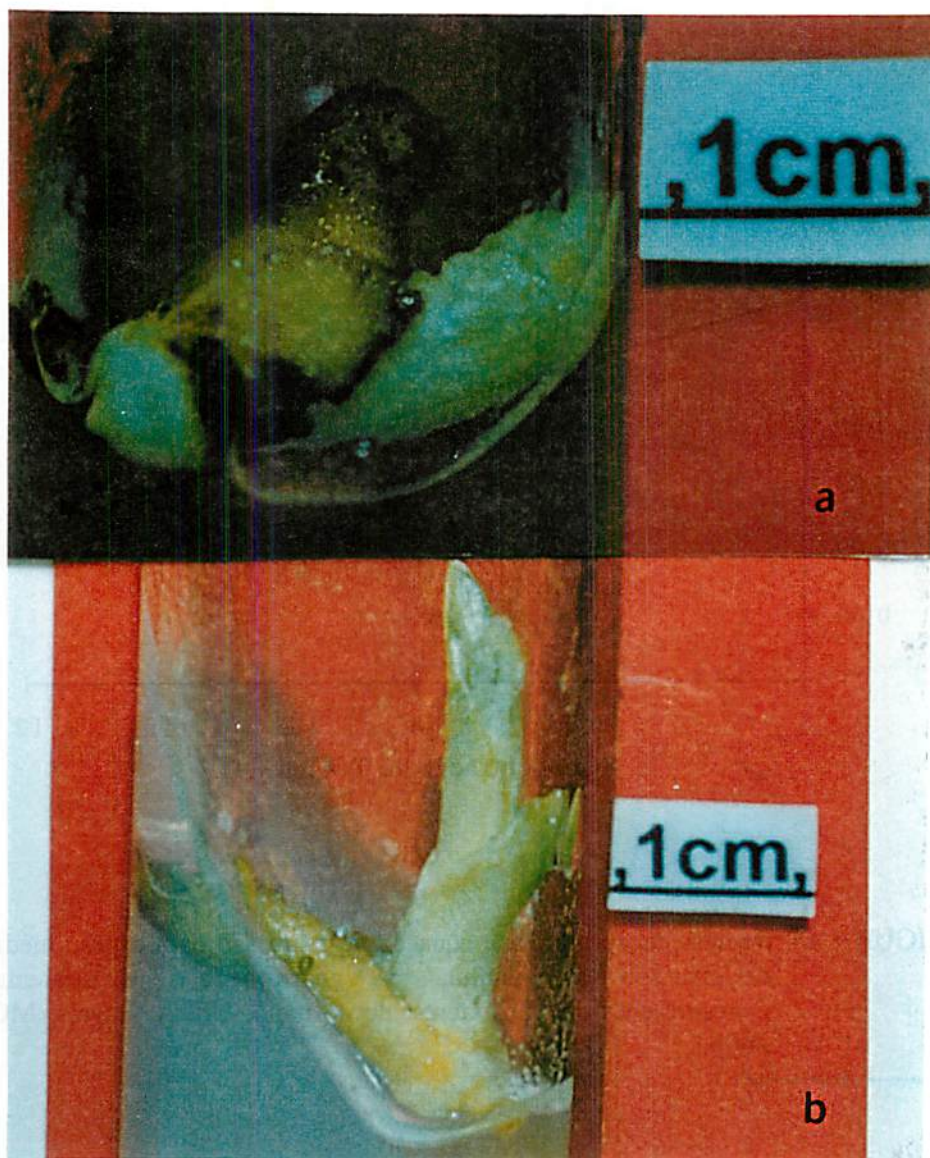


FIGURA 15. Fotos(a e b): Aspecto da plântula em meio MS suplementado com TDZ, em cultura de embrião *in vitro* da guarirubeira. UFLA, Lavras, MG, 2000.

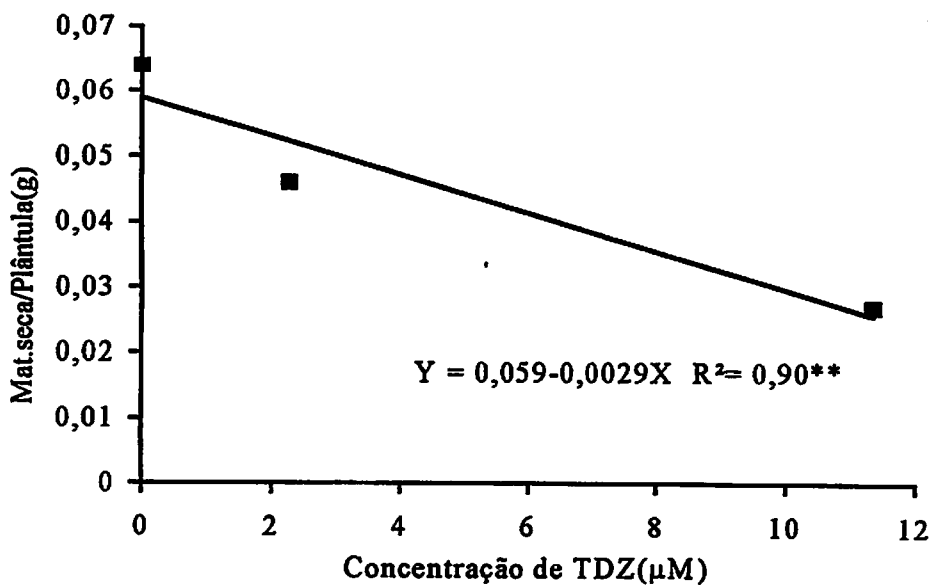


FIGURA 16. Representação gráfica e equação de regressão para o peso médio da matéria seca/plântula da guarirrobeira em diferentes concentrações de TDZ, acrescido ao meio. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Vários autores têm relatado a respeito de problemas quando se utiliza o TDZ, normalmente em altas doses, como indutor da vitrificação. (Gribaudo e Fronda, 1991); anormalidade em folhas (Vannieuwreerk, Zimmerman e Fordham, 1986; Badzian et al., 1989; Kim et al., 1997); em cultivo *in vitro* de uva, *Vitis*

vinifera L., ocorreu a vitrificação e má formação da folha da videira, e à medida que aumentou a concentração de TDZ no meio, os sintomas ficaram mais intensos (Gribaudo e Fronda, 1991). Para Declerck e Korban (1995), o TDZ origina menor comprimento de brotações do que quando no meio o BAP. Também Carvalho e Pinto (1993) verificaram, em *Heliconia spp*, brotos de tamanho reduzido, folhas pequenas, enrijecidas, em concentrações de TDZ, no meio, de 0,5 e 1,0 mg/L. Para azaléia (*Rhododendron sp*), a vitrificação e má formação das folhas também foram observadas quando o meio foi suplementado com TDZ (Briggs, McCulloch e Edick, 1988).

As equações de regressão do desdobramento da interação da característica peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira, encontram-se nas Figuras 17 e 18.

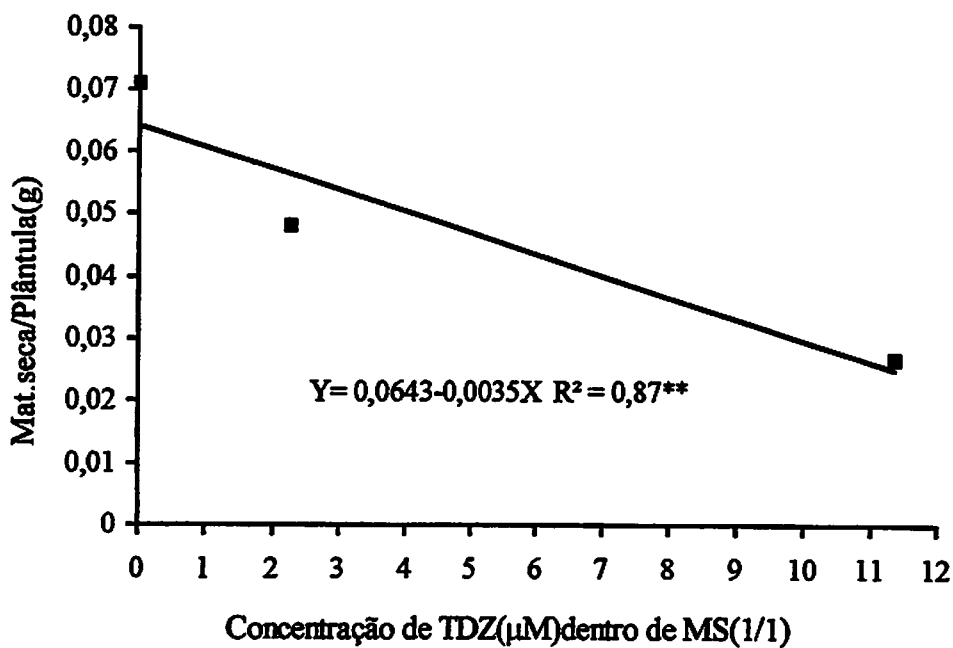


FIGURA 17. Representação gráfica e equação de regressão para o peso médio/plântula da guarirobeira em meio MS-completo com diferentes concentrações de TDZ . UFLA, Lavras, MG, 2000.

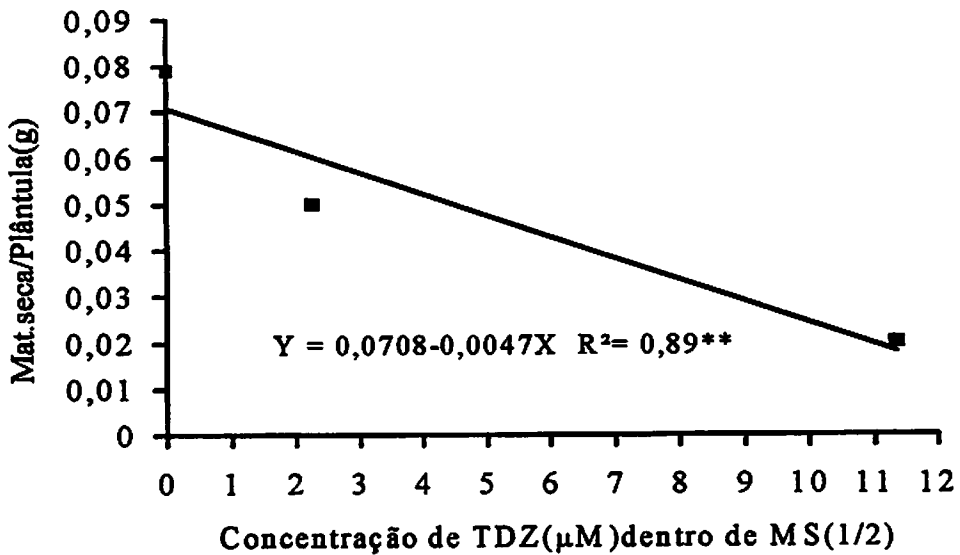


FIGURA 18. Representação gráfica e equação de regressão para o peso médio da matéria seca/plântula da guarirrobeira em MS com metade da força com diferentes concentrações de TDZ. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Observa-se que houve um efeito linear altamente significativo para os níveis de TDZ (0,0; 2,27; e 11,35μM) dentro de MS-completo e também do TDZ dentro de MS-1/2 (meia força). Pelos dados obtidos e as equações de regressão (Figura 17 e 18), para TDZ dentro de MS-completo, bem como para TDZ dentro de MS-1/2, à medida que aumentou a concentração do TDZ, acrescido ao meio de cultura, o peso médio da matéria seca da plântula da guarirrobeira reduziu linearmente. O TDZ dentro do MS (completo e meia força), apesar da interação ser altamente significativa, apresentou uma tendência de redução na matéria seca média da plântula da guarirrobeira, como o ocorrido no tratamento TDZ (Figuras 16, 17 e 18).

7 CONCLUSÕES

- A redução na concentração dos sais do MS, até 1/4 da força total, diminuiu gradativamente o tamanho médio da folha da plântula da guarirobeira;
- O peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira, aumentou gradativamente na proporção em que a concentração dos sais do MS, foi até aproximadamente 75% da força total;
- À medida que aumentou a concentração do BAP acrescido ao meio, ocorreu uma redução gradual no tamanho médio da folha e peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira;
- O BAP e o TDZ, nas concentrações utilizadas, não induziram a brotação lateral (perfilho) na plântula; e
- O aumento na concentração do TDZ, acrescido ao meio, ocasionou uma redução no número, tamanho médio das folhas e peso médio da matéria seca da plântula da guarirobeira.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. Anais... Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-28.

X ARNDT, F.R.; RUSCH, R.; STILLFRIED, H.V.; HANISCH, B.; MARTIN, W.C. SN49537, a new cotton defoliant. *Plant Physiology*, Washington, v. 57, p.99, 1976.

BADZIAN, T.; FOTYMA-KERN, J.; HENNEN, G.R.; OGLESBY, P. The influence of 6 - benziladenine and thidiazuron on organogenesis of *Brassaia actinophylla* Endl. cv. Amate, shoot explants. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.251, p.191-197, Sept. 1989.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. *Experimentação agrícola*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 107p.

X BARALDI, R.; BERTAZZA, G.; BREGOLI, A.M. et al. Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on microcuttings of two pear cultivars. *Journal of Plant Growth Regulator*, New York, n.14, p.49-59, 1995.

X BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.R. *Plant tissue culture: theory and practice*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. 502p.

✓ BLAKESLEY, D. Uptake and metabolism of 6- benzyladenine in shoot cultures of *Musa* and *Rhododendron*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.25, n.1, p.69-74, 1991.

BRIGGS, B.A.; McCULLOCH, S.M.; EDICK, L.A. Micropropagation of azaleas using thidiazuron. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.227, p.330-333, July 1988.

X CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.G. Meios nutritivos, In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de planta*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998 . p. 87-132

CAMBRONY, H.D.; SNOECK. Hormones et regulateurs de croissance dans les cultures de caféiers et de cacaoyers. *Café, Cacao, Thé*, Paris, v.27, n.2, p.113-119, 1983.

CARVALHO, D.G.; PINTO, J. E. B. P. Multiplicação de *Heliconia spp*, *in vitro* através do uso do TDZ. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1993, Brasília. *Resumos...* Brasília: REDBIO, 1993. p.152.

X CID, L.P.B. Regeneração de plantas de *Elaeis guineensis* e de seu híbrido com *Elaeis guineensis*, via embriogênese somática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.22, n.1, p.109-113, 1987.

COOPER, P.A.; COHEN, D. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki L.*). *Combined Proceedings. International Plant Propagation Society*, Seattle, v.34, p.118-124, 1984.

X DECLERCK, V.; KORBAN, S.S. Shoot regeneration from leaf tissues of *Phlox paniculata L.* *Journal of Plant Physiology*, v.147, n.3-4, p.441-446, Dec. 1995.

DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga L.* *Plant Cell Reports*, Berlin, v.10, n.5, p.240-242, Aug. 1991.

X GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture, part 1 - The technology*, 2ed. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. *Plant propagation by tissue culture - hand book and directory of commercial laboratories*. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

X GODINHO, F.P.; SILVA, C.R.R.; PASQUAL, M.; MARCIANI-BENDEZÚ, J. Comparação entre concentração de 6-benzilaminopurina na produção de mudas de bananeira (*Musa sp.*), pelo método de propagação rápida "in vivo". *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v.13, n.3, p. 173-177, 1991.

X GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.

GRIBAUDO, I; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. *HortScience*, Alexandria, v.26, n.8, p. 1083, Aug. 1991.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: o potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.33, n.2, p.105-119, May 1993.

X INNECCO, R.; PINTO, J.E.B.P.; DECHAMPS, C. Efeito comparativo do "TDZ e BAP" na regeneração de brotações e calos em pimentão (*Capsicum annuum* L.). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.5, n.1, p.100, June 1993.

X KIM, M.K.; SOMMER, H.E.; BONGARTEN, B.C.; MERKLE, S.A. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.16, n.8, p.536-540, May 1997.

KRASNYANSKI, S.; POLGAR, Z.; NÉMETH, G.; MENEZEL, L. Plant regeneration for callus and protoplast of *Helianthus giganteus* L. *Plant Cell Reports*, Berlin, n.11, p.7-10, 1992.

X KRIKORIAN, A.D. Médios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.H.; MROGINSKI, L.A., (eds.). *Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT, 1991. p.41-78.

LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell Development Biology*, Columbus, v.29, n.2, p.92-96, Apr. 1993.

MANTE, S.; SCORZA, R.; CORDTS, J.M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.19, n.1, p.10-11, 1989.

MOHAMMED, S. Problems in date palm propagation. *Indian Journal Horticulture* v.23, n.3, p.15-31, 1978.

X MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D.J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N-phenyl - N¹-1,2,3, thiadiazol - 5 - ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry*, Oxford, v.21, p.1509-1511, 1982.

X MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, Alexandria, v.22, n.6, p.1194-1197. Dec. 1987.

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

X NACHTIGAL, J.C.; ZECCA, A.G.D.; FIGUEIREDO, S.L.B.; FORTES, G.R. de L. Influência da benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.25, n.1, p.23-26, jan./abr. 1995.

X NWANKWO, B.A. KRIKORIAN, A.D. Morphogenetic potential of embryo and seedlings-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *Pisifera* Becc. *Annals of Botany*, London, n.51, p.65-76, 1986.

OMAR, M.S. Propagation of date palm through tissue culture. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1986, Minneapolis. Abstracts... Minneapolis: International Association For Plant Tissue Culture, 1986. p.279.

PIERIK, R.L. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.

X SACHS, T.; THIMANN, K.V. The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *American Journal of Botany*, Columbus, v.54, n.1, p.136-144, 1967.

SAMARTIN, A. A comparative study of effects of nutrient média and cultural conditions on shoot multiplication of *in vitro* cultures of *Camellia japonica* explants. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.64, n.1, p.73-79, 1989.

X SUGIURA, A.; RYUTARO, T.; MURAYAMA, H. "In Vitro" propagation of japanese persimmon. *HortScience*, Alexandria, v.21, n.5, p.1205-1207, 1986.

TAMURA, M.; TAO, R.; SUGIURA, A. Highly stable regeneration from long term cultures of japanese persimmon callus. *HortScience*, Alexandria, v.27, n.9, p.1048, 1992.

TAO, R.; ITO, J.; SUGIURA, A. Comparison of growth and rooting characteristics of micropropagation adults plants and juvenile seedlings of persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Journal of the japanese Society for Horticultural Science*, Tokio, v.63, n.3, p.537-541, 1994.

TAO, R.; SUGIURA, A. Micropropagation of japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Biotechnology in agriculture and forestry, High-tech and micropropagation II*. Berein - Heidelberg: Spring-Verlag, v.8, 1992.



THOMAS, J.C.; KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiology*, Denville, v.81, n.2, p.681-683, June 1986.

THORPE, T.A. Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante. *Cultivo de tejidos en la Agricultura*, [s.l.]:1980.130p.

TISSERAT, B. Date palm. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. New York: McMillan, 1984. v. 2, p.505-545.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T.A. Picloram induced somatic embryogenesis in pejyibye palm (*Bactris gasipaes* H. B. K.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.10, n.2, p.149-156, 1987.

VANNIEUWKERK, J.P.; ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *HortScience*, Alexandria, v.21, n.3, p.516-518, June 1986.

X VISSER, C.; QURESHI, J.A.; RAVINDER, G.; SAXENA, P.K. Morphoregulatory role of thidiazuron. *Plant Physiology*, Maryland, v.99, p.1704-1707, 1992.

WANG, S.Y.; STEFFENS, G.L; FAUST, M. Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulador, Thidiazuron. *Phytochemistry*, Oxford, v.25, n.2, p.311-317, Feb. 1986.

X YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulator*, Dordrecht, n.15, p.55-67, 1994.

X ZECCA, A.G.D.; NACHTIGAL, J.C.; FIGUEIREDO, S.L.B.; FORTES, G.R. de L. Multiplicação *in vitro* de kiwi (*Actinidia deliciosa*), cv. "Tomuri". *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v.5, n.1, p.101, Jun. 1993. (Resumo, 253).

CAPÍTULO 5

EFEITOS DE ANA E AIB *IN VITRO* NO COMPRIMENTO E PESOS DAS MATÉRIAS SECAS DAS RAÍZES E PARTE AÉREA DA PLÂNTULA DA GUARIROBEIRA [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

1 RESUMO

Com intuito de avaliar os efeitos de ANA e AIB *in vitro* no comprimento e pesos das matérias secas das raízes e parte aérea da plântula da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.], um experimento foi conduzido no Laboratório Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras, MG (UFLA). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (T1: MS-completo, Murashige e Skoog, 1962+ANA-1mg/L; T2: MS+ AIB-1mg/L), 10 repetições e 2 tubos de ensaio/parcela, como explante, foram utilizadas plântulas uniformizadas, previamente podadas com altura de 2 cm, aos 60 dias de idade, na câmara de fluxo laminar, e estabelecidas em tubo de ensaio (25x250mm) com 20mL de meio (conforme cada tratamento). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento (fotoperíodo de 16 horas) durante 75 dias. As variáveis foram: comprimento médio da raiz e pesos médios das matérias secas da parte aérea e da raiz. Conforme os resultados, o ANA (1mg/L) foi eficiente na formação das raízes fasciculadas *in vitro* na plântula da guarirobeira, enquanto o AIB (1mg/L) foi ineficiente; o ANA promoveu uma maior produção de matérias secas das partes aérea e das raízes e um maior comprimento médio das raízes fasciculadas na plântula do que o AIB; e o meio MS-completo, acrescido de ANA (1mg/L), proporcionaram um enraizamento adequado, *in vitro*, da plântula da guarirobeira em todas as fases da rizogênese.

Palavras-chave: Enraizamento, guariroba, gueroba, guarirobeira, *Syagrus*, AIB, ANA, micropropagação

EFFECTS OF NAA AND IBA *IN VITRO* ON THE LENGTH AND WEIGHTS OF THE DRY MATTERS OF THE ROOTS AND AERIAL PART OF THE GUARIROBEIRA SEEDLING [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]

ABSTRACT

With a view to evaluating the effects of NAA and IBA *in vitro* on the length and weights of the dry matter of the roots and aerial part of the seedling of guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. An experiment was conducted in the plant tissue culture laboratory of the Universidade Federal de Lavras- MG (UFLA). The experimental design was completely randomized with two treatments (T1: whole MS, Murashige and Skoog, 1962 + NAA-1mg/L; T2: MS + IBA-1mg/L), 10 replications and 2 test tubes/plot. As an explant, uniformed seedlings, previously pruned 2 cm tall at 60 days old in the laminar flux chamber and established in test tube (25 x 250 mm) with 20 mL of medium (according to each treatment). The tubes were kept in growth room (16 hour photoperiod) for 75 days. The variables were average length of root and average weights of the dry matters of the aerial part and root. According to the results: NAA (1mg/L) was efficient in the *in vitro* formation of the fasciculate roots on the guarirobeira seedling whereas IBA (1mg/L) was inefficient; NAA promoted a greater dry matter yield of the aerial part and roots, greater average length of the fasciculate roots on the seedling than IBA; and whole MS medium added of NAA (1mg/L) provided an *in vitro* suitable rooting of the guarirobeira seedling in every phase of rhizogenesis.

Key words: rooting, guariroba, gueroba, guarirobeira, *Syagrus*, NAA, IBA, micropropagation

3 INTRODUÇÃO

A habilidade dos tecidos das plantas em produzirem raízes depende de interações de diferentes fatores endógenos e exógenos (Németh, 1986). Portanto, folhas jovens e gemas ativas são fontes de auxina e intensificam o enraizamento. Para a plântula da guarirobeira, que não conseguiu um enraizamento de forma natural, caracterizando-se também como uma palmácea de difícil enraizamento *in vitro*, o efeito de estimulação pode ser parcial ou integralmente substituído por auxinas exógenas (Jarvis, 1986), como ocorre principalmente em espécies lenhosas de difícil enraizamento (Assis e Teixeira, 1998).

Desta forma, adição de reguladores de crescimento, tipo auxina, tem a finalidade de suprir as prováveis deficiências dos teores endógenos de hormônios dos explantes.

O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de ANA e AIB *in vitro* no comprimento médio das raízes e pesos das matérias secas das partes aérea e raízes da plântula da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.].

4 REFERENCIAL TEÓRICO

As técnicas de cultura de tecidos vegetais envolvem o cultivo asséptico de tecidos e órgãos, com a regeneração completa da plântula (Murashige, 1974).

A rizogênese *in vitro* ocorre em 3 fases: indução, iniciação e alongamento (Grattapaglia e Machado, 1998) ou conforme Went e Thimann (1937); Mc Gwire, Albert e Shutak (1969), em 2 fases: indução que requer auxina para ótima formação das raízes e a segunda, que compreende a iniciação e alongamento, na qual a auxina pode ser inibitória ou, quando necessária, em níveis elevados.

Para Thorpe (1980), em algumas espécies de plantas, simplesmente a eliminação das citocininas exógenas tem sido suficiente para induzir a formação do sistema radicular. Porém, o tratamento de espécies de difícil enraizamento *in vitro*, através da aplicação de auxina, apresenta vantagens, tais como: antecipação da indução; maior número, qualidade e uniformidade das raízes (Gaspar e Hofinger, 1988).

Quanto ao ambiente para o enraizamento, este pode ser efetuado *in vitro* ou *in vivo*. No entanto, depende da espécie, genótipo e disponibilidade de casa de vegetação com nebulizador automático (Grattapaglia e Machado, 1990).

As bases fisiológicas das diferenças, como no caso da reduzida capacidade de indução de enraizamento pelo AIA, quando comparado ao ANA e ao AIB, são atribuídas, segundo Leopold e Kriedermann (1975), aos diversos mecanismos metabólicos que a planta possui para reduzir ou anular os efeitos do AIA através da conjugação e/ou destruição. Além disso, o AIA apresenta problemas na sua estabilidade em função do efeito da luz, que provoca a sua degradação.

O ácido 3-indolacético (AIA) é a auxina natural mais encontrada nas plantas, tanto na forma livre como conjugada. A partir de sua descoberta, testes com os análogos, assim como o ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA), comprovaram o grande efeito na promoção do enraizamento, sendo caracterizados como auxinas sintéticas (Leopold e Kriedemann, 1975).

Os reguladores de crescimento mais utilizados em diversas espécies de citros são ANA e AIB, nas seguintes concentrações: *Citrange carrizo*: 1,0 mg/L de ANA (Kitto e Young, 1981); *Citrus grandis*: 0,25 mg/L de ANA e 0,25 mg/L de AIB (Chatuverdi e Mitra, 1974); e *Citrus sinensis*, *C. aurantium* e *Citrange troyer*: 0,5 mg/L de ANA (Bouziid, 1986). Em trabalhos de propagação vegetativa, o AIB é utilizado com frequência devido, notadamente, à sua

estabilidade; maior espectro de ação em diferentes espécies; e menor fitotoxicidade em plantas lenhosas (Proebsting, 1984). AIB tem sido o fitorregulador, entre as auxinas, mais utilizado na indução da rizogênese *in vitro*, notadamente em espécies lenhosas. Sriskadarajah, Mullins e Nair (1982) reportam que conseguiram promover o enraizamento em uma cultivar de macieira de difícil enraizamento, usando 10 μM de AIB.

Drew, MacComb e Considine (1991) num experimento com *Carica papaya L. in vitro*, usando, como regulador de crescimento, AIB, ANA e PCPA, verificaram que o AIB foi o que permitiu maior percentual de enraizamento e número de raízes por broto do mamoeiro. Winnaar (1988) observou que ramos de mamoeiro micropropagados através de tecido adulto, quando na presença de AIA, não enraizavam, mas, em presença de ANA enraizavam, contudo com pequena intensidade, porém, quando se utilizou o AIB, houve um bom enraizamento.

Para Al-Salih et al.(1987), as plântulas da palmácea tamareira (*Phoenix dactylifera L.*) regeneradas em cultura *in vitro* são geralmente menores, mais finas e fracas. Por isso, as plântulas morreram quando transplantadas para o solo, provavelmente devido à ausência de diferenciação das células da raiz, ocasionada por deficiência de reguladores de crescimento.

Altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento (Grattapaglia e Machado, 1990). Desta forma, para as diferentes espécies, uma alternância de meios mais concentrados na fase de indução e mais diluídos para o alongamento das raízes é uma prática comum (Gupta Mehta e Mascarenhas, 1991; Drew, 1988).

Conforme Travers, Starbuck e Natarella (1985); Zimmerman e Broome (1981), para que ocorra um bom enraizamento em porta-enxerto de macieira, o meio de cultura deve apresentar a concentração de sais de MS reduzida pela metade.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 2 tratamentos, 10 repetições, cada parcela constituída de 2 tubos de ensaio e uma plântula (idade de 60 dias), podada a 2 cm de altura por tubo. Os tratamentos foram, a saber: T1: MS-completo (Murashige e Skoog, 1962) + ANA-1mg/L; e T2: MS-completo +AIB-1mg/L.

Os meios de cultura, conforme cada tratamento, tiveram o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$; a sacarose na quantidade de 30 g/L, e como antioxidante, ácido ascórbico-100mg/L; com a solidificação efetuada com ágar a 0,7%. Cada tubo de ensaio (25x250 mm) recebeu a dose de 20 mL do meio e foi fechado com tampa plástica, posteriormente, foi submetido à autoclavagem à temperatura de 121 °C durante 20 minutos, a uma pressão de 1 atm.

No experimento foram utilizados como explante, plântulas uniformizadas previamente e podadas aos 60 dias de idade, na câmara de fluxo laminar, com altura de 2 cm, usando um bisturi devidamente esterilizado (lavado em água destilada e autoclavada e em seguida flambado, após cada corte). As plântulas podadas foram estabelecidas na câmara de fluxo laminar, após a lavagem por 4 vezes em água destilada, autoclavada, e o tubo foi fechado com tampa plástica e a borda foi vedada com filme plástico.

Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, e uma intensidade luminosa de $25 \mu \text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria e à temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

As características avaliadas foram: comprimento médio da raiz (em cm); e pesos médios das matérias secas da parte aérea e da raiz (em g). Todas as

características foram avaliadas aos 75 dias após o estabelecimento. Os dados foram transformados para raiz quadrada de $X+0,5$ (Banzatto e Kronka, 1992).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises de variância para as variáveis matéria seca da parte aérea, bem como comprimento médio e matéria seca da raiz, encontra-se na Tabela 6. Verifica-se que houve diferença altamente significativa para as características comprimento médio e matéria seca das raízes da plântula da guarirobeira submetida a doses de ANA (1,0 mg/L) e AIB(1,0 mg/L), e para matéria seca da parte aérea houve diferença significativa.

TABELA 6. Resumo das análises de variância para comprimento médio da raiz, e pesos médios das matérias secas das partes aérea e raízes, obtidas no experimento sobre efeitos de ANA e AIB no enraizamento *in vitro*, da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. UFLA, Lavras, MG, 2000.

Causas da variação	G.L.	Quadrados médios		
		Comprimento médio raiz (cm)	Matéria seca da parte aérea (g)	Matéria seca da raiz (g)
ANA e AIB	1	8,89735**	0,01822*	0,03831**
Resíduos	18	0,15717	0,00264	0,00127
Coef variação(%)		21,97	6,10	4,72

** , * - Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Houve diferença significativa para comprimento médio das raízes e matérias secas das raízes e da parte aérea (Figura 19 e 20). Os dados obtidos mostram que o ANA (1,0 mg/L) foi o regulador de crescimento mais eficiente do que o AIB (1,0 mg/L), haja visto que proporcionou um comprimento médio das raízes superior ao AIB (1,0 mg/L), de 4,81 cm; um peso de matéria seca das raízes de 0,13 gramas por plântula da guarirobeira, tendo também para matéria seca da parte aérea um ganho de 0,10 gramas/plântula (Figura 19 e 20).

Pelos experimentos efetuados, foi possível evidenciar que a plântula da guarirobeira não formou raiz fasciculada *in vitro*, naturalmente. Por isso, foram avaliados os reguladores de crescimento da classe das auxinas mais recomendados para espécies lenhosas de difícil enraizamento, sendo portanto, o AIB e ANA (Leopold e Kriedermann, 1975), pois os fitorreguladores, tipo auxina, para algumas espécies, são exigidos somente na fase de indução e podem ser inibitório nas fases seguintes (iniciação e alongamento) ou exigidos em doses elevadas também, nestas fases na rizogênese (Went e Thimann, 1937; Mc Gwire, Albert e Shutak, 1969; Grattapaglia e Machado, 1998), podendo ocorrer *in vitro* ou *ex vitro* (Murashige, 1974; Grattapaglia e Machado, 1998), as doses mais indicadas são, para algumas espécies, *Citrango carrizo* 1,0 mg/L de ANA (Kitto e Young, 1981); *Citrus grandis*- 0,25 mg/L e 0,25 mg/L de AIB(Chatuverdi e Mitra, 1974); *Citrus sinensis*- 0,5 mg/L de ANA (Bouziid, 1986); macieira- 10 μ M de AIB (Sriskadarajah, Mullins e Nair, 1982). O fitorregulador mais utilizado devido à estabilidade, maior espectro de ação e menor fitotoxicidade, é o AIB (Proebsting, 1984; Drew, McComb e Considine (1991). Também em trabalho realizado com ramos de mamoeiro

micropropagados com ANA, houve pequeno enraizamento e com AIB, houve um bom enraizamento (Winnaar,1988). Entretanto, com a plântula da guarirobeira ocorreu exatamente o contrário, pois somente com a utilização de ANA (1,0 mg/L) no meio, é que se promoveu um enraizamento adequado, tendo, portanto, uma diferença significativa para comprimento e matéria seca das raízes em relação ao AIB (1,0 mg/L) (Figura 19 e 20). Para a característica peso da matéria seca da parte aérea, apesar da diferença ser significativa, no entanto, o ganho foi de somente 0,10 gramas de matéria seca/plântula da guarirobeira, caracterizando que as auxinas (AIB e ANA) não se diferenciam muito, quanto ao efeito na parte aérea da plântula da guarirobeira, mas mesmo assim, o ANA foi significativamente superior ao AIB nas condições de condução deste experimento (Figura 19).

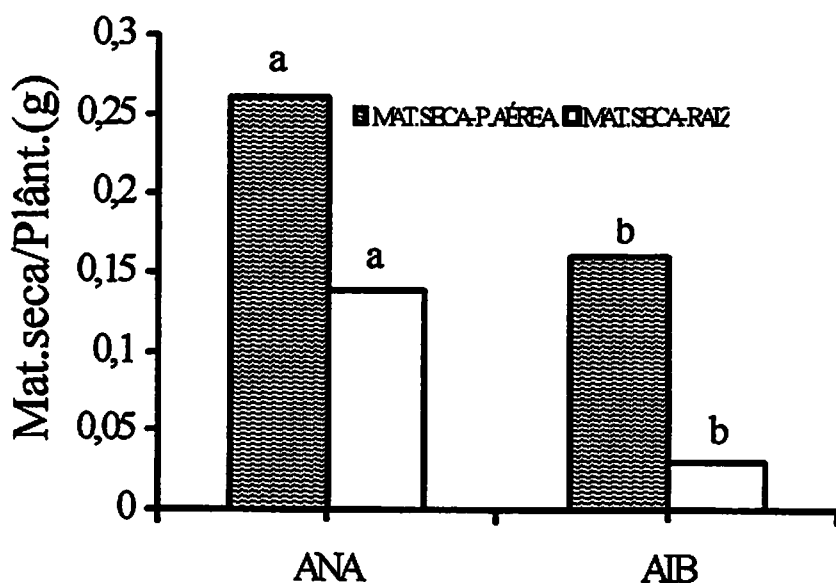


FIGURA 19. Efeito de ANA(1mg/L) e AIB(1mg/L) sobre a produção de matérias secas das raízes e parte aérea da plântula da guarirubeira, *in vitro* (As médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%). UFLA, Lavras, MG, 2000.

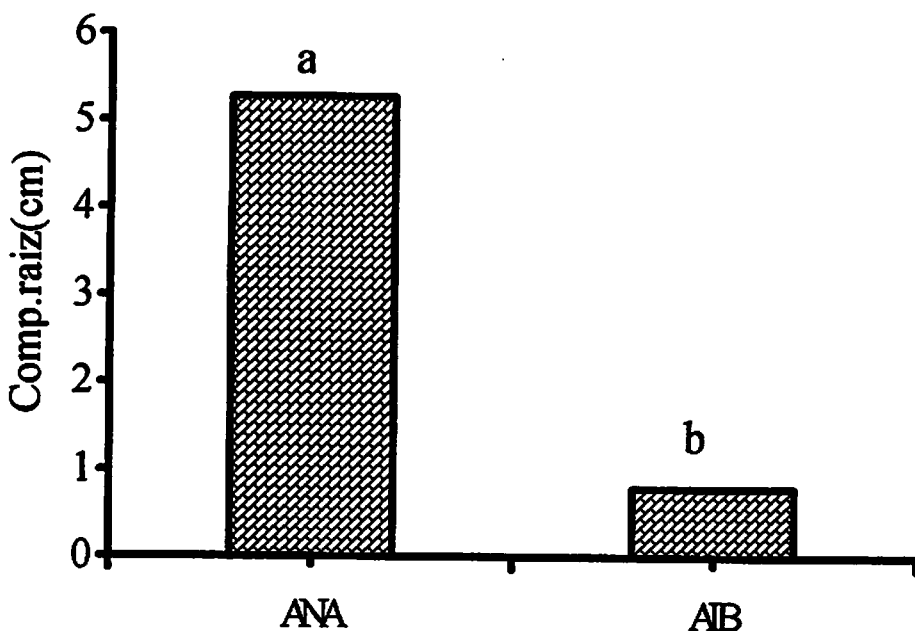


FIGURA 20. Efeito de ANA (1mg/L) e AIB (1mg/L) sobre o comprimento médio das raízes da guarirobeira, *in vitro* (As médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%). UFLA, Lavras, MG, 2000.

Isso mostra que, para o enraizamento *in vitro* da plântula da guarirobeira o ANA é mais eficiente do que o AIB (Figura 21), quanto à indução, iniciação e alongamento na rizogênese, o fitorregulador ANA (1,0 mg/L) provavelmente não afetou, como ocorre em outras espécies lenhosas, as fases de iniciação e alongamento (Thorpe, 1980; Gaspar e Hofinger, 1988) quando presente no meio até a fase final, pois na plântula da guarirobeira as raízes desenvolveram adequadamente. Para Grattapaglia e Machado (1990), altas concentrações de



FIGURA 21. Efeito do ANA na obtenção de raiz fasciculada, *in vitro* em relação ao AIB nas plântulas de guarirobeira. UFLA, Lavras, MG, 2000.

sais inibem as fases do enraizamento, sendo, portanto, recomendado meio de cultura com concentração normal na indução e diluído para alongamento das raízes (Gupta Mehta e Mascarenhas, 1983; Drew, 1988). Desta forma, Travers, Starbuck e Natarella (1985); Zimmerman e Broome (1981) conseguiram um bom enraizamento em porta-enxerto de macieira com o meio MS, à meia força (50% da concentração). Os resultados obtidos para o enraizamento da plântula guarirobeira foram discordantes dos relatados pelos autores acima citados, pois o meio utilizado no experimento de avaliação de fitorreguladores (ANA e AIB) para o enraizamento da plântula da guarirobeira foi o MS-completo, presente por um período de 75 dias, ou seja, durante as 3 fases do processo rizogênico (indução - iniciação - alongamento).

7 CONCLUSÕES

- O ANA foi eficiente na formação de raízes fasciculadas *in vitro* na plântula da guarirobeira;
- O AIB foi ineficiente na rizogênese da plântula da guarirobeira;
- O ANA promoveu uma maior produção de matérias secas das partes aérea e da raiz e um maior comprimento de raiz fasciculada na plântula da guarirobeira do que o AIB; e
- O meio MS-completo, acrescido de ANA, proporcionaram um enraizamento adequado, *in vitro*, da plântula da guarirobeira em todas as fases da rizogênese.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL - SALIH, A.A.; BADER, S.M.; JARRAH, A.Z.; AL - DADI, M.T. A comparative morphological and anatomical study of seed embryo culture derived seedling of *Phoenix dactylifera L.* *Date Palm Journal Baghdad*, v.4, n.2, p.137-152, 1987.
- X ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.G.; CALDAS L.S.; BUSO, J.S. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998, p.261-296.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. *Experimentação agrícola*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 247p.
- X BOUZID, S. "In vitro" micropropagation of mature *Citrus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 6, 1986, Proceedings...
- X CHATUVERDI, H.C.; MITRA, G.C. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. *HortScience, Virginia*, v.9, n.2, p.118-120, 1974.
- X DREW, R.M. Rapid clonal propagation of *papaya in vitro* from mature field-grown Trees. *HortScience, Alexandria*, v.23, n.3, p.609-611, 1988.
- TD DREW, R.A.; McCOMB, J.A.; CONSIDINE, J.A. Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya L. in vitro* in relation to auxine sensitive phase and use of riboflavin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht*, v.33, n.1, p.1-7, 1991.
- X GASPAR, T; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D. *Advances in Plant Sciences: adventitious root formation in cuttings*. Oregon: Dioscoridies Press, 1988. v.2. p.117-131.
- GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M.A. Micropropagação In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. p.183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, CNPH, 1990. p.99-169.

X GUPTA, P.K.; MEHTA, U.J.; MASCARENHAS, A.F. A tissue culture method for rapid propagation of mature trees of *Eucalyptus torelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.2, p.296-299, 1983.

JARVIS, B.C. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: JACKSON, M.B. *New root formation in plants and cuttings*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p.191-216.

/ KITTO, S.L.; YOUNG, M.J. *In vitro* propagation of "Carrizo citrange". *HortScience*, Virginia, v.16, n.3, p.305-306, 1981.

LEOPOLD, A.C.; KRIEDEMANN, P.E. *Plant growth and development*. 2. ed. New York: McGraw Hill, 1975. 446 p.

MCGWIRE, J.; ALBERT, L.; SHUTAK, V. Effect of foliar application of 3 - indole butyric acid on rooting of cuttings of ornamental plants. *Journal of the American Society Horticultural Science*, Alexandria, v.93, p.699-704, 1969.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

X MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, New York, v.25, p.135-166, 1974.

NÉMETH, G. Induction of rooting. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Berlin: Springer Verlag, 1986. v.1, cap. 4, p.49-50.

PROEBSTING, W.M. Rooting of douglas-fir stem cuttings: relative activity of IBA and NAA. *HortScience*, Alexandria, v.19, n.6, p. 854-856, 1984.

SKISKADARAJAH, S.; MULLINS, M.G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting "*in vitro*" in difficult-to-propagative cultivars of apple. *Plant Science Letters*, Elsevier, v.24, p.1-9, Jan. 1982.

THORPE, T.A. Enraizamento de los brotes y preparación para su transplante. *Cultivo de tecidos em la agricultura*, [s.l.]. 1980. 130 p.

TRAVERS, T.N.; STARBUCK, C.J.; NATARELLA, N.J. Effects of culture medium on *in vitro* rooting of Antonovka 313 apple. **HortScience**, Alexandria, v.20, n.6, p.1051-1052, 1985.

WENT, F.W.; THIMANN, K.V. Root formation. **Phytohormones**, New York: Mac Millan, 1937. p.183-206.

WINNAAR, W. Clonal propagation of *papaya in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.12, n.3, p.305-310, 1988.

ZIMMERMAN, R.H.; BROOME, O.C. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.5, p.648-652, 1981.

COPIES COPY 4125

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As pesquisas efetuadas até o momento com relação ao gênero *Syagrus* são muito reduzidas, e se tratando da guarirobeira (*Syagrus oleracea*), menos estudos foram realizados. Contudo, para as palmeiras produtoras de palmito normal, tais como: pupunheira (*Bactris gasipaes*), seafórtia (*Archontophoenix alexandrae*), açazeiro (*Euterpe oleracea*) e juçara (*Euterpe edulis*), algumas pesquisas esporádicas foram procedidas, com relação a botânica, produção de mudas *in vivo* e *in vitro*, germinação de semente, dormência e avaliação da qualidade de palmito.

A oxidação do explante é um problema muito sério na guarirobeira, por isso, foram avaliados diversos antioxidantes para o cultivo *in vitro*, e concluiu-se que o mais eficiente foi o ácido ascórbico, seguido pelo carvão ativado, também o ambiente escuro-14 dias, proporcionou uma redução parcial na oxidação no explante da guarirobeira.

A contaminação por fungos saprofiticos do fruto semente e embrião da guarirobeira, dificultaram grandemente os trabalhos até que se obtivessem mecanismos para o controle da contaminação *in vitro* dos fungos. Desta forma, a maneira mais eficiente para solucionar o problema da contaminação foi a combinação do uso de álcool etílico-70% no fruto semente e benomyl no embrião, antes da inoculação.

A utilização da conjugação de MS, BAP e TDZ em diferentes concentrações, foi efetuada visando avaliação do comportamento do embrião da guarirobeira *in vitro*, quanto ao crescimento e desenvolvimento da plântula com perfilhamento (brotação lateral), número, tamanho de folhas e matéria seca da plântula para obtenção precoce de genótipos superiores, visando futuramente a produção de matrizes e/ou mudas para o plantio comercial para obtenção de

palmito. Apesar, de não ter havido o perfilhamento nas dosagens avaliadas de BAP e TDZ, as pesquisas com relação a esta variável são altamente promissoras, usando outras dosagens bem como a combinação destas citocininas.

A plântula da guarirobeira é de difícil enraizamento *in vitro*, por isso, avaliou-se o ANA e AIB, quanto ao tamanho, peso seco da matéria seca da raiz fasciculada e verificou-se que o ANA, proporcionou um enraizamento adequado *in vitro* da plântula da guarirobeira.

Dos mecanismos utilizados para quebra do fruto semente, sem danificar o embrião da guarirobeira, o que se redundou em grande eficiência, foi o uso de 2 (dois) paralelepípedos(um pequeno, para bater e outro grande com depressão para alojar o fruto semente), o rendimento foi de 3 (três) frutos sementes quebrados para obtenção de 1 (um) embrião normal para os experimentos.