



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES DE COQUINHO AZEDO (*Butia capitata*
(Mart.) Becc)**

PEDRO AUGUSTO PORTO CARNEIRO

PEDRO AUGUSTO PORTO CARNEIRO

**CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES DE COQUINHO AZEDO (*Butia capitata*
(Mart) Becc)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em fruticultura, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Berildo de Melo

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

PEDRO AUGUSTO PORTO CARNEIRO

**CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES DE COQUINHO AZEDO (*Butia capitata*
(Mart) Becc)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em fruticultura, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 21 de setembro de 2012.

Prof. Dr. Pedro Henrique Ferreira Tomé

IFTM

Prof. Dr. Benjamim de Melo

UFU

Dra. Simone Abreu Asmar

UFU

Prof. Dr. Berildo de Melo
ICIAG-UFU
(Orientador)

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

Aos meus pais,
Arley de Carvalho Carneiro e Rita de Cássia Porto Carneiro,
e meus irmãos Bruno Porto Carneiro e Ana Clara Porto Carneiro,
por todo o incentivo, amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e à Nossa Senhora da Aparecida, pela proteção.

A toda a minha família, representados pelos meus avós, Amélia e Augusto (*in memoriun*), Tereza e Carneiro (*in memoriun*), que onde estejam, torceram por minha vitória.

Aos meus pais, que me ensinaram os valores de respeito, honestidade, integridade e dedicação.

Aos meus irmãos pela alegria e amizade.

À Natália, pelo amor e companheirismo.

Ao tio Batista, Rossane, Alex, Patrícia e Natália, pela amizade e carinho.

Ao professor Berildo de Melo e membros da banca examinadora pela oportunidade e aprendizado.

Aos grandes amigos Hernane e Elequissandra, por toda a força e dedicação, não medindo esforços para contribuir em nossos trabalhos, e ao Selmo Marques Barbosa pelas oportunidades e ensinamentos.

A todos os funcionários da fazenda Água Limpa da Universidade Federal de Uberlândia, por todo o auxílio prestado.

Ao Professor da Unimontes, Leonardo Monteiro Ribeiro e suas orientadas, Silma da Conceição Neves, Priscila Oliveira Silva e Itaina Gonçalves Andrade, pela confiança e ensinamentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, pelo conhecimento compartilhado.

À CAPES pela concessão de bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Objetivo geral	1
1.2 Objetivos específicos	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Identificação e Descrição do Coquinho-Azedo [Butia capitata (Mart.) Becc.].....	3
2.2 Usos e Importância do Gênero Butia.....	4
2.3 Germinação e Dormência em Palmeiras	5
2.4 Cultura de Embriões em Palmeiras.....	8
2.5 Oxidação e Uso de Antioxidantes.....	9
2.6 Controle da Contaminação.....	11
2.7 Meio de Cultura e Fitorreguladores	13
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4 CONCLUSÕES	37

REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 3	41
RESUMO	41
ABSTRACT	43
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO 4	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

LISTA DE SIGLAS

ANA	ácido alfa-naftaleno acético
AIA	ácido 3- indolacético
AIB	ácido indolbutírico
BAP	6-Benzilaminopurina
GA ₃	ácido giberélico
MS	Murashige e Skoog
PVP	polivinilpirrolidona
TDZ	thidiazuron
2,4-D	2,4 diclorofenoxiacético

RESUMO

Os experimentos foram conduzidos em Uberlândia-MG, e os frutos de coquinho azedo foram coletados na região de Montes Claros – MG. No primeiro experimento, foram testados diferentes tempos de imersão dos embriões em solução de 0,25% de cloro por 10, 20 e 30 minutos, colocados ou não durante 10 minutos em solução de 1,5 mL L⁻¹ do fungicida tiofanato metílico. O experimento foi montado em esquema fatorial 2x3, e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, 4 repetições e 24 parcelas. Não houve necessidade de utilização de fungicida no controle da contaminação e indica-se a permanência em solução de cloro 0,25% por período entre 10 a 30 minutos. No segundo experimento, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial com 8 tratamentos, 4 repetições e 12 parcelas. Os tratamentos consistiram do acréscimo de diferentes substâncias antioxidantes (testemunha – ausência de substâncias antioxidantes; ácido ascórbico – 100 mg L⁻¹; PVP – 400 mg L⁻¹ e carvão ativado – 3,0g L⁻¹) ao meio MS com 75% de força iônica, com ou sem imersão em solução de ácido ascórbico (100 mg L⁻¹). Ao final de 45 dias, foram avaliadas as características: oxidação (em %), constatada através do escurecimento das estruturas do embrião; germinação (em %) e plantas normais (%), considerando plantas normais as que emitiram tanto parte aérea quanto radícula, enquanto que a germinação considerou-se apenas emissão de uma dessas partes. . A utilização de carvão ativado proporcionou resultados de formação de plantas com oxidação inferior e germinação superior aos demais antioxidantes testados, e a prática de imersão dos embriões em solução de ácido ascórbico contribuiu para menor oxidação e maior formação de plantas normais. O último experimento montado em esquema fatorial 4x4 e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 16 tratamentos, 3 repetições e 2 parcelas. Os tratamentos foram caracterizados pela combinação de 4 dosagens de BAP (0; 0,96; 1,92 e 3,84) com 4 dosagens de ANA (0; 0,24; 0,48 e 0,96), sendo assim adicionados ao meio MS com 75% de força iônica. Após 110 dias, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas; comprimento da folha principal (cm); comprimento da raiz principal; massa seca da parte aérea e da raiz. Não houve interação significativa entre as dosagens de ANA e BAP para nenhuma das características avaliadas. Maior comprimento de folha foi obtido utilizando 0,47 mg L⁻¹ de ANA.

Palavras-chave: **Antioxidantes. Descontaminação. Fitorreguladores.**

ABSTRACT

The experiments were conducted in Uberlândia, Minas Gerais and the fruits of *Butia capitata* (Mart) Becc were collected in the region of Montes Claros - MG. Different embryo immersion times were tested in the first experiment, using 0.25% chlorine solution for 10, 20 or 30 minutes, and immersed, or not, for 10 minutes in a solution of the fungicide methyl thiophanate at 1.5 mL L⁻¹. There was no need for the use of fungicide for contamination control, and treatment with 0.25 % chlorine solution for 10 to 30 minutes was sufficient. The second experiment was done in a completely randomized design with 8 treatments, 4 replicates and 12 plots. Treatments consisted of the addition of different antioxidants (control - absence of antioxidants; ascorbic acid - 100 mg L⁻¹; PVP - 400 mg L⁻¹ and activated charcoal - 3.0 g L⁻¹) to the MS medium with 75% ionic strength, with or without immersion in ascorbic acid solution (100 mg L⁻¹). The following characteristics were evaluated after 45 days: oxidation (in %), observed as darkening of the embryo structures; germination (in %) and normal plants (%), considering as normal plants those emitting both shoot and rootlet, while for germination the presence of any of these parts was counted. The last experiment was done as a 4x4 factorial in a completely randomized design with 16 treatments, 3 replicates and 2 plots. The treatments were characterized by the combination of 4 doses of BAP (0, 0.96, 1.92 or 3.84 mg L⁻¹), and 4 doses of ANA (0, 0.24, 0.48 or 0.96 mg L⁻¹), added to the MS medium with 75% of ionic strength. The following characteristics were evaluated after 110 days: number of leaves; leaf main length (cm), length of the main root; shoot and root dry matter. There was no significant interaction between the measurements of ANA and BAP for any of characteristics evaluated. Greater leaf length was obtained using 0.47 mg L⁻¹ of ANA.

Keywords: Antioxidants; decontamination; plant growth regulators.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nativo e endêmico do cerrado, o coquinho azedo recebe diferentes denominações, sendo encontrado nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. Essa palmeira apresenta diversas possibilidades de usos como a fabricação de geléia, doces, licores, cachaça, óleo; as fibras no artesanato, forragem para animais, ornamental, ofertando assim grande procura. Apesar do aquecido comércio regional no Norte de Minas Gerais, percebe-se dificuldade na formação de pomares, que forneçam frutos em função de sua baixa germinação, sendo toda a oferta desse produto obtida através do extrativismo.

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grande aplicação na agricultura e utiliza diversas partes das plantas como explantes, no entanto, ao relacionar ao cultivo de palmeiras, verifica-se uma grande tendência voltada ao uso do embrião, que tem sido utilizada para superar a dormência presente em algumas sementes. Para a realização de um processo completo de formação de mudas através de um embrião, é necessário o desenvolvimento de um protocolo, sendo esse composto pelo controle da contaminação do explante por microrganismos, eliminação de problemas com oxidação, problema constante para palmeiras em geral, e também a utilização de fitohormônios que possibilitem o maior desenvolvimento da planta. Resultados positivos e negativos já foram encontrados no cultivo *in vitro*, utilizando diferentes procedimentos e substâncias no controle da contaminação, oxidação e desenvolvimento, sendo a resposta individual para cada situação.

1.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo visando à produção de mudas *in vitro* de *Butia capitata*.

1.2 Objetivos Específicos

- estabelecer o controle da contaminação *in vitro* do embrião do coquinho azedo;

- avaliar diferentes antioxidantes no controle da oxidação e sua influência na germinação e desenvolvimento das plântulas *in vitro*, na cultura de embrião do coquinho azedo;
- verificar o desenvolvimento das plântulas *in vitro* do coquinho azedo, em resposta ao acréscimo de BAP e ANA ao meio MS;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Identificação e Descrição do Coquinho azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc.]

A palmeira *B. capitata* pertence à família Arecaceae, sendo constituída por cerca de 2700 espécies reunidas em mais de 240 gêneros (LORENZI et al., 2010), compreendendo um grande número de espécies de importância econômica ambiental e ornamental, muito utilizadas em regiões tropicais, fornecendo ao homem, cocos, sagu, óleo, cera, fibras e material para a construção de habitações rústicas, como folhas e estipes (ALVES; DEMATTE, 1987).

Nativo e endêmico do cerrado, o coquinho azedo recebe diferentes denominações, como coqueiro cabeçudo e coco azedinho, adotadas em alguns locais do Planalto Central, segundo Pereira (1998). Pode ser conhecido também como butiá-azedo e coco cabeçudo, é encontrado nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás de acordo com Lorenzi (2004).

Como ainda existem poucos trabalhos relacionados à caracterização morfológica dessa espécie, percebem-se ainda dificuldades na identificação, sendo muitas vezes confundidas com outras palmeiras de ocorrência em regiões distintas até mesmo em trabalhos científicos. Apesar disso, Lorenzi e outros (2010) realizou alguns estudos e manteve como *Butia capitata* (Mart.) Becc. a palmeira conhecida como coquinho azedo, presente no estado de Minas Gerais, Goiás e Bahia, denominando como *B. odorata* as plantas ocorrentes em áreas de restingas do Rio Grande do Sul e Uruguai.

Henderson e outros (1995) caracterizaram a *B. capitata* como uma palmeira monóica, de estipe solitário, possuindo pecíolos com espinhos ao longo das margens, folíolos glaucos e rígidos, arranjados regularmente formando um “V”. Suas folhas são pinadas e arqueadas de coloração verde acinzentada, de folíolos lineares de ápice culminado (LORENZI et al., 2010). As inflorescências são semelhantes à de outras espécies pertencentes à família Arecaceae, sendo do tipo paniculada, formada pelo pedúnculo (ráquis), espigas (ráquilas) e flores amarelas, protegidas por brácteas, que se abrem naturalmente (LIMA, 2003). As flores estaminadas são amarelas, dispostas espiraladamente em tríades e, principalmente, em díades e solitárias na porção distal da ráquila, com cerca de 7,5 mm de comprimento e 6

mm de largura e sépalas e pétalas valvares, com seis estames (MARCATO; PIRANI, 2006).

Fonseca e Simões (2006) destacam o fenômeno da protandria para o coquinho azedo, contribuindo assim para uma polinização xenogâmica na espécie, caracterizado pela baixa ocorrência de sincronia das fenofases masculinas e femininas de uma mesma inflorescência. O fruto é do tipo drupa oval e comestível, formado por epicarpo amarelado ou avermelhado (arroxeadado), mesocarpo carnoso e fibroso e endocarpo duro e denso com três poros, sendo funcional apenas a quantidade de poros semelhantes à quantidade de sementes. Cada fruto pode conter de uma a três sementes (MARTINS, 2003; REITZ, 1974; SILVA, 1998).

Os frutos de *B. capitata* são climatérios, com picos de produção de etileno e de respiração, seguidos por mudanças físicas e químicas, como a evolução da cor, redução da firmeza de polpa e da acidez total titulável, que caracterizam o processo de maturação (NEUWALD et al., 2004).

A polpa dos frutos é caracterizada por 0,3% de carboidratos, 10,8% de fibras (FDN), 3,9% de fósforo e cálcio (19,9 e 16,8 mg 100g⁻¹) (FARIA et al., 2008). Os valores de vitamina A é de 146,2 equivalente de atividade de retinol (RAE) por 100g, e a participação da vitamina C é de 53 mg de ácido ascórbico por 100g de polpa, valores esses semelhantes, respectivamente, aos encontrados em manga (vitamina A) e em laranja (vitamina C), conforme destacado por Faria et al. (2008). O mesmo autor ainda comenta que os ácidos graxos saturados de cadeia média, como o ácido láurico (C12:0) são os mais encontrados na amêndoa, caracterizada pelo seu alto teor de lipídeos.

2.2 Usos e Importância do Gênero Butia

As palmeiras do gênero *Butia* apresentam diversas possibilidades de usos, ofertando assim grande procura. Os frutos são utilizados na fabricação de geleia, doces, licores, cachaça, óleo; as fibras, no artesanato, forragem de animais (considerado estimulante da secreção láctea das vacas) e enchimento de colchões, que se tornou uma atividade industrial com auge na década de 50; pelo mel ou vinho de palma, que é a seiva retirada do tronco ou

da inflorescência, utilizada tradicionalmente como medicinal na cura de problemas respiratórios (ROSSATO; BARBIERI, 2007).

O mesocarpo dos frutos (polpa) é rico em fibras, vitamina A (betacaroteno) e C (ácido ascórbico), sendo utilizado para o consumo *in natura* ou processado na forma de sucos, sorvetes e picolés, enquanto as sementes (amêndoas) são utilizadas para a fabricação de óleo comestível (MARTINS, 2003). Conforme Moura (2008), as sementes do coquinho azedo também podem ser utilizadas para substituição do amendoim, na composição da canjica.

De acordo com Sodré (2005), essa palmeira tem importância no emprego ornamental devido à beleza característica da planta, sendo também utilizada no reflorestamento e em programas de reintrodução da fauna pelo *B. capitata* var *odorata* conforme Rosa e outros (1998).

Silva (2008) em trabalho realizado em duas comunidades presentes no norte de Minas Gerais, percebeu que o extrativismo do coquinho azedo é uma fonte alternativa importante de renda para as populações rurais. Os preços variam em função da época e mercado explorado, havendo atualmente cooperativas especializadas na compra da polpa desses frutos, além da possibilidade de vendas das polpas congeladas, frutos *in natura* e da chamada “bala” (endocarpo sem a polpa, com sementes) em feiras.

O mesmo autor percebeu ainda que a renda entre as duas áreas pesquisadas, comunidade rural de Campos, município de Serranópolis de Minas e Fazenda Baixa, município de Mirabela, foi bastante variável, em função de muitos fatores, como condições edafo-climáticas, ambiente (vegetação existente), material genético e histórico da atividade extrativismo.

2.3 Germinação e Dormência em Palmeiras

Dentre os vários conceitos de germinação podem se destacar os seguintes: um fenômeno muito complexo e amplo, pelo qual sob condições apropriadas, o eixo embrionário dá prosseguimento ao seu desenvolvimento, que tinha sido interrompido (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Além disso, Marcos Filho (2005) atribui que o

conceito tecnológico inclui o desenvolvimento da estrutura embrionária e a formação de uma plântula.

Diversos autores atribuem outros conceitos, sendo de acordo com Mayer e Poljakof-Mayber (1975), uma sucessão de etapas que determina, em uma semente quiescente e com baixo teor de água, a retomada das atividades metabólicas e o início da formação de uma plântula, a partir do embrião. A germinação em palmeiras apresenta às vezes, grandes dificuldades tornando-as, características (PINHEIRO, 1986).

A germinação das sementes pode ser afetada por vários fatores, como as condições internas da semente ou fatores intrínsecos, os fatores ambientais e de manuseio durante e após a colheita. Aguiar e outros (2005) trabalhando com a palmeira *Hapis excelsa* (Thunb.) Henry ex. Rehder, encontraram resultados superiores no teste de germinação utilizando temperatura de 25 °C, a areia como substrato e sem necessidade de luz. Já trabalhando com *Oenocarpus minor* Mart., os substratos mais adequados para a germinação foram areia e vermiculita, e a melhor temperatura foi de 30°C, sendo que profundidade superior a 2 cm se mostrou inadequada para a sementeira, conforme Silva e outros (2006).

Dentre os fatores intrínsecos, a viabilidade, a longevidade, o genótipo e a dormência são mais significativos (MARCOS FILHO, 2005). A dormência é um mecanismo de adaptação evolucionária que permite inúmeras vantagens, entre estas, que a semente germine quando as condições ambientais forem propícias não somente para o fenômeno da germinação, bem como para as fases subsequentes do crescimento da plântula, assegurando o desenvolvimento, além de criar um banco de sementes do solo, o qual garante a sobrevivência da espécie frente a possíveis intempéries climáticas (HARTMANN et al., 2002).

O conceito mais atual de dormência foi proposto por Baskin e Baskin (2004), na qual a semente não germina por um período, mesmo com um conjunto de condições físicas e ambientais propícias para tal processo. No entanto, definições de dormência são complexas, pois não há como quantificar a intensidade da dormência, sendo apenas mensuradas pelo fenômeno da germinação, como não dormentes e pela ausência da germinação, como o máximo de dormência (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Marcos Filho (2005) propõe seis causas de dormência, a saber: impermeabilidade do tegumento (cobertura), neste caso o tegumento impede a entrada de água na semente. Na

resistência mecânica da cobertura, há absorção de água e oxigênio, mas presume-se que a expansão do embrião é limitada pela resistência exercida pelo tegumento do fruto e impermeabilidade da cobertura ou trocas gasosas. Provavelmente estas causas de dormências são observadas em sementes de palmeiras, pois o endocarpo é, em geral, duro e denso (FERNANDES, 2008).

Ferreira e Gentil (2002) concluíram que para a palmeira tucumã a dormência das suas sementes deve estar relacionada, em parte, ao endocarpo, pois a sua retirada proporcionou redução no período de germinação. Trabalhando com *B. capitata*, resultados semelhantes foram encontrados por Aquino e outros (2008), Fernandes (2007) e Moura (2008), nas quais verificaram maior germinação das sementes quando efetuada a retirada do endocarpo, apesar disso, nenhum desses resultados chegaram próximos aos valores de até 90% de germinação, alcançados através da abertura da cavidade embrionária das sementes encontrados por Fior e outros (2011) trabalhando com acessos de diversas regiões do país tanto *in vitro* quanto em sementeiras, valendo destacar que a espécie *B. capitata* não foi testada em sementeiras, necessitando ainda de comprovações nesse sentido.

Outras causas de dormência encontradas nas sementes seriam a ação de substâncias inibidoras que pode ser definida, como a interação negativa ou positiva de compostos do metabolismo secundário produzidos por uma planta e lançados no meio. Utilizando frutos de pequi (*Caryocar brasiliensis*), foi avaliada a presença de inibidores de germinação nas sementes e nas partes dos frutos que envolvem a polpa, espinhos e endocarpo, utilizando extratos aquosos e metanólicos sobre sementes de alface. Os extratos aquosos e metanólicos do endocarpo e espinho diminuíram significativamente a velocidade e porcentagem de germinação (MELO; GONÇALVES, 2001). Já Fernandes (2008) verificou que a presença de substâncias inibidoras no endocarpo e na semente de coquinho azedo contribui para sua lenta germinação.

Ainda existe a dormência do embrião, o qual se apresenta parcialmente desenvolvido, sendo uma massa indiferenciada de células atribuída à desuniformidade de maturação de sementes da mesma planta. Carvalho e Nakagawa (2000) citam que este tipo de dormência é encontrado nas famílias Araliaceae e Arecacea. É importante ressaltar que todas as causas citadas podem agir de forma conjunta.

Embora resultados de germinação expressivos tenham sido alcançados para algumas palmeiras como a *B. capitata*, comparando a germinação sem nenhum tipo de tratamento, fica evidente ainda os baixos valores encontrados e necessidades de estudos. Embora demande custos significativos, a cultura de tecidos, dentre seus múltiplos usos, pode ser útil a fins de propagação em sementes com problemas de dormência, já havendo resultados significativos na literatura (FIOR et al., 2011; NEVES, et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011).

2.4 Cultura de Embriões em Palmeiras

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grande aplicação na agricultura. Nessa técnica pequenos fragmentos de tecidos vivos, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado (ANDRADE, 2002). Muitas partes das plantas são utilizadas como explantes, no entanto, ao relacionar ao cultivo de palmeiras, verificamos uma grande tendência voltada ao uso do embrião.

A terminologia ‘cultura de embriões’ tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (RAPAPPORT, 1954). Além disso, tem sido utilizada para superar a dormência de sementes, em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma; estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião; testar viabilidade de sementes; recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis; e como fonte de explantes para tecidos com alta totipotência (HU; FERREIRA, 1998).

Melo (2000) trabalhando com o cultivo *in vitro* da garirobeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc, encontrou resultados importantes, possibilitando adequar fatores como os antioxidantes, controle da contaminação, combinações de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com TDZ e BAP e as melhores dosagens de ANA e AIB. Fatores esses importantes para o desenvolvimento de estudos com cultivos *in vitro* e peculiar ao desenvolvimento de cada espécie.

Além de outros fatores, a cultura de embriões pode ajudar na germinação de sementes que apresentem como grande, empecilho à dormência. Ressalta-se o trabalho realizado por Hu (1972), que desenvolveu uma técnica com embriões de *Ilex paraguayensis*, planta que apresenta sementes com embrião imaturo, levando um período interessante para germinação.

2.5 Oxidação e Uso de Antioxidantes

Um dos mais graves problemas que ocorrem prejudicando o desenvolvimento *in vitro* de muitas plantas é com relação à oxidação. De acordo com Gould e Murashigue (1985), o termo corresponde à mudança de coloração do meio devido à liberação de compostos fenólicos pelo explante. 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. Melo e outros (2001), relatam ainda a inibição ao crescimento dos explantes em função da oxidação.

Geralmente, a oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado, na qual explantes jovens em geral oxidam menos que os mais velhos (TEIXEIRA, 2005). Pensando em palmeiras, tem se identificado um grande número que apresentam problemas relacionados, dessa maneira, prejudicando o desenvolvimento de estudos que viabilizem a obtenção de novos conhecimentos.

Diante disso, diversos autores estudaram e estudam o acréscimo de substâncias ao meio, posteriormente caracterizadas como antioxidantes, além de algumas novas técnicas, promovendo assim a diminuição dos problemas com oxidação. Dentre as substâncias utilizadas pode-se citar o carvão ativado, a polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, ácido cítrico, sendo a lavagem dos explantes, diminuição de danos causados aos mesmos, trocas frequentes de meios de cultura e modificação do ambiente (cultivo escuro ou baixas intensidades luminosas e composição do meio), procedimentos que podem melhorar o desenvolvimento em função da espécie utilizada.

O carvão ativado é um interessante elemento utilizado, por contribuir no processo de rizogênese, por reter parte de todos os elementos que compõem o meio, fixando

citocininas residuais, trazidas nos tecidos das plantas e absorvendo compostos tóxicos inibidores do enraizamento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Ashburner e outros (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. A suplementação do meio MS com ácido giberélico (GA₃) a 0,01 mg L⁻¹ e carvão ativado nas concentrações de 0,5 g. L⁻¹ até 2,0 g.L⁻¹ favoreceram o desenvolvimento e o crescimento dos embriões do híbrido *Citrus limonia* Osb. c *Poncirus trifoliata* L. Raf., cultivados *in vitro*, de acordo com resultados obtidos por Ribeiro e outros (2000).

Além disso, o carvão ativado é o antioxidante mais indicado para impedir a oxidação de diferentes tipos de explantes de dendezeiro e sua presença em todas as etapas do processo é considerado fundamental para o normal desenvolvimento e regeneração de embriões somáticos formados (GUEDES, 2008). A adição de carvão ativado nas concentrações de 0,25 e 0,5 g L⁻¹, no meio de cultura proporcionou efeito benéfico na germinação dos embriões somáticos obtidos de meristemas apicais de tamareira (ZOUINE et al., 2005).

Os fenóis são adsorvidos pelo PVP por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica, ou seja, as quinonas. Dessa maneira, podendo ser indicado também como um antioxidante para determinadas espécies, embora apresente menor utilização que o carvão ativado.

O ácido ascórbico foi o antioxidante mais eficiente no controle da oxidação e que proporcionou a maior porcentagem de germinação dos embriões zigóticos da guarirobeira, seguido pelo carvão ativado (MELO et al., 2001). Além de funcionar como um antioxidante, o ácido ascórbico pode ter efeito promovendo atividade metabólica dos tecidos conforme relatado por George (1996).

Resultados interessantes também foram encontrados por Siqueira e Inoue (1991), utilizando ácido ascórbico para a cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), o qual concluíram também a ineficácia do PVP para essa espécie. Outros ácidos também podem ser utilizados nos meios, como é o caso dos ácidos cítricos e também a cisteína.

O estabelecimento das culturas pode ter melhores resultados caso os explantes sejam cultivados no escuro ou em baixa intensidade luminosa durante as primeiras semanas de cultivo (DURAND-CRESSWELL et al., 1982). No entanto, trabalhando com amoreira-

preta (*Rubus* sp.), cv. Ébano, em períodos de escuro, não influenciam na porcentagem de enraizamento. Já em jaboticabeiras, Caldas e Taketomi (1993) perceberam que o cultivo no escuro e ácido ascórbico apresentaram bons resultados no controle da oxidação.

Com a palmeira *B. capitata*, Ribeiro e outros (2011) verificaram diferença significativa no cultivo no escuro apenas para a característica enraizamento, não havendo diferença em relação à oxidação, ressaltando que havia a presença de 2 mg L^{-1} de ácido ascórbico no meio MS. Os mesmos autores conseguiram identificar que a adição de sacarose e concentrações de sais entre 50 e 75% da concentração original do meio MS proporcionaram menor nível de oxidação.

2.6 Controle da Contaminação

Diversos fatores podem afetar o potencial germinativo das sementes e promoverem a formação de plântulas anormais, dentre eles, a presença de microrganismos, especialmente, fungos e bactérias (CORDER; BORGES JUNIOR, 1999). Diante disso, cuidados devem ser tomados em relação ao controle da contaminação durante o cultivo *in vitro*.

O hipoclorito de sódio ou de cálcio vem mostrando grande eficiência na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias, assim como a utilização de fungicidas e bactericidas, promovendo aumento no total de plântulas germinadas a partir de sementes tratadas (NASCIMENTO et al., 2007). As vantagens de utilização do hipoclorito de sódio é a solubilidade em água e, portanto, sua fácil remoção evitando efeitos residuais tóxicos que puderam provocar pardeamento (browning) via oxidação fenólica, sendo as “quinonas” resultantes, altamente tóxicas para o metabolismo celular (CID; ZIMMERMANN, 2006).

Trabalhando com o estabelecimento *in vitro* de macieira cultivares Galaxy, Maxigala e Mastergala, Erig e Schuch (2003) perceberam que a desinfestação dos explantes com hipoclorito de sódio, possibilita maior porcentagem de sobrevivência. As sementes *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam) desinfestadas com 2,5 e 5,0 % de hipoclorito de sódio durante 30 e 15 minutos, respectivamente, apresentaram maior porcentagem de

germinação e forneceram as menores percentagens de contaminação fúngica e/ou bacteriana (NASCIMENTO et al., 2007).

O uso de fungicidas no meio de cultivo, visando à redução da contaminação por fungos é usado por alguns autores (COLOMBO et al., 2004). De acordo com Azevedo (2003) a aplicação simultânea de um fungicida de contato com um sistêmico propiciaria melhores resultados, pois além de anular a transmissão dos patógenos para a parte aérea, pode colocar à plântula sob proteção de ameaças posteriores.

Bastante utilizado com a finalidade de proteção é o fungicida Benomyl, sistêmico, sendo absorvido e translocado pelas células e órgãos vegetais, protegendo dessa maneira tanto a planta quanto o meio de cultura. Fator esse de grande importância, uma vez que explantes provenientes do campo, muitas vezes já possuem o contaminante no interior do tecido, mesmo que, não apresente sintomas visíveis.

O Benomyl tem sido utilizado em diversos trabalhos no controle de contaminações fúngicas do meio e do material vegetal em várias concentrações, de 50 mg L⁻¹ (HAUPTMANN et al., 1985) a 0,6 g L⁻¹ (YANG, 1976) de Benomil. O Benlate na concentração de 200 mg L⁻¹ inibe o crescimento de fungos sem causar fitotoxidez aos explantes de *Celtis* sp., além disso, diminui a contaminação e não é fitotóxica, conforme resultados encontrados por Sato e outros (2001).

Resultados encontrados por Melo (2000) demonstraram a eficiência da utilização de fungicida no embrião da garirobeira associado ao álcool etílico 70% na desinfestação do fruto semente. No entanto, quando aplicado somente o fungicida, não houve o controle com eficiência da *Fusarium* sp., reduzindo acentuadamente a germinação.

No cultivo *in vitro* de cajuí (*Anacardium humile*), os principais fungos encontrados foram o *Aspergillus niger*, responsável por 67% da contaminação e o outro do gênero *Penicilium* observado em 33% das amostras contaminadas, sendo as concentrações de benomyl testadas, pouco eficientes no controle da contaminação em meio MS. Concentrações acima de 12,0 g L⁻¹ de Benomyl foram eficazes no controle do *Aspergillus niger* em meio MS, no entanto, essas concentrações são muito altas e podem causar fitotoxicidade aos explantes no cultivo *in vitro*, de acordo com resultados encontrados por Londe e outros (2007). Camargo (1997) demonstrou a ação do álcool diluído, efetuando a

desinfestação de sementes de *Bertholletia excelsea*, castanheira do Brasil, juntamente com o hipoclorito de sódio em fungos saprofitos.

Apesar da funcionalidade de alguns fungicidas, trabalhos com palmeiras vêm demonstrando resultados positivos com o uso apenas do hipoclorito de sódio e álcool diluído a 70%. Sementes de tamareira cv. Khadrawy foram desinfestadas por imersão em etanol 70% por 5 minutos e em hipoclorito de sódio a 10% de cloro ativo por 20 minutos, sendo em seguida lavadas por três vezes em água destilada esterilizada em autoclave (COSTA; ALOUFA, 2007).

Steinmacher e outros (2011) não relataram problemas de contaminação em embriões de pupunha (*Bactris gasipaes*) submetendo os mesmos a um período de tempo de 40 minutos de imersão em solução de hipoclorito de sódio (40%) posterior à imersão em álcool 70% durante 1 minuto, assim como Wang e outros (2003; 2006) com embriões de *Areca catechu* L., utilizando imersão por 10 minutos em solução de 2% de hipoclorito de sódio. Angelo *et al.* (2011) trabalhando com solução 5% do produto comercial (2-2,5% de cloro ativo) por 5 minutos em embriões de *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*.

Trabalhando com embriões de *B. capitata*, Ribeiro e outros (2011) e Neves e outros (2011) utilizaram a desinfestação em solução de 0,25% de cloro por 10 minutos e posterior lavagem em água destilada autoclavada por 10 minutos, não relatando no trabalho problemas com contaminação. Os mesmos resultados foram apresentados por Fior *et al.* (2011) trabalhando com acessos de coquinho azedo do sul do país e do estado de Minas Gerais, utilizando a desinfestação por meio de imersão da semente por um minuto em etanol 70%, seguida de 20 minutos em hipoclorito de sódio a 2% de i.a., seguido de tríplice lavagem por 15 segundos em água destilada.

2.7 Meio de Cultura e Fitorreguladores

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). Historicamente, os meios foram se complementando, com colaborações provindas de diversos pesquisadores

até as formulações utilizadas atualmente. Embora tenham sido feitos testes em diversas espécies, ainda temos como o meio base e mais utilizado o meio MS.

Várias literaturas citam a utilização do meio MS, que nos leva a perceber principalmente a combinação dos sais propostos por esse meio, sendo muitas vezes realizados experimentos para adaptação das concentrações e usos de diferentes vitaminas, sacarose e reguladores de crescimento. Além disso, a concentração de sais presentes no meio também pode ter relação no desenvolvimento das plântulas, sendo, portanto, recomendados doses menores ou maiores em relação aos objetivos do uso da cultura *in vitro* para cada espécie.

Ribeiro e outros (2008) verificaram maior número de brotos quando se acrescentaram 30 g L⁻¹ de sacarose e quando a concentração de sais foi de 125% do meio MS, trabalhando com *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). Já para as variáveis número de folhas e massa fresca da parte aérea, os melhores resultados foram obtidos, utilizando-se a concentração de 100% do meio MS acrescido de 30 e 60 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente.

Experimentos com manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.) concluíram que, para aumento do número de folhas, recomenda-se utilizar meio MS com concentração total de sais adicionado de qualquer tipo de açúcar (sacarose, glicose ou maltose) na concentração de 20 g L⁻¹ e, para maior altura de planta, recomenda-se meio MS, também com concentração total de sais, adicionado de sacarose ou glicose na concentração de 10 g L⁻¹ (RIBEIRO et al., 2007).

Já Oliveira e outros (1996) encontraram melhores resultados quando utilizaram meio de cultivo contendo 75% de meio MS, com 75% da concentração de nitrogênio e 6 % de sacarose, trabalhando com crisântemo. Resultado esse interessante uma vez que viabiliza uma economia de materiais no meio, possibilitando economias com resultados semelhantes ou superiores. Para algumas espécies de palmeiras, a redução de micronutrientes para a metade da concentração promoveu resultados favoráveis para germinação e desenvolvimento de plântulas obtidas a partir de culturas de embriões zigóticos (NWANKWO; KRIKORIAN, 1986). Fator esse observado com *B. capitata* nos resultados de Ribeiro e outros (2011), no qual o meio a 50 e 75% proporcionou menor oxidação, além de não constatar efeito da concentração de sais sobre o alongamento dos embriões, emissão

da primeira bainha e da segunda bainha, o que indica que as reservas de minerais são suficientes para o desenvolvimento inicial.

Além da variação do meio de cultivo, trabalhos vêm descrevendo efeitos benéficos do uso de citocininas, podendo referir-se principalmente ao uso de BAP e TDZ. Conforme Brum e outros (2002), os citocininas promovem nas plantas divisão, alongamento e diferenciação celular, retardam a senescência das plantas, promovem a quebra da dominância apical e induzem proliferação de gemas axilares. O BAP tem sido muito eficaz, para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de apresentar um custo acessível com relação a outros citocininas (HASEGAWA, 1979; ZAERR; MAPES, 1985).

Verificaram que a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP favorece o desenvolvimento de gemas em explantes de lírio-da-paz, independentemente da concentração de ANA, conforme Diniz (2008). Resultados encontrados por Santos e outros (2006) demonstraram que o meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP, após 135 dias de cultura, apresentou a maior taxa de multiplicação de brotos/explante, comprimento dos brotos e produção de matéria fresca e seca de plântulas de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith). Além disso, em todas as concentrações, o TDZ mostrou-se um potente indutor da calogênese *in vitro*.

No entanto Melo e outros (2001), verificou que na medida em que aumentou a concentração de BAP no meio MS, ocorreu uma redução gradual no tamanho médio da folha e peso médio da matéria seca da plântula de garirobeira. O mesmo autor ainda relata que o aumento na concentração do TDZ proporcionou também a diminuição do número, tamanho médio de folhas e peso da matéria seca da raiz.

Trabalhando com embriões zigóticos de *Butia eriospatha* e *Butia capitata*, Fior e outros (2008) encontraram elevados percentuais de germinação *in vitro*, em meio MS, independentemente do uso de GA₃ e BAP. Além das citocininas no meio de cultivo, torna-se interessante a aplicação de auxinas exógenas, que devem estar balanceadas com os demais hormônios, para favorecer o bom desenvolvimento das raízes e da parte aérea.

O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimação às condições *ex vitro* (CENTELLAS et al., 1999).

Em algumas espécies de plantas, simplesmente a eliminação das citocininas exógenas tem sido suficiente para induzir a formação do sistema radicular (THORPE, 1980). No entanto, muitas vezes se torna necessário acrescentar ao sistema auxinas sintéticas com intuito de promover o enraizamento. Dentre as várias auxinas, 2,4-D, AIA, AIB e ANA, percebe-se respostas diferentes *in vitro* em função de suas características.

O AIA apresenta como limitação sua instabilidade, sendo sensível à luminosidade e também à ação de microrganismos que a transformam em triptofano. Além disso, é uma auxina fraca quando comparada ao 2,4-D, conforme Caldas e outros (1998). No entanto, o AIA é a auxina natural mais encontrada nas plantas, estimulando o enraizamento, sendo a partir dessa, efetuados testes utilizando o AIB e 2,4-D. Outra auxina muito usada, para estimular a multiplicação em meio de cultura é o ANA, participando na formação e desenvolvimento de raízes adventícias nos caules de segmento vegetativos de plantas.

Resultados encontrados por Vasconcelos e outros (2009) trabalhando com o enraizamento *in vitro* de *Uncaria tomentosa*, indicam o uso de AIB nas concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹, sendo inviável o uso do AIA por proporcionar baixa percentagem de enraizamento. Conforme Centellas e outros (1999) a adição de 3 µM de AIB proporciona melhor enraizamento *in vitro* da macieira cv. Fred Hough, utilizando no meio de cultura MS com a concentração de sais reduzida para 50%.

Melo e outros (2001) conclui que na concentração de 1 mg L⁻¹ o ANA foi eficiente na formação de raízes fasciculadas *in vitro* da garirobeira, além disso, o meio MS acrescido de ANA propiciou um enraizamento adequado em todas as fases da rizogênese e promoveu maior produção de matéria seca da parte aérea e da raiz como também maior comprimento de raiz fasciculada na plântula do que o AIB. O autor ressalta também que o AIB não foi eficiente na rizogênese.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F.F.A.; BILIA, D.A.C.; KANASHIRO, S.; TAVARES, A.R.; BARBEDO, C.J. Germinação de sementes de *Rhapis excelsa* (Thunb.) Henry ex Rehder: efeitos da temperatura, luz e substrato. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 119-126, 2005.
- ALVES, M.R.P.; DEMATTE, C. **Palmeiras: características botânicas e evolução**. Campinas - SP: Fundação Cargill. 1987.
- ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2002, (Documentos 58).
- ANGELO, P.C.S.; MORAES, L.A.C.; LOPES, R.; SOUSA, N.R.; CUNHA, R.V.; QUISEN, R.C. *In vitro* rescue of interspecific embryos from *Elaeis guineensis* x *E. oleifera* (Arecaceae). **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 59, n. 3, p. 1081-1088, 2011.
- AQUINO, C.F.; LOPES, P.S.N.; MAGALHÃES, H.M.; SILVA, H.P.; NEVES, J.M.G.; Superação da dormência de sementes de coquinho azedo *Butia capitata* (Mart.) Becc. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória, **Anais...** Vitória: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008. 1 CD-ROM.
- ASHUBURNER, G. R.; THOMPSON, W. K.; BURCH, J.M. Effect of a-naphthaleneacetic acid and sucrose levels on the development of cultured embryos of coconut. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 35, n. 2, p. 157-163, Sept. 1993.
- AZEVEDO, L. A. S. **Fungicidas Protetores: fundamentos para o uso racional**. São Paulo – SP. 2003.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14. p. 1-16, 2004.
- BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de Bap e Ana na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, edição especial, p. 1403-1409, 2002.
- 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**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 107, 1993.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília - DF: Embrapa, 1998. v.1.

- CAMARGO, I.P. **Estudos sobre a propagação da Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.)**. 1997. 127 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitotecnia, Lavras, 1997.
- CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.
- CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C., FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF: v. 34, n. 2, p. 181-186, 1999.
- CID, L. P. D.; ZIMMERMANN, M. J. A contaminação *in vitro* de plantas. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília, DF: 2006. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 122).
- COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. R. P.; ASSIS, A. M. & FONSECA, C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 253 – 258, 2004.
- CORDER, M. P. M.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Will. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.
- COSTA, N. M. S.; ALOUFA, A. I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 3, p. 276-279, 2007.
- DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; OLIVEIRA, A. B; BEZERRA, A. M. E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n.1, p. 107-113, 2008.
- DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAYL, M. e FRANCLLET, A. Vegetative propagation of Eucaliptus. In: BONGA, J. M. e DURAZAN, D. J. (Eds.). **Tissue Culture in Forestry**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1982. p. 15-151.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.
- FARIA, J. P.; ALMEIDA, F.; SILVA, L. C. R.; VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização da polpa de coquinho azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n.3, p. 827-829, 2008.
- FERNANDES, R. C.; LOPES, P. S. N.; MAGALHÃES, H. M.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; MAIA, J. T. L. S.; FERNANDES, R. C.; GOMES, J. A. O.; CARNEIRO, P. A. P. Avaliação do efeito alelopático do coquinho azedo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Guarapari, v. 2, n. 2. p. 641 – 645, 2007.

FERNANDES, R. C. **Estudos propagativos do coquinho azedo (*Butia Capitata* (Mart.) Becc) Arecaceae**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.

FERREIRA, S. A. DO N.; GENTIL, D. F. de O. Beneficiamento, Pré-Tratamento e Germinação de Sementes de Tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer - Arecaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002. n. 17.

FIOR, C. S.; LATTUADA, D. F.; SCHWARZ, S F. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* e *B. capitata* (ARECACEAE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008. CD-ROM.

FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; LEONHARDT, C.; SCHWARZIV, S. F. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1150-1153, 2011.

FONSECA, R.S.; SIMÕES, M.O.M. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) no Norte de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 7, 2005, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2006.

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

GOULD. J. H.; MURASHIGUE, T. Morphogenic substances released by plant tissue culture: 1. Identification of barbering in Nandino culture medium, morphogenes is and factors influencing accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Riverside, CA, USA, v.4, n.1, p. 29-42, 1985.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília - DF: Embrapa - SPI / Embrapa – CNPH. 1998. v. 1, p.183-260.

GUEDES, R. S. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco. 2008.

HASEGAWA, P. M. *In vitro* propagation of rose. **HortScience**, Wallingford, v. 14, p. 610-612, 1979.

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**, New York, v. 4, n. 3, p. 129-132, 1985.

- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palms of the Américas**. New Jersey: Princeton University Press, 1995.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. v.1. p 371 – 393.
- HU, C. Y. OCHS, J. D. Development of embryoids from *Ilex aquifolium* and *L. cornuta*., **Plant Physiology**, Rockville, v.49, p. 31, 1972.
- LIMA, E. S. Diversity, structure and spatial distribution of palms in a Cerrado sensu strictu in Central Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 361 – 370, 2003.
- LONDE, L. N.; SOUSA, C. S.; VIEIRA, C.U.; BONETTI, A. M.; KERR, W. E.; Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 94-100, 2007.
- LORENZI, H. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2004. p. 303.
- LORENZI, H.; NOBLICK, L. R. KAHN, F; FERREIRA, E. **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2004.
- LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F., FERREIRA, E. **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010.
- MARCATO, A. C.; PIRANI, J. R. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Palmae (Arecaceae). **Boletim de Botânica (USP)**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 1- 8, 2006.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 1.ed. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MARTINS, E. R. **Projeto Conservação de recursos genéticos de espécies frutíferas nativas do Norte Mineiro: coleta, ecogeografia e etnobotânica**. Montes Claros: UFMG, 2003. (Relatório Institucional)
- MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 2. ed. Oxford: Pergamon Press Ltda, 1975.
- MELO, B. **Cultivo de embrião in vitro da Garirobeira [*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.]**. 2000. 117 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MELO, J. T.; GONÇALVES, A. N. Inibidores de germinação em frutos e sementes de pequi. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, n. 23, p. 1 – 11, 2001.

MELO, B.; PINTO, J. E. B.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, nov./dez., 2001.

MOURA, R. C. **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no norte de Minas Gerais**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.

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

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, 2007.

NEUWALD, D. A.; GIEHL, R. F. H.; PINTO, J. A. V.; SESTARI, I.; BRACKMANN, A. Caracterização das curvas de respiração e síntese de etileno de frutos de *Psidium cattleianum* Sabine. e de *Butia capitata* (Mart.) Becc. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 1., 2004, Pelotas. **Anais...** Pelotas, EMBRAPA, 2004.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação *in vitro* de embriões de coquinho azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae)] obtidos de frutos com diferentes graus de maturação. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v.7, n. 1, p. 47-54, 2011.

NWANKWO, B. A.; KRIKORIAN, A. D. Morphogenetic potential of embryo and seedlings-derived callu of *Elaeis guineensis* Jacq. Var. *Psifera* Becc. **Annals of Botany**, Benin City, Nigeria, n.51, p. 65-76, 1986.

OLIVEIRA, P. T.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de diferentes concentrações do meio MS, nitrogênio e sacarose na micropropagação de crisântemo ‘orange reagen’. **Revista Bragantia**, Campinas, v. 55, n.1, p. 9-18, 1996.

PEREIRA, B. A. S. Coqueiro-cabeçudo: palmeira do sertão. **Ciência Hoje**. v. 23, n. 137, 1998.

PINHEIRO, C. U. B. **Germinação de sementes de palmeiras**: revisão bibliográfica. Teresina: Embrapa – UEPAE de Teresina, 1986.

- 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.
- RAPPAPORT, J. *In vitro* culture of plant embryos and factors controlling their growth. **The Botanical Review**, v. 20, n. 4, p. 201-225, 1954.
- REITZ, R. Palmeiras. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1974.
- RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. C.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 2, p. 133-139, 2011.
- RIBEIRO, M. F.; DONINI, L. P.; SOUZA, J. A.; GUISSO, A. P. Influência de diferentes concentrações de sais de ms e açúcares no cultivo *in vitro* de manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 57-59, 2007.
- RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, V. A. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 101-106, 2008.
- RIBEIRO, V. G. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck *chiPoncirus trifoliata* (L.) Raf. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 27-30, 2000.
- ROSA, L.; CASTELLANI, T. T.; REIS, A. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari *var. odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 281-287, 1998.
- ROSSATO, M.; BARBIERI, R. L. Estudos etnobotânicos de palmeiras do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 1, 2007.
- SANTOS, A. S. A.; MACHADO, I. S.; LEÃO, A. L. ; RAMOS, A. A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) - A influência das citocininas sintéticas na cultura de tecidos. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 3, p. 62-65, 2006.
- SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. de; SOUZA, V.C. de. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n.2, p.117-123, 2001.
- SILVA, B. M. S.; CESARINO, F.; LIMA, J. D.; PANTOJA, T. F.; MÔRO, F. V. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Oenocarpus minor* Mart. (ARECACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 289-292, 2006.

SILVA, P. A. D. **Ecologia populacional e botânica de *Butia capitata* (Mart.) Beccari no cerrado no Norte de Minas Gerais**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

SILVA, S. R. **Plantas do cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. Brasília, DF: Fundação Pró-Natureza-FUNATURA, 1998.

SIQUEIRA, E. R. de.; INOUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 7, p. 949-953, 1991.

SODRÉ, J. B. **Morfologia das palmeiras como meio de identificação e uso paisagístico**. 2005. 62 f. Monografia (Especialização) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Hamburg, Germany, v.108, p. 1463–1475, 2011.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília, DF: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2005.

THORPE, T. A. Enraizamento de los brotes y preparación para su transplante. **Cultivo de tejidos em la agricultura**. Madrid: Mundi-Prensa, 1980.

VASCONCELOS, J. M.; LIMA, I. A. C.; CHOCOROSQUI, A. F.; TEIXEIRA, R. B.; RAPOSO, A. Efeitos dos reguladores de crescimento AIA, AIB e ANA no enraizamento *in vitro* de *Uncaria tomentosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 12, 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2009.

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

ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. action of growth regulators. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.), **Tissue culture in forestry**. 2. ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 231-255.

ZOUINE, J.; EL BELLAJ, M.; MEDDICH, A.; VERDEIL, J-L. e EL HADRAMI, I. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in Phoenix dactylifera. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Montpellier, France v. 82, p. 83 – 92, 2005.

WANG, H. C; CHEN, J. T; WU, S.; LIN, M.; CHANG, W. C. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant, v, 39, p.34 – 36, 2003

WANG, H.C.;CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. *Biologia Plantarum*, Kaohsiung, Taiwan, v. 50, n. 2, p. 279-282, 2006.

CAPÍTULO 2

RESUMO

CARNEIRO, P. A. P. **Descontaminação de embriões de coquinho azedo para o cultivo *in vitro***. 2012 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fruticultura) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Considerando como uma alternativa, a utilização da cultura de tecidos, percebe-se a falta de trabalhos relacionados à descontaminação de seus embriões, objetivando com esse estudo, avaliar o índice de contaminação e germinação em função de diferentes períodos de tempo do embrião em hipoclorito de sódio e a necessidade de aplicação de fungicida. O experimento foi conduzido em Uberlândia-MG, e os frutos de coquinho azedo foram coletados na região de Montes Claros – MG. As sementes foram extraídas e imersas em solução de cloro (0,12%) durante 10 minutos. A desinfecção dos embriões foi realizada em solução de álcool 70% durante 1 minuto e logo após, realizados os diferentes tratamentos: solução de 0,25% de cloro por 10, 20 e 30 minutos, sendo anteriormente colocado durante 10 minutos em solução de 1,5 mL L⁻¹ do fungicida tiofanato metílico ou somente os diferentes períodos de tempo em solução de cloro, porém sem fungicida. O experimento foi montado em esquema fatorial 2x3, e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, 4 repetições e 24 parcelas, contendo 1 embrião por frasco. Os frascos foram completados com 7 mL do meio MS com 75% de força iônica. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, havendo ausência de luz nos 15 dias iniciais. Ao final dos 30 dias, foram avaliadas as características: germinação (em %), o qual foram caracterizadas como plantas germinadas aquelas que emitiram parte aérea ou radícula e também a contaminação por bactérias e fungos separadamente. Não houve nenhuma contaminação relacionada à presença de fungos e apenas 3 frascos com presença de bactéria, representando cerca de 1,56% do experimento. Não há necessidade de utilização de fungicida no controle da contaminação e indica-se a permanência em solução de cloro 0,25% por período entre 10 a 30 minutos.

Palavras-chave: *Butia capitata*, hipoclorito de sódio, fungicida.

ABSTRACT

CARNEIRO, P. A. P. *In vitro* decontamination of *Butia capitata* (Martius) Becc. embryos. 2012. 76 f. Dissertation (Masters degree in Agriculture) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

The use of tissue culture is considered as an alternative for the production of seedling; however, there is a lack of studies related to decontamination of plant embryos for introduction in axenic culture, which was the objective of this study, to evaluate the index of contamination and germination of *Butia capitata* (Mart) Becc. as a function of different embryo immersion periods in sodium hypochlorite and the need for fungicide application. The experiment was conducted in Uberlândia-MG and the fruits of *Butia capitata* were collected in the region of Montes Claros-MG. The seeds were extracted and immersed in chlorine solution (0.12%) for 10 minutes. Embryo disinfection was done with 70% alcohol solution for 1 minute and, subsequently, transferred to the different treatments: 0.25% solution of chlorine for 10, 20 or 30 minutes, with, or without, a previous treatment in a 1.5 mL L⁻¹ solution of the fungicide methyl thiophanate for 10. The experiment design was completely randomized, set up as a 2 x 3 factorial with 6 treatments, 4 repetitions and 24 parcels containing 1 embryo per flask. The flasks contained 7 mL of MS medium with 75% of ionic strength. The flasks were kept in darkness for 15 days. The following characteristics were evaluated after 30 days: germination (in %), considering plants that had emitted either shoot or radicle, and also contamination by bacteria and fungi. There was no contamination related to the presence of fungi and only 3 flasks were observed with bacteria, representing approximately 1.56% of the experiment. There is no need to use fungicide to control contamination and treatment in chlorine solution 0.25% for a period of between 10 to 30 minutes is recommended.

Keywords: *Butia capitata*, sodium hypochlorite, fungicide.

1 INTRODUÇÃO

O coquinho azedo (*Butia capitata*) é uma palmeira nativa do cerrado, que vem despertando o interesse em regiões como o norte de Minas Gerais, em função da grande ocorrência e uso de seus frutos em diversas condições, podendo citar o uso *in natura*, preparo de sucos, sorvetes, picolés (LORENZI et al., 2010; SILVA, 2008), possibilitando complementação de renda de diversas famílias presentes nessa região, através da venda de seus produtos pelo extrativismo.

Essa comercialização tem se fortificado e integrado a ação de cooperativas nesse processo, viabilizando a compra direta dos extrativistas, chegando a pagar valores de até R\$ 1,00 por quilo na época da safra (SILVA, 2008). Apesar disso, percebe-se ainda baixo fornecimento em função da demanda gerada pelos seus produtos, mesmo que ainda seja uma demanda regionalizada.

A possibilidade de formação de pomares para produção e fornecimento dos frutos na quantidade demandada pelo mercado seria uma opção interessante, principalmente, ao relacionar a estudos iniciais já efetuados por Carneiro (2009), que evidenciou a possibilidade de produção dos mesmos em escala comercial e contínua, através da avaliação durante dois anos de produção de um pomar experimental. Aliado a esse fator, é perceptível a necessidade de implantação desse tipo de sistema, uma vez que a sua grande demanda tem gerado um extrativismo predatório, havendo perda de materiais e, assim, aliado ao desmatamento indiscriminado, podendo gerar no futuro a diminuição de plantas e oferta desse material.

Apesar de ser uma alternativa a implantação de áreas de plantio, sistemas agroflorestais e outras formas de cultivo, percebe-se dificuldade na formação de mudas dessa frutífera nativa. Moura (2008) verificou valores de 17,5% de germinação utilizando a retirada do endocarpo e do maior poro germinativo, sendo até o presente momento a forma testada mais indicada à formação das mudas. A germinação é baixa e irregular, levando até um ano para emergir quando não realizado nenhum tipo de tratamento (AQUINO *et al.*, 2008; FERNANDES, 2008, MOURA, 2008).

Dentro desse contexto, trabalhos vêm demonstrando a importância da biotecnologia nos avanços da agricultura, sendo a cultura de tecidos, mais especificamente a de embriões

um fator interessante ao pensar na superação de barreiras de germinação em palmeiras (TABAI, 1992; MELO et al., 2001; BANDEIRA, 2008). Para a *B. capitata*, tem sido verificado importantes estudos, testando diferentes tipos de meios de cultivo, luminosidade, concentrações de sacarose e relação da umidade com a germinação (NEVES et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011), além disso, permitindo a superação de sua dormência (FIOR et al., 2011).

Embora esses trabalhos não venham apresentando problemas de contaminação é necessário estudos que verifiquem a melhor forma de proporcionar o desenvolvimento dos tecidos sem conduzi-lo à morte quando isolado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), lembrando que esse processo é uma das etapas mais importantes da cultura de embriões por estar subsidiando os demais processos. Diversos produtos germicidas e concentrações são propostos em palmeiras (COSTA; ALOUFA, 2007; RIBEIRO et al., 2011; MELO et al., 2001) havendo respostas diferentes em função de cada espécie.

Dessa forma, considerando a falta de trabalhos relacionados à descontaminação dos embriões de coquinho azedo, objetivou-se avaliar a contaminação e germinação em função de diferentes períodos de tempo do embrião em hipoclorito de sódio e a necessidade de aplicação de fungicida tiofanato metílico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), e os frutos de coquinho azedo (*Butia capitata* (Martius) Beccari) coletados em estágio de completa maturação, na região de Montes Claros – MG. Os frutos com polpa firme e sem sinais de ataque de pragas ou microrganismos foram despulpados manualmente e mantidos em ambiente sombreado. As sementes foram extraídas com o auxílio de um torno manual de bancada e, posteriormente, imersas em solução de cloro 0,12% (v/v) durante 10 minutos.

O explante utilizado foi o embrião de coquinho azedo, e a sua retirada procedeu-se em câmara de fluxo laminar, através da utilização de um bisturi, tomando os cuidados necessários para não danificar a parte de interesse. Posteriormente à sua retirada, os embriões foram colocados em placa de Petri com solução de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico para evitar oxidação (MELO, 2000; RIBEIRO et al., 2011). Em seguida, foi efetuada a desinfecção dos embriões, colocando os mesmos em solução de álcool 70% durante um minuto e logo após, realizados os diferentes tratamentos: solução de 0,25% (v/v) de cloro por 10, 20 e 30 minutos, sendo anteriormente colocado durante 10 minutos em solução de 1,5 mL L⁻¹ do fungicida tiofanato metílico ou somente os diferentes períodos de tempo em solução de cloro, porém sem fungicida, conforme resumo na Tabela 1. Ao final dos tratamentos todos os embriões foram lavados por três vezes com água destilada e autoclavada, antes da inoculação.

TABELA 1. Tratamentos em função dos diferentes tempos de imersão do embrião de coquinho azedo em solução de cloro (0,25%) com ou sem imersão em solução de 1,5 m L⁻¹ de tiofanato metílico. Uberlândia-MG, 2012

TRATAMENTOS	IMERSÃO EM CLORO	TIOFANATO METÍLICO
	(min)*	(1,5 mL L ⁻¹)
T1	10	Sem
T2	10	Com
T3	20	Sem
T4	20	Com
T5	30	Sem
T6	30	Com

* Solução de cloro (0,25%).

O experimento foi instalado em esquema fatorial 2x3 e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, 4 repetições e 24 parcelas, contendo 1 embrião por frasco. Os frascos de capacidade de 35 mL foram completados com 7 mL do meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) com 75% de força iônica (Ribeiro *et al.*, 2011). Ao meio foi acrescido 30g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina; 1 mg L⁻¹ de piridoxina; 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol; 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada e 7 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustados para 5,7 (TABAI, 1992).

Anteriormente à inoculação, os frascos foram fechados com a tampa plástica e submetido à autoclavagem, a uma temperatura de 121°C durante 20 minutos, a pressão de 1 atm. Com a inoculação dos embriões, realizado na câmara de fluxo laminar devidamente higienizado com luz UV e aplicação de álcool (70%), os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±1 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 25µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria. Durante os 15 primeiros dias, os frascos permaneceram em ausência de luz (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Ao final dos 30 dias, foram avaliadas as características: germinação (em %), o qual foram caracterizadas como plantas germinadas aquelas que emitiram parte aérea ou radícula e também a contaminação por bactérias e fungos separadamente.

A homogeneidade dos resíduos e normalidade das variâncias foram verificadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, no programa estatístico Statistical Package for Social Science (SPSS), enquanto que a análise de variância e comparação entre médias foi testada através do programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve nenhuma contaminação relacionada à presença de fungos e apenas 3 frascos com presença de bactéria, representando cerca de 1,56% do experimento. A contaminação verificada para bactéria e ausência de contaminação fúngica demonstra que não houve diferença significativa entre os tratamentos, permitindo uma boa assepsia dos embriões ao se utilizar qualquer um dos períodos de imersão testados em solução de cloro 0,25% e não havendo a necessidade de utilização do fungicida. Também trabalhando com a palmeira *B. capitata*, Ribeiro e outros (2011) e Neves e outros (2010) não relataram problemas com a utilização de solução com a mesma concentração de cloro (0,25%) por 10 minutos.

Tratamentos similares sem fungicidas e com solução de cloro tem mostrado bons resultados em outras palmeiras. Cunha e outros (2011) utilizou a imersão dos embriões de babaçu em solução de cloro a 0,5% por 10 minutos, verificando uma média geral de 12% de contaminação fúngica, resultado esse superior aos verificados nesse trabalho e por Ribeiro e outros (2011), efetuando o mesmo protocolo em macaúba. Steinmacher e outros (2011) não relataram problemas de contaminação em embriões de pupunha (*Bactris gasipaes*) submetendo os mesmos a um período de tempo mais elevado (40 minutos) de imersão em solução de hipoclorito de sódio (40%), assim como Wang e outros (2003; 2006) com embriões de *Areca catechu* L., utilizando imersão por 10 minutos em solução de 2% de hipoclorito de sódio e Angelo *et al.* (2011) trabalhando com solução 5% do produto comercial (2-2,5% de cloro ativo) por 5 minutos em embriões de dendê.

Esses resultados refletem a necessidade de estudos direcionados a cada espécie, havendo variação dos resultados dentro de uma mesma família, como verificado anteriormente para Arecaceae. Além disso, percebe-se a baixa relação da contaminação em função de diferentes períodos de tempo em uma mesma concentração de cloro, havendo apenas cuidados em relação à utilização de doses mais diluídas quando utilizados períodos longos. Também pode ser comentada a baixa utilização de fungicidas em palmeiras no cultivo *in vitro*, embora Saldanha (2007) tenha utilizado a desinfecção em frutos de *Euterpe edulis* em solução composta por Agrimicina 1,5 g L⁻¹, hipoclorito de sódio 20% (v/v), Captan 4 g L⁻¹, durante 15 minutos, para inoculação dos embriões. Melo (2000) verificou

menores taxas de contaminação na associação da aplicação de álcool (70%) no fruto semente da garirobeira e o fungicida Benomyl no embrião.

Apesar desses resultados, Fior e outros (2011) não relataram problemas de contaminação utilizando o cultivo *in vitro* em sementes desinfestadas de *B. capitata* e *B. odorata*, o que pode sugerir uma baixa contaminação presente no embrião, ressaltando que a cavidade embrionária é bem protegida em relação ao meio externo, sugerindo assim uma menor ou até mesmo ausência de contaminação. Aliado a isso, estudo realizado por Magalhães e outros (2008) verificaram a presença de *Fusarium* spp. (72,3%) e *Penicillium* spp. (32,5%), além de outros microrganismos em menores quantidades em sementes de *Butia capitata* (com e sem endocarpo), sendo esse mais um indício que demonstra a necessidade de desinfestação das sementes anteriormente à retirada do seu embrião, como realizado por diversos autores (ALVES, 2007; ANGELO et al., 2011; CUNHA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011).

Para a germinação de embriões de coquinho azedo, os resíduos seguiram uma distribuição normal e suas variâncias apresentaram homogeneidade. Observando a análise de variância (tabela 2), percebe-se que não foi significativa a interação dos diferentes tempos dos embriões em solução de cloro e utilização do fungicida na germinação, ocorrendo o mesmo resultado quando analisado cada um desses fatores separadamente.

TABELA 2. Resumo das análises de variância para a germinação obtida em relação a diferentes tempos (10, 20 e 30 minutos) de imersão em hipoclorito e com tratamento ou não com solução de fungicida (Tiofanato Metílico) dos embriões de coquinho azedo (*Butia capitata*). Uberlândia, MG, 2012.

		Quadrados Médios
Fontes de Variação	GL	Germinação (%)
Hipoclorito	2	1008,4533 ^{ns}
Fungicida	1	489,0016 ^{ns}
Hipoclorito*Fungicida	2	920,3416 ^{ns}
Resíduo	18	417,7082
Coefficiente de Variação		39,93%

^{ns} – Valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

Na Figura 1, pode-se perceber que apesar de não ter sido constatado pelo teste F diferença significativa, houve uma variação entre as médias observadas, alcançando o valor de 21,46% de germinação quando comparado aos tempos de 10 minutos com 30 minutos de permanência em solução de cloro e de 16,46% quando confrontado o período mais curto com o intermediário. Resultado diferente foi encontrado por Alves (2007) trabalhando com dendê, havendo favorecimento ao processo de germinação quando utilizado uma menor concentração de hipoclorito (1% de NaClO) combinado a um menor tempo de exposição. Resultados de germinação positivo também foram verificados para o tempo de 10 minutos em solução de 1% de NaClO em outras palmeiras (CAVALCANTE, 2001; PEREIRA et al., 2006).

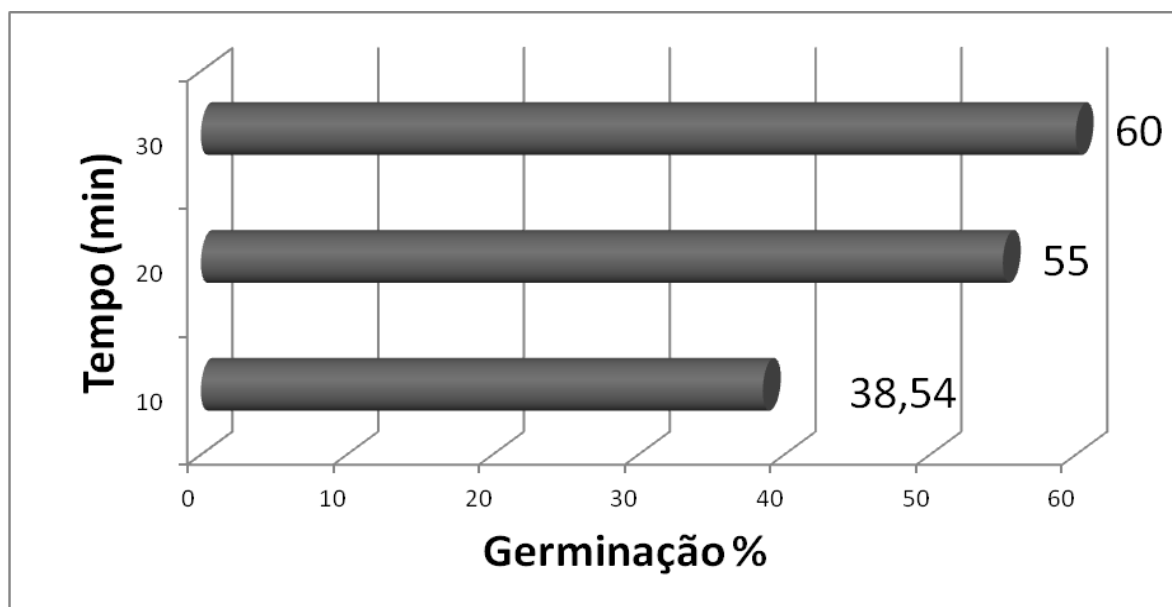


FIGURA 1. Germinação média obtida *in vitro* em relação a diferentes tempos (10, 20 e 30 minutos) de imersão em solução de cloro (0,25%) de embriões de coquinho azedo (*Butia capitata*). Uberlândia, MG, 2012.

Esses valores sugerem um melhor resultado encontrado no processo de germinação com imersão em solução de cloro por período de 30 minutos, sendo indicada a realização de novos testes com períodos até mais elevados, possibilitando, assim, identificar até que

ponto haverá interferência desse processo na germinação dos mesmos. O hipoclorito de sódio ou de cálcio vem mostrando grande eficiência na desinfestação de sementes, eliminando fungos e bactérias, promovendo aumento no total de plântulas germinadas a partir de sementes tratadas (NASCIMENTO et al., 2007), possibilitando vantagens em função de sua alta solubilidade em água e, portanto, sua fácil remoção evitando efeitos residuais tóxicos (CID; ZIMMERMANN, 2006), além de seu baixo custo e eficiência. (CUNHA et al., 2011). Nietsche (2006) afirma que, dependendo do tempo de imersão pode ocorrer desidratação dos explantes, porém não ocorreu esse fator no presente experimento, sendo as concentrações utilizadas eficientes na assepsia e não tóxicas aos explantes.

Apesar do valor de 60% de germinação encontrada, outros trabalhos com *B. capitata* demonstram valores ainda superiores, como percentagens acima de 90%. através da abertura total da cavidade embrionária da semente (FIOR et al., 2011), utilizando a mesma temperatura verificada nesse trabalho, porém sem relatos da luminosidade. Ribeiro e outros (2011) alcançaram valores de até 71,8% de alongamento do embrião, no entanto, utilizou a oscilação de temperatura de 25 °C à noite e 30 °C durante o dia. Ressalta-se assim, a necessidade de estabelecimento de um futuro protocolo que possibilite a determinação não somente de composição dos meios e tratamentos de desinfecção e oxidação, mas que exprima resultados em função das variações externas como temperatura e intensidade de luminosidade.

O uso do fungicida (Figura 2) demonstra a baixa resposta em relação à germinação em função de sua utilização, representando um acréscimo de 9,02% de germinação quando não efetuado o tratamento, apesar de não ter havido diferença significativa entre os tratamentos. Além disso, verificou-se que não existe a necessidade de aplicação do mesmo pensando na desinfestação dos embriões, sendo assim, havendo menores gastos no desenvolvimento das atividades. Diversos trabalhos citados têm sido desenvolvidos sem a utilização de fungicida, demonstrando resultados na germinação (CUNHA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011a; STEINMACHER et al., 2011; WANG et al., 2003; 2006), embora Melo (2000) tenha identificado maiores taxas de germinação na associação da aplicação de álcool 70% no fruto semente da garrobeira e o fungicida Benomyl no embrião.

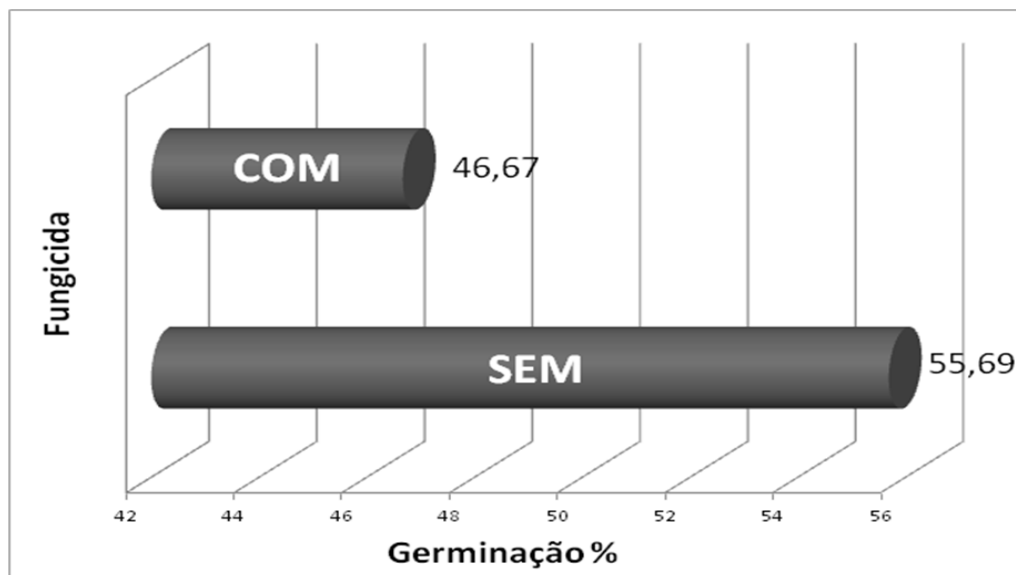


FIGURA 2. Germinação média obtida *in vitro* em relação à presença ou ausência do fungicida Tiofanato metílico ($1,5 \text{ ml L}^{-1}$) em embriões de coquinho azedo (*Butia capitata*). Uberlândia, MG, 2012.

4 CONCLUSÕES

- Não há necessidade de utilização de fungicida no controle da contaminação.
- Indica-se a permanência em solução de cloro 0,25% por período entre 10 a 30 minutos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. A. O. **Resgate *in vitro* de híbridos interespecíficos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*)**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.
- ANGELO, P. C. S.; MORAES, L. A. C.; LOPES, R.; SOUSA, N. R.; CUNHA, R. V.; QUISEN, R. C. *In vitro* rescue of interspecific embryos from *Elaeis guineensis* x *E. oleifera* (Arecaceae). **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 59, n. 3, p. 1081-1088, 2011.
- AQUINO, C. F.; LOPES, P. S. N.; MAGALHÃES, H. M.; SILVA, H. P.; NEVES, J. M. G.; Superação da dormência de sementes de coquinho azedo *Butia capitata* (Mart.) Becc. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008. 1 CD-ROM.
- BANDEIRA, F. S. **Cultivo *in vitro* e embriogênese somática de embriões zigóticos de Macaúba *Acromia aculeata* (Jacq.) Loddiges**. 2008. 92 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- CARNEIRO, P. A. P. **Comportamento produtivo de *Butia capitata* (Martius) Beccari (coquinho azedo) em pomar experimental**. 2009. (Trabalho de conclusão de graduação) - Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2009.
- CAVALCANTE, A.S.L. **Respostas morfogênicas *in vitro* de açazeiro (*Euterpe oleracea* L.) e de cupuçuazeiro (*Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex Spreng) Schum)**. 2001. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.
- CID, L. P. D.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF: 2006. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 122).
- COSTA, N. M. S.; ALOUFA, A. I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 38, n. 3, p. 276-279, 2007.
- CUNHA, I. R. G.; NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; PIMENTA, M. A. S. Cloro na desinfestação de sementes no cultivo *in vitro* de embriões de babaçu (*Attalea vitrivir*). In: FÓRUM DE PESQUISA, ENSINO, EXTENSÃO E GESTÃO, 5, 2011, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros: Unimontes, 2011.
- FERNANDES, R. C. **Estudos propagativos do coquinho azedo (*Butia Capitata* (Mart.) Becc) Arecaceae**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; LEONHARDT, C.; SCHWARZIV, S. F. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1150-1153, 2011.

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

LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010.

MAGALHÃES, H. M.; CATÃO, H. C. R. M.; SALES, N. L. P.; LIMA, N. F.; LOPES, P. S. N. Qualidade sanitária de sementes de coquinho azedo (*Butia capitata*) no Norte de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.8, p.2371-2374, 2008.

MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da Garirobeira [*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.]**. 2000. 117 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MELO, B.; PINTO, J. E. B.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1301-1306, nov./dez., 2001.

MOURA, R. C. **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no Norte de Minas Gerais**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.

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

NASCIMENTO, P. K. V.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rígida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, 2007.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação *in vitro* de embriões de coquinho azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae)] obtidos de frutos com diferentes graus de maturação. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 7, n.1, p. 47-54, 2010.

- NIETSCHE, S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 989-991, 2006.
- PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.
- RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. C.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 2, p. 133-139, 2011.
- RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. **Trees**, v. 26, p. 659, 2011.
- SALDANHA, C. W. O. **Conservação *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius através da embriogênese somática**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Geomática) - Universidade Federal de Santa Maria (Centro de Ciências Rurais), Santa Maria, 2007.
- SILVA, P. A. D. **Ecologia populacional e botânica de *Butia capitata* (Mart.) Beccari no cerrado no Norte de Minas Gerais**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.
- STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, Hamburg, Germany, v.108, p.1463–1475, 2011.
- TABAI, S. A. **Propagação da palmeira macaúba *Acromia aculeata* (Jacq.) Loddiges através de métodos *in vitro***. 1992. 121 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.
- WANG, H. C.; CHEN, J. T.; WU, S.; LIN, M.; CHANG, W. C. *In vitro* Cell. **Dev. Biol. Plant**, v.39, p.34–36, 2003.
- WANG, H.C.; CHEN, J. T.; CHANG, W. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, Kaohsiung, Taiwan, v. 50, n. 2, p. 279-282, 2006.

CAPÍTULO 3

RESUMO

CARNEIRO, P. A. P. **Antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de embriões de coquinho azedo** 2012 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fruticultura) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Objetivou-se neste estudo, identificar a germinação e oxidação dos embriões de *Butia capitata* em resposta ao uso de diferentes antioxidantes presentes no meio e a necessidade de colocação dos explantes em solução de ácido ascórbico anteriormente à inoculação. O experimento foi conduzido em Uberlândia-MG, e os frutos de coquinho azedo coletados na região de Montes Claros – MG. Após a desinfestação das sementes em solução de cloro (0,12%) por 10 minutos, efetuou-se a extração dos embriões, sendo os mesmos acondicionados em placa de Petri, contendo solução de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico ou apenas em água destilada e autoclavada, de acordo com seu tratamento. Em seguida, foi efetuada a desinfecção dos embriões, colocando-os em solução de álcool 70% durante um minuto, seguido em solução de 0,25% de cloro por 30 minutos e, ao final, lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial com oito tratamentos, quatro repetições e 12 parcelas, sendo cada parcela constituída por um frasco, contendo quatro embriões. Os tratamentos consistiram no acréscimo de diferentes substâncias antioxidantes (testemunha – ausência de substâncias antioxidantes; ácido ascórbico – 100 mg L⁻¹; PVP – 400 mg L⁻¹ e carvão ativado – 3,0g L⁻¹) ao meio MS com 75% de força iônica, com ou sem imersão em solução de ácido ascórbico (100 mg L⁻¹). Após a inoculação os frascos, foram mantidos em sala de crescimento, permanecendo na ausência de luz no 15 primeiros dias. Ao final de 45 dias foram avaliadas as características: oxidação (em %), constatada através do escurecimento das estruturas do embrião; germinação (em %) e plantas normais (%), considerando plantas normais as que emitiram tanto parte aérea quanto radícula, enquanto que a germinação considerou-se apenas emissão de uma dessas partes. A utilização de carvão ativado proporciona resultados de formação de plantas com oxidação inferior e germinação superior aos demais antioxidantes testados, e a prática de imersão dos embriões

em solução de ácido ascórbico contribui para menor oxidação e maior formação de plantas normais.

Palavras-chave: *Butia capitata*, ácido ascórbico, carvão ativado.

ABSTRACT

CARNEIRO, P. A. P. **Antioxidants in the establishment of *Butia capitata* (Martius) Becc. embryos *in vitro***. 2012. 76 f. Dissertation (Masters degree in Agriculture) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

This study identified the germination and oxidation of *Butia capitata* embryos in response to the use of different antioxidants added to the growth medium and the need for previous explant treatment with ascorbic acid. The experiment was conducted in Uberlândia, Minas Gerais and the fruits of *Butia capitata* (Mart) Becc. collected in the region of Montes Claros - MG. Seeds were disinfested in a chlorine solution (0.12 %) for 10 minutes and, subsequently, the embryos were extracted, and transferred to either a Petri dish containing solution of 100 mg L⁻¹ of ascorbic acid, or sterile distilled water. Then, the embryos were disinfested in a 70% alcohol solution for one minute, followed by a 0.25% chlorine solution for 30 minutes and, finally, rinsed three times in sterile distilled water. The experimental design was completely randomized with eight treatments, four repetitions and 12 plots, each plot consisted of a flask containing four embryos. The treatments consisted of the addition of different antioxidants (control - absence of antioxidants; ascorbic acid - 100 mg L⁻¹; PVP - 400 mg L⁻¹, or activated charcoal - 3.0 g L⁻¹) to the MS medium with 75% ionic strength. After inoculation the flasks were kept in a growth room, remaining in darkness for the first 15 days. The following characteristics were evaluated after 45 days: oxidation (%), observed as the darkening of the embryo structures; germination (%) and normal plants (%), considering plants that had emitted both shoot and radicle, in contrast with germination, which considered emission of any of these parts. The use of activated charcoal resulted in plants with less oxidation and greater germination than the other antioxidants tested, and the practice of embryo immersion in ascorbic acid solution contributed to decreasing oxidation and increasing the production of normal plants.

Keywords: *Butia capitata*, ascorbic acid, activated charcoal.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem impulsionado os estudos em diversas áreas do conhecimento, podendo destacar as diversas aplicações na agricultura, através do uso da cultura de tecidos vegetais que proporciona dentre outros fatores, a multiplicação sistematizada de plantas; 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 (MELO, 2000).

Dentre as técnicas da cultura de tecidos, a micropropagação é a de maior impacto e de resultados mais concretos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Através do uso do embrião como explante, resultados importantes têm sido alcançados no cultivo de palmeiras (FIOR et al., 2011; LEDO et al., 2001; LÉDO et al., 2007; MELO et al., 2001; NEVES et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011) embora a oxidação seja um dos fatores mais problemáticos ao relacionar ao cultivo *in vitro* da família Arecaceae.

Para evitar a oxidação, diversos métodos são utilizados, como a lavagem dos embriões (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), que juntamente com a aplicação de diferentes substâncias antioxidantes como o ácido ascórbico, polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado têm proporcionado um bom desenvolvimento dos cultivos *in vitro* em palmeiras (FIOR et al., 2011; MELO et al., 2001; NEVES et al., 2011). Outro método a ser destacado é a luz, uma vez que o escurecimento dos tecidos poderá ser reduzido e até mesmo impedido, caso os explantes sejam cultivados no escuro por até 14 dias (MONACO et al., 1977).

O coquinho azedo (*Butia capitata*) é uma palmeira nativa do cerrado, que vem despertando o interesse em regiões como o Norte de Minas Gerais, em função da grande ocorrência e uso de seus frutos em diversas condições, podendo citar o uso *in natura* como preparo de sucos, sorvetes e picolés (LORENZI et al., 2010; SILVA 2008), possibilitando complementação de renda de diversas famílias presentes nessa região, através da venda de seus produtos pelo extrativismo.

As altas taxas de destruição do cerrado, que, juntamente com o extrativismo predatório, originam progressivamente menores produções e perda de materiais genéticos de características desejáveis, colocando em risco real a sobrevivência de algumas espécies

(LUIS, 2008), dentre elas o coquinho azedo, que está diminuindo sua produção ao longo dos anos, sendo difícil encontrar indivíduos jovens na vegetação (MARTINS, 2003).

Adicionalmente, a germinação de *B. capitata* é baixa, lenta e desuniforme, cerca de 1% (AQUINO et al., 2008; FERNANDES, 2008; MOURA, 2008). Reunindo todos esses aspectos, percebe-se a necessidade de desenvolvimento de estudos com essa palmeira, proporcionando o entendimento de sua dormência e manejos que subsidiem o desenvolvimento de mudas para reintrodução das mesmas em áreas naturais e até mesmo formação de pomares para suprimento de sua demanda.

Trabalhos já vêm sendo desenvolvidos com *B. capitata* no cultivo de embriões, utilizando o carvão ativado como antioxidante, sendo alcançados valores de até 71,8% de alongamento dos embriões, e evidenciando o menor favorecimento da oxidação quando utilizadas sementes maduras e meios de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com concentrações de sais entre 50 e 75% (RIBEIRO et al., 2011; NEVES et al., 2011).

Apesar de os dados subsidiarem informações importantes para o cultivo *in vitro* dessa palmeira, verifica-se ainda a inexistência de testes com outros antioxidantes na literatura e também a verificação da viabilidade do procedimento de colocação dos explantes anteriormente à inoculação em solução de ácido ascórbico.

Dessa forma, objetivou-se identificar a germinação e oxidação dos embriões de *B. capitata*, em resposta ao uso de diferentes antioxidantes presentes no meio e a necessidade de colocação dos explantes em solução de ácido ascórbico anteriormente à inoculação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Uberlândia-MG, e os frutos de coquinho azedo coletados em estágio de completa maturação, na região de Montes Claros – MG. Os frutos com polpa firme e sem sinais de ataque de pragas ou microorganismos foram despoldados manualmente e mantidos em ambiente sombreado. As sementes foram extraídas com o auxílio de um torno manual de bancada e, posteriormente, imersa em solução de cloro (0,12%) durante 10 minutos.

O explante utilizado foi o embrião de coquinho azedo, e a sua retirada procedeu-se em câmara de fluxo laminar, através da utilização de um bisturi, tomando os cuidados necessários para não danificar a parte de interesse. Posteriormente à sua retirada, os embriões foram colocados em placa de Petri com solução de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, para evitar oxidação (MELO, 2000; RIBEIRO et al., 2011) ou apenas em água destilada e autoclavada, de acordo com seu tratamento. Em seguida, foi efetuada a desinfecção dos embriões, colocando os mesmos em solução de álcool 70% durante um minuto e, logo após, em solução de 0,25% de cloro por 30 minutos, sendo ao final lavada por três vezes com água destilada e autoclavada.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2, com 8 tratamentos, 4 repetições e 32 parcelas, sendo cada frasco constituído por quatro embriões. Os tratamentos consistiram no acréscimo de diferentes substâncias antioxidantes (testemunha – ausência de substâncias antioxidantes; ácido ascórbico – 100 mg L⁻¹; PVP – 400 mg L⁻¹ e carvão ativado – 3,0g L⁻¹) ao meio MS com 75% de força iônica (RIBEIRO *et al.*, 2011), com ou sem imersão do embrião em solução de ácido ascórbico (100 mg L⁻¹), conforme citado anteriormente.

Em todos os meios foram acrescentados 30g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina; 1mg L⁻¹ de piridoxina; 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol; 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada e 7 g L⁻¹ de ágar (TABAI, 1992). O pH dos meios foram ajustados para 5,7± 0,1 e cada frasco com capacidade de 300 mL recebeu a quantidade de 30 mL do meio, de acordo com cada tratamento, sendo posteriormente fechado com tampa

plástica e submetido à autoclavagem, a uma temperatura de 121°C, durante 20 minutos, a uma pressão de um atm.

Após a inoculação de quatro embriões por frasco, realizado na câmara de fluxo laminar devidamente descontaminada com luz UV e aplicação de álcool (70%), os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±1 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 25μ mol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria. Durante os 15 primeiros dias, os frascos permaneceram sob ausência de luz (RIBEIRO et al., 2011).

Ao final de 45 dias, foram avaliadas as características: oxidação (%), constatada através do escurecimento das estruturas do embrião; germinação (%) e plantas normais (%), considerando plantas normais as que emitiram tanto parte aérea quanto radícula, enquanto que na germinação considerou-se apenas emissão de uma dessas partes, ressaltando-se a utilização de lupas eletrônicas para facilitar a avaliação dessas características.

A homogeneidade dos resíduos e normalidade das variâncias foi verificada através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, no programa estatístico SPSS, enquanto que a análise de variância e comparação entre médias foi testada através do programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000), utilizando o teste de Tukey (5%).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resíduos seguiram uma distribuição normal para a oxidação, germinação e plantas normais obtidas de embriões de coquinho azedo, e suas variâncias apresentaram homogeneidade. Em relação aos resultados da análise de variância (Tabela 1) percebe-se que não foi significativa a interação entre a adição de diferentes substâncias antioxidantes ao meio e presença ou ausência de imersão em solução de ácido ascórbico (100 mg L^{-1}) posterior a retirada dos embriões das sementes. Ao analisar separadamente cada um desses fatores, são percebidas respostas significativas ($p > 0,01$) para todos os fatores analisados, com exceção da germinação em relação à adição de diferentes substâncias antioxidantes aos meios.

TABELA 1. Resumo das análises de variância para a oxidação, germinação e plantas normais, obtidas de embriões de *Butia capitata* em relação a presença de diferentes substâncias antioxidantes ao meio (testemunha – sem substâncias antioxidantes; ácido ascórbico – 100 mg L^{-1} ; PVP – 400 mg L^{-1} e carvão ativado – $3,0 \text{ g L}^{-1}$) com ou sem imersão em solução de ácido ascórbico (100 mg L^{-1}) posterior a retirada dos embriões das sementes. Uberlândia, MG, 2012.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		Oxidação	Germinação	Plantas normais
Antioxidantes (a)	3	7340,7685**	457,7642	1117,3215**
Imersão em Ácido Ascórbico (b)	1	2508,4445**	3919,6658**	3559,5703**
Antioxidantes* Imersão em Ácido Ascórbico	3	176,4468	317,3846	67,0750
Resíduo	24	263,3166	191,5156	210,3319
Coefficiente de Variação (%)		28,07	17,74	20,82

**Dados significativos ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 2 permite verificar diferenças significativas, havendo menor oxidação ao meio acrescido de $3,0 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado em relação às demais substâncias antioxidantes e testemunha testadas, enquanto que a tabela 3 demonstra a diferença significativa na utilização da prática de imersão dos embriões em solução de ácido

ascórbico (100 mg L⁻¹) posterior à retirada dos mesmos das sementes. Resultados positivos foram encontrados em outras plantas da família Arecaceae, utilizando os dois procedimentos de melhores resultados verificados, Cunha e outros (2011) relataram que não houve problemas de oxidação em embriões de babaçu (*Attalea vitrivir*) em solução de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e ao meio acrescentado de 3g L⁻¹ de carvão ativado, sendo os mesmos resultados encontrados por Neves e outros (2011) e Ribeiro e outros (2011), em embriões de *B. capitata*.

TABELA 2. Dados médios da oxidação, germinação e plantas normais, obtidas de embriões de *Butia capitata*, em relação à presença ou ausência de diferentes substâncias antioxidantes ao meio (testemunha – sem substâncias antioxidantes; ácido ascórbico – 100 mg L⁻¹; PVP – 400 mg L⁻¹ e carvão ativado – 3,0 g L⁻¹). Uberlândia, MG, 2012.

Meios	Dados médios (%)		
	Oxidação	Germinação	Plantas Normais
MS (testemunha)	71,88 b	69,79 a	60,42 b
MS + Ácido Ascórbico	64,58 b	76,04 a	70,83 ab
MS + PVP	81,24 b	78,13 a	61,46 b
MS + Carvão Ativado	13,54 a	88,02 a	85,94 a
DMS	22,38	19,09	20,01

Na coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey (5%).

Para cultivo de embriões de macaúba, foi adicionado apenas o carvão ativado na concentração de 3g L⁻¹ (SOARES et al., 2011) e conforme Alves (2007), a utilização de 0,25% de carvão ativado proporcionou menor média de oxidação de embriões (0,6) de dendezeiro dentre os tratamentos testados (0,0; 0,1 e 0,2%). Além disso, o carvão ativado é o antioxidante mais indicado para impedir a oxidação de diferentes tipos de explantes de dendezeiro (GUEDES, 2008). Apesar dos resultados apresentados, vale salientar os resultados obtidos por Fior e outros (2011), que não relatou problemas de oxidação no desenvolvimento de sementes intactas, escarificadas e totalmente abertas no cultivo *in vitro* de *B. capitata* e *B. odorata*, sem nenhum tipo de utilização de substâncias antioxidantes, resultados diferentes ao verificado na testemunha desse trabalho (71,88% de oxidação).

Contrastando com os resultados encontrados nesse trabalho, Melo e outros (2001) trabalhando com garirobeira, identificou menor oxidação (3,37%) na utilização de ácido ascórbico (100mg L⁻¹) em relação a 7,09% verificado para o carvão ativado (1,5%). Em compensação, os mesmos autores também encontraram resultados elevados de oxidação atribuídos ao uso do PVP, sendo os valores de oxidação inferiores aos encontrados nesse trabalho para todas as substâncias antioxidantes em comum testadas.

Os resultados encontrados podem estar atribuídos ao fato de o carvão ativado apresentar cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas, evitando com isso o desencadeamento do processo oxidativo *in vitro* (TEIXEIRA et al., 1993). Em relação ao ácido ascórbico, pode se acrescentar ainda a facilidade no manuseio; o fato de não precipitar quando em repouso, antes de geleificar; maior facilidade para visualizar o embrião zigótico em cultura *in vitro*, e seu consagrado uso como antioxidante em palmeiras (MELO et al., 2001).

Assim como foi verificado para a oxidação os melhores resultados para a germinação e plantas normais, foram verificados com a imersão dos embriões em solução de ácido ascórbico, posterior à retirada dos embriões das sementes (Tabela 3), enquanto que os resultados encontrados para plantas normais foram superiores ao utilizar o carvão ativado ao meio, em comparação, às outras substâncias antioxidantes testadas, embora não tenha havido diferença significativa nesse caso para a germinação (Tabela 2).

TABELA 3. Dados médios da oxidação, germinação e plantas normais, obtidas de embriões de *Butia capitata* com ou sem imersão em solução de ácido ascórbico (100 mg.L⁻¹) durante a retirada dos embriões. Uberlândia, MG, 2012. Uberlândia, MG, 2012.

Ácido Ascórbico	Dados médios (%)		
	Oxidação	Germinação	Plantas Normais
Ausência	66,67 b	66,92 b	59,12 b
Presença	48,95 a	89,06 a	80,21 a
DMS	11,84	10,10	10,58

Na coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey (5%).

Ribeiro e outros (2011), encontraram alongamento cotiledonar em 71,8% dos embriões de *B. capitata*, utilizando condições similares às verificadas nesse experimento, tanto em relação à imersão do embrião quanto na utilização do carvão ativado no meio, possibilitando uma germinação pouco abaixo às verificadas no presente trabalho (88,02% e 89,06%). Além disso, quando se observa a emissão de raiz, verifica-se a presença de 25,2%, valor esse inferior aos encontrados nesse trabalho, onde foi possível a formação de plantas normais (desenvolvimento da arte aérea e raiz) em 85,94% (carvão ativado ao meio) e 80,21% (imersão do embrião), ressaltando que o presente trabalho foi avaliado com 15 dias a mais de desenvolvimento, o que pode ter favorecido a diferença verificada. O carvão ativado possui entre outras características, a propriedade de adsorver e reduzir a disponibilidade de auxina exógena no meio de cultura e induzir o processo de rizogênese (GEORGE, 1996).

Trabalhos têm demonstrado o favorecimento da adição de carvão ativado aos meios de cultura no cultivo *in vitro*. Índice de germinação de 80% foi encontrado com a utilização de 1,5g L⁻¹ de carvão ativado em *Euterpe edulis* (SALDANHA, 2007), sendo a adição de carvão ativado nas concentrações de 0,25 e 0,5 g L⁻¹, no meio de cultura, proporcionou efeito benéfico na germinação dos embriões somáticos obtidos de meristemas apicais de tamareira (ZOUINE et al., 2005). Cavalcante (2001) trabalhando com açazeiro (*Euterpe oleraceae*) utilizou a concentração de 0,2% de carvão ativado, obtendo bons resultados.

O fato de a germinação não ter apresentado diferença significativa, ela promoveu importância relacionada à análise de formação de plantas normais, pois possibilitou demonstrar estatisticamente a superioridade presente na formação das plantas provindas do tratamento composto por carvão ativado, principalmente, em relação ao uso do PVP e testemunha, evento esse verificado visualmente durante as avaliações. Além disso, percebe-se a redução das taxas dentro de um mesmo tratamento quando comparado às características de germinação e plantas normais, alcançando valores de 16,67 e 9,37% encontrados para o PVP e testemunha, ao contrário do visualizado para o carvão ativado e ácido ascórbico (5,28 e 2,21%), substâncias essas que apresentaram maiores médias de plantas normais.

Resultados semelhantes ao desse trabalho foram encontrados por Melo (2000) que demonstrou a eficiência do ácido ascórbico e carvão ativado na germinação de embriões de

garirobeira, apresentando valores médios acima dos verificados para o PVP e meios sem antioxidantes, firmando ainda mais a necessidade de utilização de antioxidantes para palmeiras. Pesquisas realizadas verificaram excelentes resultados em palmeiras, usando-se o ácido ascórbico, embora resultados não muito promissores tenham sido atribuídos ao uso do PVP (GEORGE, 1996).

4 CONCLUSÕES

- A utilização de carvão ativado proporciona resultados de formação de plantas com oxidação inferior e germinação superior aos demais antioxidantes testados;
- A prática de imersão dos embriões em solução de ácido ascórbico contribui para menor oxidação e maior formação de plantas normais.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. A. O. **Resgate *in vitro* de híbridos interespecíficos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*)**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.
- AQUINO, C. F.; LOPES, P. S. N.; MAGALHÃES, H. M.; SILVA, H. P.; NEVES, J. M. G.; Superação da dormência de sementes de coquinho azedo *Butia capitata* (Mart.) Becc. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008. 1 CD-ROM.
- CAVALCANTE, A.S.L. **Respostas morfogenéticas *in vitro* de açazeiro (*Euterpe oleracea* L.) e de cupuçuazeiro (*Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex Spreng) Schum)**. 2001. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.
- CUNHA, I. R. G.; NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; PIMENTA, M. A. S. Cloro na desinfestação de sementes no cultivo *in vitro* de embriões de babaçu (*Attalea vitrivir*). In: FÓRUM DE PESQUISA, ENSINO, EXTENSÃO E GESTÃO, 5, 2011, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros: Unimontes, 2011.
- FERNANDES, R. C. **Estudos propagativos do coquinho azedo (*Butia Capitata* (Mart.) Becc) *Areaceae***. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; LEONHARDT, C.; SCHWARZIV, S. F. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 1150-1153, 2011.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part.2 –In Practice**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa - SPI / Embrapa – CNPH. v.1, 1998, p.183-260.
- GUEDES, R. S. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. 2008. 126 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco. 2008.

- LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 2, p.147-154, 2007
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.
- LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F., FERREIRA, E. **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010, 384 p.
- LUIS, Z.G. **Propagação *in vitro* e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae)**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.
- MARTINS, E. R. **Projeto Conservação de recursos genéticos de espécies frutíferas nativas do norte mineiro: coleta, ecogeografia e etnobotânica**. Montes Claros: UFMG, 2003. (Relatório Institucional).
- MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da Garirobeira [*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.]**. 2000. 117 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitotecnia, Lavras, 2000.
- MELO, B.; PINTO, J. E. B.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, nov./dez., 2001.
- 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.
- MOURA, R. C. **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no Norte de Minas Gerais**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Riverside, USA, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação *in vitro* de embriões de coquinho azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae)] obtidos de frutos com diferentes graus de maturação. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v.7, n.1, p. 47-54, 2011.

RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. C.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n.2, p. 133-139, 2011.

SALDANHA, C. W. O. **Conservação *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius através da embriogênese somática**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Geomática) - Universidade Federal de Santa, Santa Maria, 2007.

SILVA, P. A. D. **Ecologia populacional e botânica de *Butia capitata* (Mart.) Beccari no cerrado no Norte de Minas Gerais**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília (Instituto de Ciências Biológicas), Brasília, 2008.

SOARES J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; NUNES, C. F.; ARAUJO, A. G. Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, p. 773-778, 2011.

TABAI SA. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges através de métodos *in vitro***. 1992. 121 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

TEIXEIRA, J.B.; SÖNDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 227-233, 1993.

ZOUINE, J.; EL BELLAJ, M.; MEDDICH, A.; VERDEIL, J-L. e EL HADRAMI, I. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Montpellier, France v. 82, p. 83 – 92, 2005.

CAPÍTULO 4

RESUMO

CARNEIRO, P. A. P. **BAP e ANA no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de coquinho azedo cultivados.** 2012 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fruticultura) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Em micropropagação de fruteiras nativas do cerrado, os reguladores de crescimento podem ganhar uma importância ainda maior, visto que essas espécies muitas vezes necessitam de estímulos especiais, gerados por tais compostos, para a sua adaptação e crescimento *in vitro*, constituindo-se em uma etapa a ser estudada, uma vez que a interação entre auxinas e citocininas é frequentemente dependente da espécie e do tipo de tecido utilizado na cultura. Objetivou-se com esse trabalho identificar as respostas da espécie *Butia capitata* a presença de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) no meio nutritivo. O experimento foi conduzido em Uberlândia-MG e os frutos de coquinho azedo foram coletados na região de Montes Claros – MG, sendo as sementes extraídas e imersas, em solução de cloro (0,12%) durante 10 minutos. O experimento foi montado em esquema fatorial 4x4, e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 16 tratamentos, 3 repetições e 2 parcelas, sendo cada parcela constituída por um frasco contendo um explante por tubo. Os tratamentos foram caracterizados pela combinação de 4 dosagens de BAP (0; 0,96; 1,92 e 3,84) com 4 dosagens de ANA (0; 0,24; 0,48 e 0,96), sendo, assim, adicionados ao meio MS com 75% de força iônica. As plantas repicadas haviam sido inoculadas há 4 meses, eliminando as plantas que de alguma maneira apresentavam algum tipo de contaminação ou anormalidades em seu desenvolvimento ou no meio. Após 110 dias, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas; comprimento da folha principal (cm); comprimento da raiz principal; massa seca da parte aérea e da raiz. Não houve interação significativa entre as dosagens de ANA e BAP para nenhuma das características avaliadas. Maior comprimento de folha foi obtido utilizando 0,47 mg L⁻¹ de ANA.

Palavras-chave: *Butia capitata*, 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA).

ABSTRACT

CARNEIRO, P. A. P. BAP and NAA on *in vitro* development of *Butia capitata* (Martius) Becc. plantlets. 2012. 76 f. Dissertation (Master degree in Agriculture) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

The use of growth regulators in micropropagation of native savannah fruit trees has great importance, since these species often need special stimuli, produced by such compounds, for their adaptation and *in vitro* growth, thus consisting in a step to be studied, since the interaction between auxins and cytokinins is frequently dependent of the species and of the type of plant tissue used in the culture. The responses of *Butia capitata* to the presence of different concentrations of 6-benzilaminopurine (BAP) and naphthalene acetic acid (NAA) in the growth medium were evaluated. The experiment was conducted in Uberlândia-MG and the fruits of *Butia capitata* (Mart) Becc. were collected in the region of Montes Claros-MG. The seeds were removed and immersed in chlorine (0.12%) solution for 10 minutes. The experiment was done as 4 x 4 in factorial and the experimental design used was completely randomized, with 16 treatments, 3 replicates and 2 plots, each plot consisted of a flask containing one explant. The treatments were characterized by the combination of 4 doses of BAP (0, 0.96, 1.92 or 3.84 mg L⁻¹), and 4 doses of NAA (0, 0.24, 0.48 or 0.96 mg L⁻¹), added to the medium MS at 75% of ionic strength. The transplanted plants used had been inoculated into the growth medium 4 months earlier, and those that presented any contamination or abnormality were discarded. The following characteristics were evaluated after 110 days: number of leaves, length of the principal leaf (cm); length of the principal root; shoot and root dry matter. There was no significant interaction between the dosages of NAA and BAP for any of the evaluated characteristics. Greater leaf length was obtained using NAA at 0.47 mg L⁻¹.

Key words: *Butia capitata*, 6-benzilaminopurine (BAP), naphthalene acetic acid (NAA).

1 INTRODUÇÃO

O coquinho azedo (*Butia capitata*) é uma palmeira nativa do cerrado que vem despertando interesse em regiões como o Norte de Minas Gerais em função da grande ocorrência e uso de seus frutos em diversas condições, podendo citar o uso para o preparo de sucos, sorvetes, picolés (LORENZI et al., 2010; SILVA 2008), possibilitando complementação de renda de diversas famílias presentes nessa região através da venda de seus produtos pelo extrativismo.

Em função dos usos atribuídos a essa palmeira, tem se verificado a retirada de seus frutos em grande escala das áreas de ocorrência natural, gerando um extrativismo predatório em função dos preços ofertados pelo produto que juntamente com a diminuição das áreas de cerrado e germinação baixa, lenta e desuniforme (AQUINO et al. 2008; FERNANDES, 2008; MOURA, 2008), pode estar contribuindo para a diminuição da oferta do produto futuramente, além do risco de extinção, ressaltando a dificuldade de se encontrar indivíduos jovens na vegetação (MARTINS, 2003).

Pensando em sistemas agroflorestais de cultivo, preservação e colheita de forma adequada e implantação de pomares produtivos, para fornecimento da quantidade de frutos demandados, verifica-se inicialmente a necessidade de domínio das técnicas de propagação de *B. capitata*. Alguns estudos têm sido dedicados ao entendimento da dormência e superação, através de tratamentos pré-germinativos das sementes dessa espécie (AQUINO et al. 2008; FERNANDES, 2008; MOURA, 2008). No entanto, o cultivo *in vitro* proporcionou até o momento resultados interessantes de alongamento do embrião dessa palmeira, alcançando valores de até 71,8% (Ribeiro et al., 2011) e germinação média de 90% (FIOR et al., 2011).

Na micropropagação de fruteiras nativas do cerrado, os reguladores de crescimento podem ganhar uma importância ainda maior, visto que essas espécies muitas vezes necessitam de estímulos especiais, gerados por tais compostos, para a sua adaptação e crescimento *in vitro* (PINHAL et al., 2011). Assim, constituindo-se em uma etapa a ser estudada, uma vez que a interação entre auxinas e citocininas é frequentemente dependente da espécie e do tipo de tecido utilizado na cultura (COENEN; LOMAX, 1997; PIERIK, 1997).

Trabalhos testando diferentes tipos e concentrações de citocininas e auxinas estão presentes na literatura, principalmente, verificando a formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos, fator esse, regulado pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (SKOOG & MILLER, 1957). Costa e Aloufa (2006) verificaram que as concentrações de reguladores vegetais avaliadas não proporcionaram a formação de brotos de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.), mas mostraram-se eficientes na diferenciação da parte aérea e raízes, com destaque para os meios de cultura MS sem suplementação de reguladores e MS + 1,0 mg L⁻¹ de BAP + 1,0 mg L⁻¹ de IAA. Apesar disso, trabalhando com outro explante, Costa e Aloufa (2007) observaram efeito negativo da adição dos reguladores IAA e BAP na cultura *in vitro* de embrião zigótico de tamareira, exceto, para o número de folhas.

Melo e outros (2001) verificou que o BAP (0; 4,43 e 13,31 μM) e TDZ (0; 2,27 e 11,35 μM) nas concentrações testadas não induziram a brotação lateral em garirobeira e à medida que aumentaram suas concentrações, reduziram os valores de algumas características avaliadas. Já utilizando auxinas em plantas podadas de garirobeira, estes autores verificaram que o ANA foi eficiente na promoção de raízes fasciculadas, enquanto que AIB não foi, além disso, verificou maior produção de matéria seca da parte aérea e da raiz e maior comprimento de raiz fasciculada do que o AIB.

Apesar de haver um número considerável de trabalhos testando o balanço entre auxinas e citocininas, verifica-se a inexistência de trabalhos com a palmeira *B. Capitata*. Assim, objetivou-se com esse trabalho identificar as respostas da espécie *B. capitata* a presença de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) no meio nutritivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Frutos de coquinho azedo foram coletados, na região de Montes Claros – MG, em estágio de completa maturação, com polpa firme e sem sinais de ataque de pragas ou microorganismos foram despulpados manualmente e mantidos em ambiente sombreado. As sementes foram extraídas com o auxílio de um torno manual de bancada e, posteriormente, imersas em solução de cloro (0,12%) durante 10 minutos.

O experimento foi montado em esquema fatorial 4x4, e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 16 tratamentos, 3 repetições e 48 parcelas, contendo um explante por frasco. Os tratamentos foram caracterizados pela combinação de 4 concentrações de BAP (0; 0,96; 1,92 e 3,84 mg L⁻¹) com 4 concentrações de ANA (0; 0,24; 0,48 e 0,96 mg L⁻¹), sendo assim adicionados ao meio MS (MURASHIGUE E SKOOG, 1962) com 75% de força iônica (Ribeiro et al., 2011), acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina; 1mg L⁻¹ de piridoxina; 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol; 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada e 7 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,7 (TABAI, 1992).

Os frascos de 500 mL foram completados com 30 mL do meio referente a cada tratamento, fechados com a tampa plástica e submetido à autoclavagem, a uma temperatura de 121°C, pelo período de 20 minutos, a uma pressão de 1 atm.

As plantas utilizadas haviam sido inoculadas há 4 meses, permanecendo em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±1 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 25µmol m⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria. Foi efetuada uma seleção das plantas, eliminando as que, de alguma maneira, apresentavam algum tipo de contaminação ou anormalidades em seu desenvolvimento ou no meio e realizada a retirada das mesmas com o auxílio de uma pinça, efetuando um corte das folhas na região acima do hipocótilo, com um bisturi, sendo então transferidas para o novo meio. Todos esses procedimentos foram realizados na câmara de fluxo laminar devidamente descontaminada, através do uso de luz UV e aplicações de álcool (70%), sendo ao final, os frascos colocados em sala de crescimento.

Após 110 dias, foram avaliadas as seguintes características: número de folhas; comprimento da folha principal (cm), aferindo através de uma régua da inserção da bainha até o final; comprimento da raiz principal, medindo o segmento que vai do início ao fim da raiz; massa seca da parte aérea e da raiz (g), mensurados, através de balança de precisão digital após lavagem cuidadosa, separação das partes e secagem até peso constante em estufa de circulação forçada.

A análise de variância foi realizada, através do programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000) e, quando necessária, realizada a análise de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância (tabela 1) demonstrou que não houve interação significativa entre as concentrações de ANA e BAP para nenhuma das características avaliadas, proporcionando, assim, a análise separada de cada um dos fatores. Em relação ao ANA, apenas o comprimento da folha apresentou resposta em função das diferentes concentrações testadas, enquanto que para o BAP essa resposta ocorreu tanto para o comprimento da raiz, quanto para a massa seca da parte aérea.

TABELA 1. Resumo da análise de variância para o número de folhas, comprimento da folha principal, comprimento da raiz principal, massa seca da parte aérea e da raiz de plantas de *Butia capitata* cultivadas em diferentes combinações de ANA e BAP acrescidos ao meio MS 75%. Uberlândia, MG, 2012.

Quadrados Médios						
Fontes de Variação	GL	Nº Folhas	Comprimento	Comprimento	MSPA	MSRA
			Folha	Raiz		
BAP	3	0,1302	5,8301	13,9371**	359,8140*	374,8113
ANA	3	0,2274	45,0218**	2,5731	288,2436	322,5186
BAP*ANA	9	0,3524	13,5498	2,7417	199,2970	118,6114
Resíduo	32	0,1979	8,8361	2,0487	104,9225	182,0571
CV (%)		26,86	33,23	59,99	40,97	122,06

**Dados significativos ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Para o comprimento de folhas (Figura 1), a aplicação de diferentes concentrações de ANA ao meio de cultivo permitiu estimar o valor de 0,47 mg L⁻¹ de ANA como a concentração, que proporcionou o maior comprimento dentre o intervalo testado, indicando um acréscimo de 41,68% comparado a não-utilização do regulador de crescimento. Trabalhando com garirobeira Melo e outros (2001) verificaram efeito positivo na presença de ANA na produção de matéria seca da parte aérea e da raiz e maior comprimento de raiz fasciculada. Resultados semelhantes foram apresentados por Ledo e outros (2001) que

verificaram o melhor desenvolvimento da parte aérea de *Euterpe oleraceae* na presença desse regulador de crescimento.

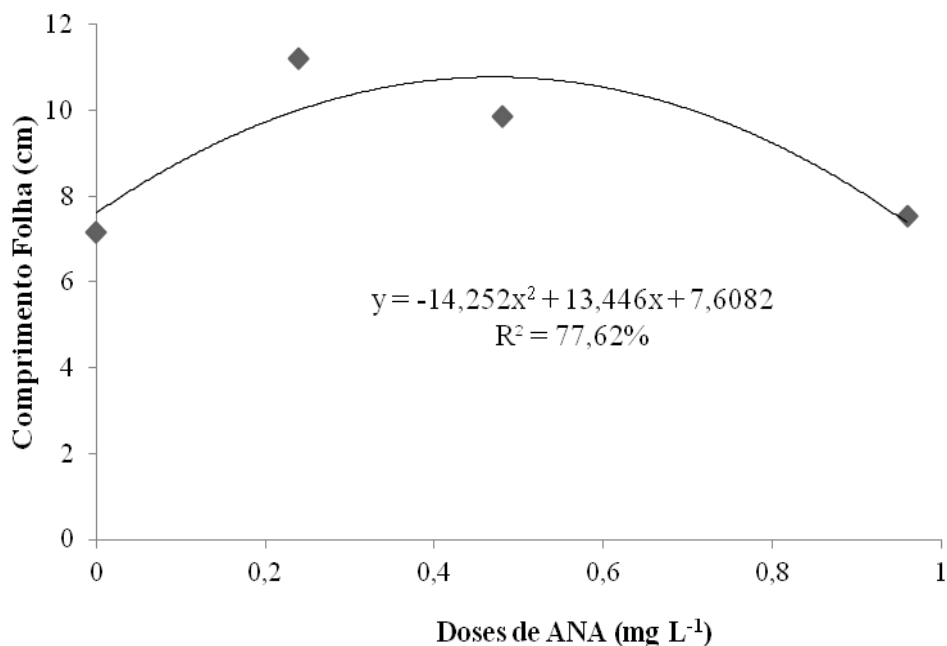


FIGURA 1. Comprimento da folha principal de plantas de *Butia capitata* em função de diferentes concentrações de ANA acrescidos ao meio MS 75% . Uberlândia-MG, 2012.

O BAP apresentou efeito significativo para as características comprimento de raiz e massa seca de parte aérea. Apesar disso, os dados não se ajustaram em equações, não possibilitando estimar valores e determinar a melhor dosagem a ser utilizada. Melo e outros (2001) verificou que o BAP e TDZ (thidiazuron) não induziram a brotação lateral em garirobeira e à medida que aumentaram suas concentrações, reduziram-se os valores de algumas características avaliadas. No presente trabalho o mesmo fato ocorreu, não sendo possível verificar brotações laterais e formação de calos durante a avaliação, sendo os mesmos resultados também verificados por Costa e Aloufa (2006) em tamareira (*Phoenix dactylifera* L.). Apesar disso, o BAP está associado à formação de grande número de brotações (CALDAS et al, 1998) sendo esses resultados encontrados por Almeida (1994) em *Bactris gassipaes*, na associação ANA e BAP.

Não houve diferença significativa para o número de folhas e massa seca de raiz para nenhum dos reguladores de crescimento testados, ressaltando que quase a totalidade das plantas apresentaram a formação de duas folhas, sendo que apenas 7,3% das plantas do experimento possibilitaram a formação da terceira folha. Esse resultado pode ser relacionado ao fato de que algumas plantas são capazes de sintetizar as quantidades que necessitam de auxina e/ou citocinina (CALDAS et al, 1998), dessa maneira, não sendo dependentes do acréscimo de reguladores externos, embora tenha sido demonstrado resposta para outras características. Além disso, a auxina possui o propósito de estimular a iniciação radicular, embora a mesma concentração possa exercer ação inibitória no posterior alongamento das raízes (CASTRO et al., 2005; KERBAUY, 2004).

Costa e Aloufa (2007) encontraram efeito negativo da adição dos reguladores AIA e BAP na cultura *in vitro* de embrião zigótico de tamareira, exceto, para o número de folhas, ressaltando ainda a formação de plantas anormais para todos os tratamentos com exceção da testemunha, fator esse não visualizado no presente trabalho. Em relação à massa seca de raiz, a falta de significância entre os resultados pode estar relacionada também ao elevado coeficiente de variação verificado na tabela 1, o que proporcionou respostas muito diferentes dentro dos próprios tratamentos e que pode estar integrado ao fator verificado para o comprimento da raiz.

Silva (2002), trabalhando com coqueiro (*Cocos nucifera* L) obteve plantas adultas em dois meses e meio, utilizando meio MS completo só que com uma concentração menor de reguladores de crescimento que foi $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e BAP. Resultados encontrados por Costa e Aloufa (2006) verificaram a eficiência na diferenciação da parte aérea e raízes, com destaque para os meios de cultura MS, sem suplementação de reguladores e MS + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA. Cada espécie responde de uma determinada maneira à aplicação de um regulador de crescimento e os diferentes tipos de auxinas e citocininas dão respostas diferentes para a mesma espécie (CALDAS et al., 1998).

Novos testes necessitam ser realizados com a utilização de ANA e BAP para a *B. capitata*, indicando além de testar outras concentrações, utilizar a incorporação dos reguladores de crescimento no meio de cultura inicial, observando o desenvolvimento e respostas do embrião ao mesmo, dispensando a necessidade de novo subcultivo como realizado nesse experimento, diminuindo assim custos e tempo na sua propagação. Outro

fator indicado é a utilização de concentrações menores ou até mesmo a exclusão do carvão ativado do meio de cultivo quando realizado o subcultivo, ressaltando que o mesmo pode absorver outras substâncias do meio nutritivo como, por exemplo, os reguladores de crescimento, acarretando efeitos indesejáveis ao cultivo *in vitro* (TEIXEIRA et al, 1993).

4 CONCLUSÃO

Maior comprimento de folha foi obtido utilizando $0,47 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. **Emprego da Cultura “*in vitro*” para multiplicação vegetativa em pupunha (*Bactris gassipae* H. B. K. *Palmae*. 1994. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.**
- AQUINO, C. F.; LOPES, P. S. N.; MAGALHÃES, H. M.; SILVA, H. P.; NEVES, J. M. G.; Superação da dormência de sementes de coquinho azedo *Butia capitata* (Mart.) Becc. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008. 1 CD-ROM.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília - DF: Embrapa, 1998. v.1. 509 p.
- CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; PERES, L. E. P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2005.
- COENEN, C.; LOMAX, T. L. Auxin-cytokinin Interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, Germany, v.2, n.9, p.351-356, 1997.
- COSTA, N. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.38, n.3, p.276-279, 2007.
- COSTA, N. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* l. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 195-198, 2006.
- FERNANDES, R. C. **Estudos propagativos do coquinho azedo (*Butia Capitata* (Mart.) Becc) *Arecaceae*. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.**
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 2004. 452p.
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.468-472, 2001.
- LORENZI, H; NOBLICK, L. R.; KAHN, F; FERREIRA, E. **Flora Brasileira Lorenzi: *Arecaceae* (Palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. 384p.

- MARTINS, E. R. **Projeto Conservação de recursos genéticos de espécies frutíferas nativas do Norte Mineiro: coleta, ecogeografia e etnobotânica.** Montes Claros: UFMG, 2003. (Relatório Institucional).
- MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da Garirobeira [*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.].** 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- MELO, B.; PINTO, J. E. B.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, nov./dez., 2001.
- MOURA, R. C. **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no norte de Minas Gerais.** 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Riverside, USA, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higherplan ts.** 4.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.
- PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.7, p.1136-1142, 2011.
- RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. C.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n.2, p. 133-139, 2011.
- SILVA, P. A. D. **Ecologia populacional e botânica de *Butia capitata* (Mart.) Beccari no cerrado no Norte de Minas Gerais.** 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.
- SILVA, V.S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), Piracicaba, 2002.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Simposium of Society for Experimental Biology**, v.11, p. 118-131, 1957.
- TABAI AS. **Propagação da palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddiges através de métodos *in vitro*.** 1992. 121 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1992.

TEIXEIRA, J.B.; SÖNDAHL, M.R.; KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.34, p.227-233,1993.