

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO *CAMPUS* RIO VERDE – GO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CULTIVO IN *VITRO* DE EMBRIÕES DE BABAÇU
(*Orbignya oleifera* Burret.)

Autora: Mariluzza Silva Leite
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

Rio Verde – GO
Fevereiro – 2012

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE BABAÇU
(*Orbignya oleifera* Burret.)

Autora: Mariluzia Silva Leite
Orientador: Fabiano Guimarães Silva

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - *Campus* Rio Verde – Área de concentração Ciências Agrárias.

Rio Verde – GO
Fevereiro – 2012

L55c

LEITE, Mariluzia Silva.

Cultivo *in vitro* de embriões de Babaçu (*Orbignya Oleifera* Burret.) / Mariluzia Silva Leite – Rio Verde – 2012.

71 f.: il.;

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) apresentada ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - GO - 2012.

1. Cultura de Tecidos2. Germinação *in vitro*3. Embriões zogóticos4. Fotoautotrofismo
Gilmar José Terra. CRB1 2524

CDU 633.855.34

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE BABAÇU.

Autora: Mariluzza Silva Leite
Orientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias – Área de concentração
Ciências Agrárias – Ciências Agrárias

APROVADA em 23 de fevereiro de 2012.

Prof^a. Dra. Flávia Dionísio Pereira
Avaliadora externa
Bolsista PNPd - COMIGO

Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz
Avaliador externo
UFU

Prof^a. Dra. Alessandra Cristina
Boffino de Almeida M. Hara
Avaliadora interna
IFGoiano/RV

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva
Presidente da banca
IFGoiano/RV

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar comigo em todos os instantes, por ser o motivo de minha existência.

Ao professor Dr. Fabiano Guimarães Silva, pela orientação concedida.

À Dra. Flávia Dionísio Pereira e Dra. Alessandra Cristina Boffino de Almeida Monteiro-Hara, que tanto colaboraram sendo minhas orientadoras.

À minha amiga Paula Sperotto Alberto, pelo companheirismo e dedicação ao nosso trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Cultura e Tecidos Vegetais do Cerrado, pelos ensinamentos e convivência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Ao meu avaliador Dr. José Magno Queiroz Luz, que não mediu esforços para contribuir e enriquecer o nosso trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, para realização desta Dissertação de Mestrado.

À minha família, em especial ao meu marido Weber Vinícius Moreira Leite, pelo companheirismo, amizade, aos meus filhos, por compreenderem momentos de ausência.

Aos colegas do curso de Mestrado: Cintia Martendal, Layara Bessa, Moacir Ribeiro, Paulo Dorneles, Sueisla Lopes, Fátima Marques, Karen Proto, Gilberto Macedo, Márcio Rosa, pela amizade.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Mariluzza Silva Leite, filha de Ubaldo Teodoro da Silva e Aldaci Santana da Silva, nasceu em Piranhas, Estado de Goiás, em 22 de novembro de 1974.

É casada com Weber Vinícius Moreira Leite e tem dois filhos, Douglas Vinícius Moreira Leite Silva e Phyllipe Augusto Leite Silva.

Em 1998, recebeu grau de Licenciatura em Ciências Biológicas, conferido pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Em 2004, concluiu a especialização em Tópicos em Genética Moderna pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Em 2010, iniciou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pelo Instituto Federal Goiano, *Campus* Rio Verde-GO.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1. O Cerrado Brasileiro.....	01
2. Caracterização Botânica de <i>Orbignya oleifera</i> (Burret).....	02
3. Propagação por sementes.....	05
4. Propagação <i>in vitro</i>	05
5. Meios Nutritivos.....	06
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	07
OBJETIVO GERAL.....	10
CAPÍTULO 1. GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE BABAÇU: INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO EM EMBRIÕES ZIGÓTICOS.....	11
Resumo.....	11
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Material e Métodos.....	14
Resultados e Discussão.....	17
Conclusão.....	28

Referências Bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 2. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE BABAÇU SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CARVÃO ATIVADO.....	32
Resumo.....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	35
Resultados e Discussão.....	37
Conclusão.....	43
Referências Bibliográficas.....	43
CAPÍTULO 3. DIFERENTES TIPOS DE VEDAÇÕES NA PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE BABAÇU.....	45
Resumo.....	45
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	48
Resultados e Discussão.....	49
Conclusão.....	52
Referências Bibliográficas.....	52
CONCLUSÕES GERAIS.....	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Porcentagem de germinação, formação de pecíolo cotiledonar, raiz e calos, avaliados aos 120 dias de cultivo em embriões zigóticos de babaçu (<i>Orbignya oleifera</i> Burret.), com diferentes interações de NAA e KIN. Rio Verde-GO, 2012.....	20
Tabela 2. Comprimento médio das plântulas, avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo, formação de pecíolo cotiledonar, raiz e calos, avaliados aos 120 dias de cultivo em embriões zigóticos de babaçu (<i>Orbignya oleifera</i> Burret.), cultivados <i>in vitro</i> com diferentes interações de NAA e KIN, suplementado com 1µM de BAP. Rio Verde – GO, 2012.....	23
Tabela 3. Comprimento médio das plântulas, avaliados aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, porcentagem de pecíolo cotiledonar, oxidação e formação de calos, avaliados aos 120 dias de cultivo em embriões zigóticos de babaçu (<i>Orbignya oleifera</i> Burret.), cultivados <i>in vitro</i> com diferentes interações de NAA e KIN, suplementado com 2µM de BAP. Rio Verde – GO, 2012.....	26
Tabela 1. Índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento médio de plântulas, avaliado aos 30 e 120 de cultivos e formação de raízes aos 120 dias de cultivo, em embriões zigóticos de babaçu (<i>Orbignya oleifera</i> Burret.), com diferentes tipos de vedação. Rio Verde- GO, 2012.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Características morfológicas de babaçu (<i>Orbignya oleifera</i> Burret.), fazenda Santa Bárbara, município de Piranhas GO (A); frutos inseridos nos cachos (B), corte transversal do fruto de babaçu (C). Foto: Mariluz S. Leite, 2012. Rio Verde – GO.....</p>	04
<p>Figura 1. Destaque da planta matriz de <i>Orbignya oleifera</i> Burret., fazenda Santa Bárbara, município de Piranhas GO (A); prensa hidráulica utilizada para extrair as sementes (B); fruto do babaçu em corte transversal (C); sementes (D) e os embriões zigóticos de babaçu (E). Ep: Epicarpo; Me: Mesocarpo e En: Endocarpo. Escala: 2 cm. Foto: Mariluz S. Leite. Rio Verde - GO, 2012.....</p>	15
<p>Figura 2. Semente de <i>Orbignya oleifera</i> Burret., inteira e em corte transversal (A); embrião zigótico (B); embrião germinado (C). (Barra igual a 1,0 cm de comprimento). em: embrião; tg: tegumento; en: endosperma; op: opérculo; pc: pecíolo; ha: haustório. Foto: Mariluz S. Leite. Rio Verde – GO, 2012.....</p>	18
<p>Figura 3. Germinação e crescimento <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de babaçu (<i>Orbignya oleifera</i> Burret.) cultivados por 120 dias em meio 50% MS suplementado com diferentes concentrações de NAA e KIN: A) T1: ANA (0 μM) e KIN (0 μM); B) T2: ANA (0 μM) e KIN (1 μM); C) T3: ANA (0 μM) e KIN (2 μM); D) T4: ANA (1 μM) e KIN (0 μM); E) T5: ANA (1 μM) e KIN (1 μM); F) T6: ANA (1 μM) e KIN (2 μM); G) T7: ANA (2 μM) e KIN (0 μM); H) T8: ANA (2 μM) e KIN (1 μM) e I) T9: ANA (2 μM) e KIN (2 μM). Parte aérea (P.A); Pecíolo cotiledonar (P.C); Raiz (Ra); Múltiplas raízes (M.R).</p>	21
<p>Figura 4. Germinação e crescimento <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de babaçu (<i>Orbignya oleifera</i> Burret.) cultivados por 120 dias em meio 50% MS, suplementado com 1 μM de BAP e diferentes interações ANA e KIN; A) T1: BAP (1 μM), ANA (0 μM) e KIN (0 μM); B) T2: BAP (1 μM), ANA (0 μM) e KIN (1 μM); C) T3: BAP (1 μM), ANA (0 μM) e KIN (2 μM); D) T4: BAP (1 μM), ANA (1 μM) e KIN (0 μM); E) T5: BAP (1 μM), ANA (1 μM) e KIN (1 μM); F) T6: BAP (1 μM), ANA (1 μM) e KIN (2 μM); G) T7: BAP (1 μM)</p>	

ANA (2 μ M) e KIN (0 μ M); H) **T8**: BAP (1 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (1 μ M) e I) **T9**: BAP (1 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (2 μ M). Parte aérea (P.A); Pecíolo cotiledonar (P.C); Raiz (Ra); Múltiplas raízes (M.R.)..... 24

Figura 5. Germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) cultivados por 120 dias em meio 50% MS, suplementado com 2 μ M de BAP; A) **T1**: BAP (2 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (0 μ M); B) **T2**: BAP (2 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (1 μ M); C) **T3**: BAP (2 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (2 μ M); D) **T4**: BAP (2 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (0 μ M); E) **T5**: BAP (2 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (1 μ M); F) **T6**: BAP (2 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (2 μ M); G) **T7**: BAP (2 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (0 μ M); H) **T8**: BAP (2 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (1 μ M) e I) **T9**: BAP (2 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (2 μ M). Parte aérea (P.A); Pecíolo cotiledonar (P.C); Calogênese (Ca)..... 27

Figura 1. Frutos maduros de *Orbignya oleifera* (Burret.) (A); prensa hidráulica utilizada para extrair as sementes (B); fruto do babaçu em corte transversal e em corte longitudinal (C); embriões zigóticos de babaçu (D). (Ep: epicarpo; Me: mesocarpo; En: endocarpo e amêndoas) Foto: Mariluz S. Leite. Rio Verde- GO, 2012..... 35

Figura 2. Sementes de *Orbignya oleifera* Burret, inteira e em corte transversal (A), embrião zigótico (B), processo de embebição e crescimento do pecíolo cotiledonar (C) (Barra igual a 1,5 cm de comprimento).**em**: embrião; **en**: endosperma; **pc**: pecíolo cotiledonar; **ha**: haustório. Foto: Mariluz S. Leite. Rio Verde-GO, 2012..... 37

Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado no índice de velocidade de germinação (IVG) (A), e formação de parte aérea (B), em embriões zigóticos de babaçu, avaliados aos 120 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012..... 38

Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado no comprimento médio de plântulas de babaçu, avaliado aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012..... 39

Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado na formação de pecíolo cotiledonar (A); na formação de raiz (B), provenientes de embriões zigóticos de babaçu, avaliados aos 120 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012..... 40

Figura 6. Cultivo *in vitro* de embriões de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) em diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado, avaliados aos 120 dias de cultivo; A) T1: carvão ativado (0 g.L-1) e sacarose (0 g.L-1) ; B) T2: carvão ativado (2 g.L-1) e sacarose (0 g.L-1); C) T3: carvão ativado (0 g.L-1) e sacarose (15 g.L-1); D) T4: carvão ativado (2 g.L-1) e sacarose (15 g.L-1); E) T5: carvão ativado (0 g.L-1) e sacarose (30 g.L-1); F) T6: carvão ativado (2 g.L-1) e sacarose (30 g.L-1); G) T7: carvão ativado (0 g.L-1) e sacarose (45 g.L-1); H) T8: carvão ativado (2 g.L-1) e sacarose (45 g.L-1); I) T9: carvão ativado (0 g.L-1) e sacarose (60 g.L-1); J) T10: carvão ativado (2 g.L-1) e sacarose (60 g.L-1). Embriões germinados sem desenvolvimento (Em); parte aérea (P.A); pecíolo cotiledonar (P.C.); raiz (Ra). Rio Verde – GO, 2012..... 41

Figura 1. Cultivo *in vitro* de *Orbignya oleifera* (Burret.), 120 dias em meio 50% MS, com diferentes tipos de vedação. T1: Tampão de algodão (A); T2: tampa plástica sem PVC (B); T3: película de PVC (C) e T4: tampa plástica com PVC (D). P.A: parte aérea; P.C: pecíolo cotiledonar e Ra: raiz. Rio Verde- GO, 2012. Foto: Mariluz Silva Leite..... 50

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACIONES E UNIDADES

AIA.....	Ácido indol 3 acético
AIB.....	Ácido indolil 3 butílico
ANA.....	Ácido naftalenoacético
BAP.....	Benzilaminopurina
DIC.....	Delineamento inteiramente casualizado
IVG.....	Índice de velocidade de germinação
KIN.....	Cinetina (6- furfurilaminopurina)
MS.....	Murashige & Skoog
NaO Cl.....	Hipoclorito de sódio
pH.....	Potencial de hidrogênio
TDZ.....	Tidiazuron
WPM.....	Lloyd & McCown
2,4-D.....	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
μmol.....	Micromol

RESUMO

O babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é uma palmeira oleaginosa, que tem despertado interesse econômico para a produção de biocombustível. A principal forma de propagação dessa espécie é via sexuada. A inconveniência deste tipo de propagação é que além da demora e o longo período para germinação e o lento crescimento, as plantas desenvolvidas por este processo possuem alta variabilidade por se tratar de um tipo gâmico de multiplicação. Por esse motivo, a contribuição das técnicas de cultura de tecidos é de grande importância, pois permitem acelerar sua propagação de forma vegetativa. Foram realizados diferentes ensaios, sendo avaliados: o efeito dos reguladores NAA, BAP e KIN na germinação e no crescimento *in vitro* de embriões zigóticos; diferentes concentrações de sacarose, carvão ativado e os diferentes tipos de vedações para o cultivo *in vitro* dos embriões zigóticos. Verificou-se que o estabelecimento, a germinação e o crescimento de plântulas de babaçu, onde os melhores resultados para formação do pecíolo cotiledonar e o comprimento médio de plântulas foram obtidos com a utilização de 1 μM de BAP no meio de cultivo, e a formação de raízes foi favorecida pela adição de 2 μM de NAA. Observou-se que, na ausência de sacarose os embriões germinaram em razão das reservas nutricionais dos cotilédones, porém não foram suficientes para promover o crescimento de plântulas. A utilização de 15 g.L^{-1} sacarose no meio de cultivo, na ausência de carvão ativado, promoveu as melhores médias para formação da parte aérea e enraizamento de plântulas de babaçu. O uso de tampão de algodão favoreceu o crescimento *in vitro* de plântulas de babaçu.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, germinação *in vitro*, embriões zigóticos, fotoautotrofismo.

ABSTRACT

Babassu (*Orbignya oleifera* Burret.) is an oilseed palm which has aroused economic interest for biofuel production. Sexual spread is the main way to propagate this specie. In this propagation the germination is slow and spends long time to be complete and the growth seedling is slow. Moreover, plants developed by this process have high variability because of their gametic multiplication. Therefore, tissue culture techniques are important to accelerate its spread by vegetative form. Different assays were carried out and evaluated: effect of different growth regulators (NAA, BAP and KIN) on germination and *in vitro* growth of zygotic embryos; sucrose concentrations, activated charcoal and different types of caps to *in vitro* culture of zygotic embryos. It was observed the establishment, germination and seedling growth of babassu in which the best results for formation of cotyledonary petiole and length of seedling were verified with 1 μM BAP, while 2 μM NAA promoted better roots formation. In the sucrose absence was observed that embryos germinated because of nutritional reserve of the cotyledons, but were insufficient to promote seedlings growth. Culture medium containing 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose without activated charcoal promoted the best development of shoots and roots. The cotton plug favored *in vitro* growth of babassu seedling.

Keywords: Tissue culture, *in vitro* germination, zygotic embryos, photoautotrophic.

INTRODUÇÃO GERAL

1-O Cerrado Brasileiro

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, foi incluído na lista dos “*hotspots*” (ambiente quente). Por um lado, a inclusão do bioma cerrado nesta lista tem um ponto positivo, significa o reconhecimento em nível mundial de sua rica biodiversidade. Por outro lado, sua inclusão também mostra que ele está sendo considerado um ambiente bastante ameaçado e que a sobrevivência de suas espécies depende de sua conservação e preservação (SILVA e BATES, 2002).

A grande heterogeneidade de paisagens, característico do cerrado, abriga uma importante diversidade florística (RATTER et al., 2000), com um significativo número de espécies de plantas endêmicas (GIULIETTI et al., 2000).

De modo geral, o bioma cerrado se encontra ameaçado. Espécies nativas importantes estão desaparecendo em função da ocupação desordenada, pela expansão agropecuária e urbana, da exploração irracional e do uso indiscriminado do fogo. Os distúrbios na vegetação do cerrado têm ocorrido em vastas áreas. Menos de 3% de sua superfície está protegida em Unidades de Conservação e mais de 60% da região já foi modificada pela ocupação antrópica, ou seja, por lavouras, pastagens e ocupação urbana (BRASIL et al., 1999; CAVALCANTI, 2000).

A crescente preocupação ambiental relacionada às mudanças climáticas globais e a busca por alternativas que reduzam as emissões de gases causadores do efeito estufa intensificaram as ações internacionais voltadas ao desenvolvimento de programas de substituição dos combustíveis fósseis por combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis, como o biodiesel. No Brasil, o lançamento do Plano Nacional de Agroenergia, em 2006, e a consolidação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) estabeleceram um marco para as ações públicas e privadas de geração

de conhecimento e tecnologias que contribuam para a produção sustentável da agricultura de energia no país (SOUZA et al., 2009).

O Brasil é detentor de potencial para assumir a liderança na produção de biocombustíveis, tendo em vista que possui vantagens comparativas como a disponibilidade de terras agricultáveis e recursos hídricos, que associadas às excelentes condições edafoclimáticas, são propícias ao cultivo de oleaginosas. Pioneiro na produção de biocombustíveis, com a criação do PROÁLCOOL, considerado um dos maiores programas de uso da energia renovável do mundo, o Brasil possui capacidade científica e laboratorial, além de competência tecnológica para desenvolver e promover a utilização de novos combustíveis alternativos. O incentivo ao biodiesel irá estimular o desenvolvimento geral do país, acelerar o mercado interno, economizar divisas e poderá ser responsável pela geração de muitos empreendimentos, incluindo pequenos agricultores, o que o torna um dos maiores instrumentos de inclusão social (SUAREZ et al., 2009).

As plantas oleaginosas vêm merecendo destaque, pela sua grande oportunidade de participação na matriz energética de muitos países. Em experiências já comprovadas na Europa, o biodiesel está se impondo como um aditivo ecológico e renovável, sendo utilizado em misturas com o óleo diesel, este último, comprovadamente com limitações estratégicas e ambientais (LIMA, 2005).

No Brasil, fica evidente que inúmeras espécies vegetais podem ser utilizadas para produção do biodiesel (SHAHID e JAMAL, 2008), trazendo benefícios para o setor agrícola por meio da implantação de projetos específicos para fins energéticos com o objetivo de promover o desenvolvimento regional sustentável (GILMAR ELOPES, 2008). Dentre estas, o babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) se destaca entre as espécies nativas do cerrado brasileiro, considerado um dos maiores recursos oleíferos nativos do mundo (LORENZI, 1996).

2- Caracterização Botânica de *Orbignya oleifera* (Burret.)

O babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é uma palmeira nativa do Brasil, que se encontra distribuída nos estados de Goiás, Tocantins, Maranhão, Pará e Piauí. A região dos babaçuais compreende 18,5 milhões de hectares de floresta, de forma extrativista do fruto, um produto com alto valor comercial e industrial, cuja exploração envolve o trabalho de mais de 300 mil pessoas (ALBIERO et al., 2007). O potencial do babaçu

continua inexplorado sendo possível o aproveitamento econômico para produção de carvão, óleo combustível, gás, lubrificante e óleo comestível. No que tange a produção de óleo combustível, o óleo de babaçu possui características excelentes para produção de biodiesel, por ser sua composição predominantemente láurica (LIMA et al., 2007).

O Brasil possui uma riquíssima flora de Arecaceae, sendo o terceiro país do mundo em diversidade de palmeiras nativas, com aproximadamente 387 espécies e 37 gêneros. As palmeiras possuem várias utilidades conforme a espécie, fornecendo ao homem madeira para construção, as folhas e talos servem de cobertura para moradias, paredes e cercas, dos folíolos, fabricam-se esteiras, cordas, sacos, cestos, chapéus, entre outras. Fornecem também alimentos como o palmito, frutos, óleos, doces, e alimentam a fauna. São as palmeiras que atraem e fixam o homem em regiões inóspitas, sem elas, esses locais seriam grandes áreas semidesérticas ou despovoadas (LORENZI et al., 2004). Dentre as palmeiras está o babaçu, que de acordo com a classificação de Arthur Cronquist (1988), o *Orbignya oleifera* (Burret.), tem a seguinte posição sistemática:

Reino: Plantae;

Divisão: Magnoliophyta;

Classe: Liliopsida;

Ordem: Arecales;

Família: Arecaceae;

Gênero: *Orbignya*;

Espécie: *oleifera*.

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pela Dra. Maria Cristina de Sousa, da Universidade Federal do Acre, em Cruzeiro do Sul – AC. A exsicata encontra depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás -Campus Jataí, cuja exsicata tem o número 5641.

Dentre as espécies nativas do cerrado brasileiro, o *Orbignya oleifera* Burret., destaca-se pela importância econômica para região em que se encontra. É conhecido popularmente como bauaçu, baguaçu, auaçu, aguaçu, coco-de-macaco. A palmeira de babaçu possui três estágios de crescimento. O primeiro é constituído pelas pindovas, em que a palmeira possui até três folhas definitivas. O segundo, é denominado palmito, pode ser identificado pelo palmito, quase ao nível do solo. No terceiro, o caule já se encontra formado, correspondendo a fase anterior a adulta. É uma palmeira que pode atingir até 20 m de comprimento, com 41 cm de diâmetro (Figura 1

A), comprimento das folhas de até 8 m, período de maior frutificação vai de agosto a janeiro, com a produção de 2.000 frutos por ano (Figura 1 B). Os frutos são drupáceos, lenhosos, ovais alongados, de polpa fibroso-farinácea, podendo atingir de 5 a 15 cm de comprimento por 3 a 8 cm de diâmetro chegando apesar de 90 a 240 gramas (Figura 1 C). Esse tamanho depende das condições ecológicas e das variedades de cada espécie. A semente do babaçu é oleaginosa e comestível, contém entre 60 e 70% de óleo, o que representa 6 a 10% do peso fresco dos frutos. As amêndoas podem ser consumidas *in natura*, ou podem ser destinadas para a produção de óleo que é rico em ácido láurico, usado na alimentação humana, na produção de cosméticos, como lubrificante e/ou transformado em biodiesel (LIMA et al., 2006; TEIXEIRA, 2005).



Figura 1. Características morfológicas de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), fazenda Santa Bárbara, município de Piranhas GO (A); frutos inseridos nos cachos (B), corte transversal do fruto de babaçu (C). Foto: Mariluz S. Leite, 2012. Rio Verde – GO.

Assim, como para a maioria das palmeiras, a multiplicação do babaçu ocorre via semente. A inconveniência deste tipo de propagação é que além do longo período e do lento crescimento, as plantas originadas deste processo possuem alta variabilidade por se tratar de um tipo gâmico de multiplicação (PEREIRA et al., 2006).

3- Propagação por Sementes

Em geral, na família das *Arecaceae*s, é muito difícil a propagação pela forma sexuada, a germinação é afetada negativamente pelas características morfológicas das sementes, assim como pela heterogeneidade genética (EL-KAZZAZ e EL-BAHR, 2000). De modo geral, a germinação é lenta, irregular e frequentemente ocorre em baixas porcentagens para a maioria das espécies, perdendo a viabilidade rapidamente quando desidratadas (MEEROW, 1991). De acordo com TOMLINSON (1990), é comum nessa família, que as sementes não deem respostas favoráveis, mesmo em condições adequadas de germinação, podendo o fato estar relacionado aos obstáculos mecânicos, como espessura da testa e endocarpo.

Outra característica do processo germinativo nessa família é a variação quanto ao número de dias requeridos para germinarem. De acordo com KOBORI (2006), estima-se que 25% das espécies pertencentes à família *Arecaceae* necessitam de 100 dias para germinar com aproveitamento de apenas 20%. Essa afirmação concorda com os dados obtidos por vários autores como CHARLO et al., (2006) com a palmeira imperial [*Archontophoenix alexandrae* (F. Mueller) H. Wendl.] que teve início de germinação aos 68 dias após implantação do experimento; NASCENTE et al., (2000) em guariroba (*Syagrus oleracea* Becc.), aos 90 dias; BOVI (1990) em palmitero (*Euterpe edulis* Mart.), 97 dias; IOSSI et al., (2007) em tamareira-anã (*Phoenix roebelenii* O'Brien), aproximadamente 50 dias.

4- Propagação *in vitro*

As técnicas de cultura de tecidos são recorridas quando a propagação sexuada é insatisfatória, ou seja, quando a progênie obtida é muito heterogênea ou em casos em que a propagação por semente não ocorra naturalmente. Desta forma, o cultivo *in vitro*, por meio da micropropagação, é um método viável para a propagação de diversas espécies, proporcionando produção de mudas com alta sanidade e populações com plantas homogêneas, além de acelerar os métodos de propagação convencional como a enxertia e estaquia (SOUZA et al., 2007).

Para solucionar os problemas decorrentes das dificuldades de germinação *in situ* e da desuniformidade das plântulas formadas, a propagação *in vitro*, pela cultura de embriões tornou uma ferramenta de grande valia na produção de mudas dessas espécies. A propagação *in vitro* permite, dentre outras aplicações, a produção de plantas livres de patógenos e acelerar os programas de melhoramento em *Arecaceae* que são

demorados e complexos, em virtude do longo ciclo, hábito de crescimento e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa, já que a produção de perfilhos está restrita a algumas espécies (LEDO et al., 2001).

Outros métodos de propagação *in vitro*, foram verificados na cultura de tecidos com Arecaceae, como em tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) em que foi desenvolvido protocolos eficientes como a indução de calos, com posterior crescimento e regeneração de plântulas e indução de raízes (ASLAM e KHAN, 2009). Já Abul-Soad e Mahdi (2010) em seus estudos também com tamareira (*Phoenix dactylifera* L.), verificou um aumento no número de plantas a partir de uma inflorescência.

5- Meios Nutritivos

Os meios nutritivos fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, controlando em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Basicamente, o meio de cultivo é composto por água, macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, carboidratos, agentes solidificantes, reguladores vegetais e, eventualmente, aditivos como antibióticos, carvão ativado e aditivos orgânicos complexos (VILLA et al., 2009).

Diversas formulações de meio têm sido utilizadas no cultivo de explantes. Dentre elas, a formulação de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) é seguramente a mais utilizada principalmente nos trabalhos de multiplicação para a maioria das espécies, seguido pelo meio de WPM (LLOYD & McCOWN, 1980).

Ao meio de cultivo geralmente são adicionados reguladores de crescimento, com o objetivo de suprir deficiências dos teores endógenos de fitormônios nos explantes e, as classes de reguladores mais utilizados na cultura *in vitro* são as auxinas e citocininas. Embora nem sempre sejam necessárias no meio de multiplicação, as auxinas são utilizadas para promover o crescimento de calos, suspensões celulares e, em combinação com as citocininas, regular a morfogênese estabelecendo o equilíbrio adequado entre os reguladores de crescimento (SILVEIRA et al., 2002).

O 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), o ANA (ácido naftaleno acético), o AIA (ácido indol 3 acético) e o AIB (ácido indolil 3 butílico) são as auxinas mais empregadas na micropropagação da maioria das espécies. Das citocininas, o BAP (Benzilaminopurina), a Cinetina (6 furfurilaminopurina) e o TDZ (Tidiazuron) tem recebido maior atenção (BRUM et al., 2002).

No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carbono. A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais, fornecendo cadeias de carbono e energia para as plantas sintetizarem os compostos orgânicos necessários ao crescimento dos explantes (NICOLOSO et al., 2003; VILLA et al., 2009).

Diante da necessidade de produção de mudas de *Orbignya oleifera* Burret., e em virtude da inexistência de trabalhos utilizando a micropropagação para a espécie, faz-se necessário o estudo das técnicas de cultura de tecidos para que se torne viável a sua multiplicação vegetativa em escala comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUL-SOAD, A. A.; MAHDI, S. M. Commercial Production of Tissue Culture Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) by Inflorescence Technique. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 8, n. 2, p.39-44, 2010.

ASLAM, J.; KHAN, S. A.; *In Vitro* Micropropagation of 'Khalas' Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.), an Important Fruit Plant. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**. v.17, n.1, p.15-27, 2009.

BOVI, M. L. A. Pré-embebição em água e porcentagem e velocidade de emergência de sementes de palmitreiro. **Bragantia**, v.49, n.1, p.11-22, 1990.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal**. Brasília: Ventura Comunicações e Cultura, 24 p.1999.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição Especial, 2002.

CAVALCANTI, R. Capricho da Natureza. **UnB Revista**, p. 20-23, 2000. Edição Especial.

CHARLO, A. C. O.; F. V. MÔRO; V. L. SILVA; B. M. SILVA E SILVA; S. BIANCO; J. R. MÔRO. Aspectos morfológicos, germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Archontophoenix alexandrae* (f. Mueller) h. Wendl. e Drude (Arecaceae) em diferentes substratos. **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.933-940, 2006.

CRONQUIST, A. The Evolution and Classification of flowering Plants, 2nd Edn. **New York Botanical Garden. Bronx**, New York, U.S.A. 1988.

EL-KAZZAZ, A.A.; EL-BAHR, M. K.A Method for *in vitro* Propagation of the Egyptian Date Palm Cultivar Samany. **Arabian Journal Biotechnology**, v.4, n.2, p. 285-292, 2000.

GILMAR, M.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v.51, n.2, p.60-79, 2008.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L. & PIRANI, J. R. Caracterização e endemismos nos campos rupestres da cadeia do espinhaço. In: Cavalcanti, T. B. & Walter, B. M. T. (org.). **Tópicos Atuais em Botânica**. 1ª Ed. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2000, p. 311-318.

IOSSI, E.; R. SADER; F. V. MORO; J. C. BARBOSA. Maturação fisiológica de sementes de *Phoenix roebelenii* O'Brien. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.147-154, 2007.

KOBORI, N. N. **Germinação de sementes de *Livistona chinensis* (Jack.) R. Br. ex. Mart. (ARECACEAE)**. Agronomia (Produção e Tecnologia de Sementes), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal - SP. 34 p. 2006.

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**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LIMA, A.M.; VIDAURRE, G.B.; LIMA, R.M.; BRITO, E.O. Utilização de fibras (epicarpo) de babaçu como matéria-prima alternativa na produção de chapas de madeira aglomerada. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.645-650, 2006.

LIMA, P.C.R. **Biodiesel: um novo combustível para o Brasil**. Consultoria Legislativa. p.31, 2005.

LORENZI, H., SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda**, Nova Odessa, SP. P.416, 2004.

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

LLOYD, G.; McCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 416, Aug. 1980. Abstract 321.

MEEROW, A. W. **Palm Seed Germination**. I. F. A. A. Sci.: University of Florida. 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p 473-479, 1962.

NASCENTE, A. S.; N. PEIXOTO; C. W. F. SANTOS. Peso de sementes e emergência de plântulas de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc). **Pesquisa Agropecuária Tropical (UFG)**, v.30, n.2, p.77-79, 2000.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. Efeitos de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

PEREIRA, J.E.S. et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei* Burret). **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.2, p.251-256, 2006.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGWATER, S. Woody flora distribution of the cerrado biome: phytogeography and conservation priorities. In: CAVALCANTI, T. B.; WALTER, B. M. T. (Eds.) Tópicos atuais em botânica. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2000. p. 340-342.

SHAHID, E.M.; JAMAL, Y. A review of biosiesel as vehicular fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v.12, p.2484-2494, 2008.

SILVA, J. M. C. & BATES, J.M. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, v.52, p.225-233, 2002.

SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J.C.; RODRIGUES, A. C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob baixas concentrações e diferentes tipos de auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, 2002.

SOUZA, C. D. R.; CHR, I. S.; SOUZA, R. C. R.; JEFFREYS, M. F.; SOUZA, K.S.; COSTA, E. J. C.; SANTOS, J. C. Caracterização físico-química das misturas binárias de biodiesel e diesel comercializados no Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 39, p.383-388, 2009.

SOUZA, J. A. de; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. da; FERRI, J; SOARES, G. C. Solidificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 115-118, 2007.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n.3, p.768-775, 2009.

TEIXEIRA, L.C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v.26, p.18-27, 2005.

TOMLINSON, P. B. **The structural biology of palms**.1990.477 p. (Clarendon Press).

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A.; PIO, L. A. S. Sacarose e um aditivo orgânico complexo na micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 1- 8, 2009.

OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologia para o estabelecimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.).

CAPÍTULO 1

Germinação *in vitro* de babaçu: influência de reguladores de crescimento em embriões zigóticos

RESUMO: O babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é uma palmeira oleaginosa, que se propaga a partir das sementes. A inconveniência deste tipo de propagação é que além da demora e o lento crescimento, plantas originadas neste processo possuem alta variabilidade por se tratar de um tipo gâmico de multiplicação. Por esse motivo, a contribuição das técnicas de cultura de tecidos é de grande importância, pois acelera sua propagação. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito dos reguladores ANA, BAP e KIN na germinação e no crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu. Para isso foram feitos três ensaios: Ensaio (I) interação de ANA (0, 1 e 2 μM) e KIN (0, 1 e 2 μM); Ensaio (II) interação de ANA (0, 1 e 2 μM), KIN (0, 1 e 2 μM) e BAP (1 μM); Ensaio (III) interação de ANA (0, 1 e 2 μM), KIN (0, 1 e 2 μM) e BAP (2 μM). Foram realizadas contagens em dias alternados para avaliação da porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG). Aos 30, 60, 90 e 120 dias, avaliou-se o comprimento médio de plântulas e aos 120 dias de cultivo foram avaliados: formação do pecíolo cotiledonar, da parte aérea, raiz, calos e oxidação. Recomenda-se a combinação de 1 μM de BAP + 2 μM de ANA para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu.

PALAVRAS-CHAVE: *Orbignya oleifera* Burret., biodiesel, Arecaceae.

ABSTRACT: Babassu (*Orbignya oleifera* Burret) is a highly productive oil plant that is propagated by seed. This type of propagation is inconvenient because, in addition to being

delayed and accompanied by slow growth, the plants that are produced are highly variable due to their gamic reproduction. Therefore, tissue culture techniques are of great importance because the propagation is accelerated. The objective of this study was to evaluate the effect of growth regulators, NAA, BAP, and KIN, on *in vitro* germination and on the growth of babassu zygotic embryos. Three trials were carried out. For trial (I), the interaction between NAA (0, 1, and 2 μM) and KIN (0, 1, and 2 μM) were studied; for trial (II), the interactions among NAA (0, 1, and 2 μM), KIN (0, 1, and 2 μM), and BAP (1 μM) were studied; and for trial (III), the interactions among NAA (0, 1, and 2 μM), KIN (0, 1, and 2 μM), and BAP (2 μM) were studied. At 30, 60, 90, and 120 days of culture, were assessed average seedling height, and at 120 days, were assessed germination, the germination speed index (GSI), cotyledonary petiole growth, oxidation, and the formation of shoots, roots, and calluses. It is recommended that the combination of 1 μM BAP + 2 μM NAA for *in vitro* culture of zygotic embryos of babassu.

KEYWORDS: *Orbignya oleifera* (Burret.), biodiesel, Arecaceae.

INTRODUÇÃO

O babaçu, *Orbignya oleifera* Burret, pertence a família Arecaceae, é uma palmeira de grande porte que pode atingir até 20 m de comprimento, com estipe de 41 cm de diâmetro e comprimento das folhas de até 8 m. Conhecido popularmente como babaçu, bauaçu, baguaçu, auaçu e coco-de-macaco, tem seu período de maior frutificação nos meses de agosto a janeiro com a produção de 2.000 frutos por ano (LIMA et al., 2007).

O babaçu possui grande potencial de consumo contribuindo, de maneira significativa para a economia de alguns estados da federação brasileira, principalmente no Acre, Maranhão, Tocantins e Goiás, onde se localizam os conhecidos maciços. Os principais produtos comerciais extraídos da palmeira de babaçu são o óleo (extraído da semente) e a torta (resíduo do processo de extração de óleo da semente). O fruto fornece uma manteiga vegetal de sabor agradável e de valor nutritivo. O mesocarpo do fruto produz carvão de excelente qualidade, sendo empregado como fonte de energia em siderurgias.

Assim sendo, o babaçu é apontado como uma das principais alternativas, entre as oleaginosas brasileiras, para a produção de biocombustíveis. A semente do babaçu contém entre 60 e 70% de óleo, entretanto, representa apenas 6 a 10% do peso fresco dos frutos. As amêndoas podem ser consumidas *in natura*, ou podem ser destinadas para a produção

de óleo que é rico em ácido láurico usado na alimentação humana, na produção de cosméticos, como lubrificante e/ou transformado em biodiesel (LIMA et al., 2006; TEIXEIRA, 2005).

As perspectivas para a produção de biodiesel no Brasil são muito favoráveis e essa é uma vantagem que o país possui em relação a todos os outros produtores de oleaginosas, mas a produção ainda é incipiente, considerando o potencial que possui, em razão das dimensões territoriais, principalmente na região dos cerrados, e da elevada diversidade edafoclimática além do grande número de espécies vegetais que podem ser utilizadas para tal fim. Com a retomada da produção do biodiesel, verifica-se que sementes e mudas das espécies com potencial de produção tornaram um insumo extremamente escasso e um dos grandes desafios atuais da pesquisa agrícola é a produção de cultivares melhoradas, com estabilidade genética, alta qualidade e potencial produtivo. Portanto, vê-se a necessidade de incrementar as ações voltadas à modernização constante do parque industrial e à ampliação do consumo interno e externo.

A implantação de cultivos comerciais de palmeiras é dificultada pela pronunciada dormência das sementes que pelo elevado teor de óleo, são também susceptíveis à deterioração (TEIXEIRA, 2005; HIANE et al., 2005; BEWLEY & BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005). Sob este contexto, verifica-se que com os avanços tecnológicos atuais envolvendo as técnicas de cultivo *in vitro* dispõem de experimentações em diversas modalidades as quais vem obtendo excelentes resultados (SILVA et al., 2011; PECH-AKÉ et al., 2007; PEREIRA et al., 2006; SARASAN et al., 2002). A necessidade em adotar estas novas técnicas tornou necessária para contornar os problemas de propagação, assim sendo, a produção de mudas sadias e bem desenvolvidas produzidas pelo cultivo *in vitro* torna importante, por constituir um dos fatores de sucesso na formação de novas lavouras.

O cultivo *in vitro* tem sido recorrido quando a propagação sexuada é insatisfatória, ou seja, a progênie obtida é muito heterogênea ou em casos em que a propagação por semente não ocorre naturalmente. A cultura de embriões zigóticos se destaca como uma alternativa viável para várias espécies de palmeiras e oferece oportunidade para ampliação de estudos sobre a germinação. A técnica tem sido usada para promover a superação de dormência, produção em escala comercial obtendo plantas com alta qualidade sanitária e determinar as necessidades nutricionais e físicas para o desenvolvimento de plântulas (SPERA et al., 2001; MELO et al., 2001; MOLLA et al., 2004; TZEC-SIMA et al., 2006).

Contudo, a multiplicação em escala comercial necessita do conhecimento dos fatores que controlam a morfogênese *in vitro* e que limitam a taxa de multiplicação e enraizamento. Sistemas convencionais de indução de respostas morfogênicas podem ser melhorados manipulando *in vitro* os fatores que as determinam. Vários fatores podem influenciar no potencial regenerativo de uma espécie e a necessidade de selecionar o tipo de meio e, a adição ou não de regulador de crescimento é completamente dependente do objetivo a ser alcançado, os seus efeitos se diferem. Ensaios específicos são imprescindíveis para estabelecer um protocolo ideal com suas combinações e concentrações eficazes para induzir a resposta esperada (LEDO et al., 2007; MELO et al., 2001; TZEC-SIMÁ et al., 2006).

Apesar da importância econômica de *Orbignya oleifera* Burret. para região, não há relatos sobre o cultivo *in vitro* desta espécie, por isso objetivou-se com este trabalho avaliar a interação auxina/citocinina na germinação e no crescimento *in vitro* de plântulas provenientes de embriões zigóticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde.

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pela Dra. Maria Cristina de Sousa, da Universidade Federal do Acre, *Campus* Floresta, na cidade de Cruzeiro do Sul - AC. A exsicata se encontra depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás, *Campus* Jataí, sob o número de coleta 5641.

Os frutos foram coletados após a abscisão, no mês de janeiro do ano de 2011, em uma população de plantas ocorrentes na fazenda Santa Bárbara, no município de Piranhas – GO, com as coordenadas 16° 22' 015" S – 51° 55' 715" W, altitude 389 m (Figura 1A).

Após a coleta, os frutos maduros de babaçu foram quebrados em prensa hidráulica para o rompimento do endocarpo, tecido de proteção que fornece rigidez ao fruto (Figura 1B). Posteriormente as amêndoas foram retiradas do interior do fruto (Figura 1C - D) e os embriões foram removidos da amêndoa (Figura 1E).

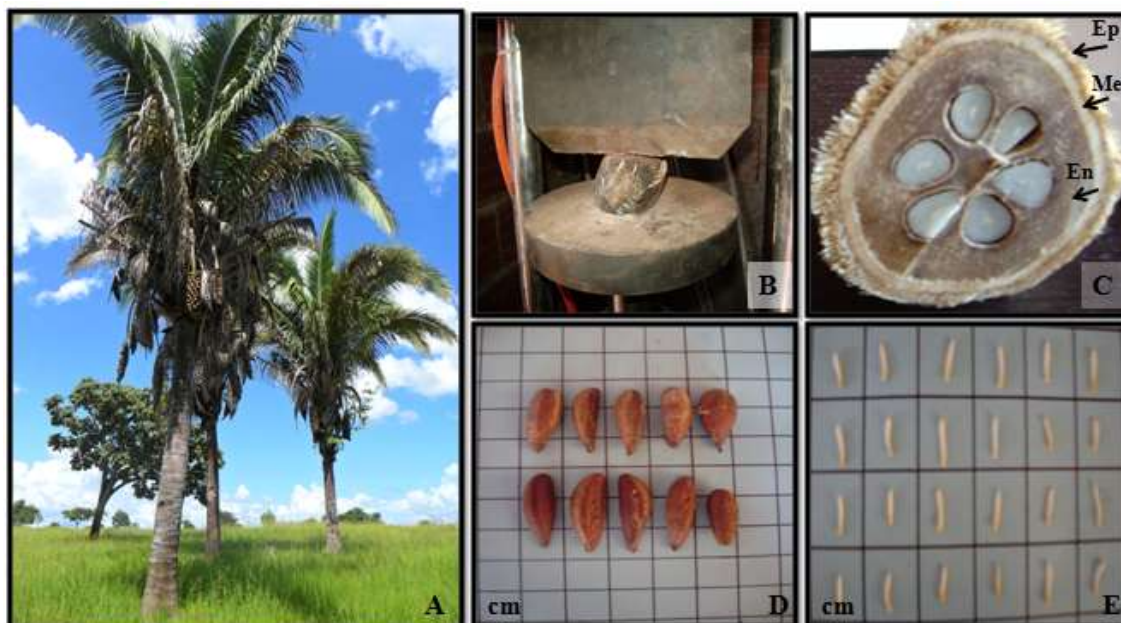


Figura 1. Destaque da planta matriz de *Orbignya oleifera* Burret., fazenda Santa Bárbara, município de Piranhas GO (A); prensa hidráulica utilizada para extrair as sementes (B); fruto do babaçu em corte transversal (C); sementes (D) e os embriões zigóticos de babaçu (E). Ep: Epicarpo; Me: Mesocarpo e En: Endocarpo. Escala: 2 cm. Foto: Mariluz S. Leite. Rio Verde - GO, 2012.

Assepsia

Em todos os ensaios, os embriões foram revestidos com gaze e imersos em álcool 70% por 1 minuto, em seguida foram imersos em solução a 20% de hipoclorito de sódio - NaOCl (água sanitária comercial – 2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e lavadas três vezes com água estéril em câmara de fluxo laminar.

Estabelecimento *in vitro*

Os embriões de babaçu foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio MS 50% das concentrações dos sais (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 30 g.L⁻¹ de sacarose, suplementado com 3,5g.L⁻¹ de Ágar (Marca: Dinâmica®).

No meio de cultivo também foi adicionado ácido naftalenoacético (ANA), 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN), que se diferenciavam na concentração, sendo então estabelecidos nos três ensaios descritos a seguir:

ENSAIO (I): Interação ANA x KIN

Os embriões inoculados neste ensaio ficaram dispostos em meio MS 50% em que nove combinações de ANA e KIN foram averiguadas (μM).

Tratamentos	ANA (μM)	KIN (μM)
T ₁	0	0
T ₂	0	1
T ₃	0	2
T ₄	1	0
T ₅	1	1
T ₆	1	2
T ₇	2	0
T ₈	2	1
T ₉	2	2

ENSAIO (II): Interação ANA x KIN x (1 μM) BAP

Os embriões foram inoculados em meio MS 50% adicionados de ANA, KIN e BAP nas seguintes combinações (μM).

Tratamentos	ANA (μM)	KIN (μM)	BAP (μM)
T ₁	0	0	1
T ₂	0	1	1
T ₃	0	2	1
T ₄	1	0	1
T ₅	1	1	1
T ₆	1	2	1
T ₇	2	0	1
T ₈	2	1	1
T ₉	2	2	1

ENSAIO (III): Interação ANA x KIN x (2 μM) BAP

Os embriões foram inoculados em meio MS 50% adicionados de ANA, KIN e BAP nas seguintes combinações (μM).

Tratamentos	ANA (μM)	KIN (μM)	BAP (μM)
T ₁	0	0	2
T ₂	0	1	2
T ₃	0	2	2
T ₄	1	0	2
T ₅	1	1	2
T ₆	1	2	2
T ₇	2	0	2
T ₈	2	1	2
T ₉	2	2	2

O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 3$ antes da autoclavagem, na temperatura de 121°C e a pressão de $1,05\text{kgcm}^{-2}$, durante 20 minutos.

Após a inoculação os tubos contendo os embriões foram mantidos em sala de crescimento por 120 dias, com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 45%, sendo que a cada 30 dias os embriões foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico ao que lhe deu origem, e foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Avaliações e Delineamento Experimental

Em todos os ensaios foram realizadas contagens em dias alternados para avaliação da porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG). Aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, foi avaliado o crescimento médio de plântulas e aos 120 dias o crescimento do pecíolo cotiledonar, formação de parte aérea, enraizamento, oxidação e formação de calos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial para os três ensaios, sendo nove tratamentos com 25 repetições (constituída por um tubo de ensaio). Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Scott-Knott. Os dados de porcentagem foram transformados em arco-seno $\sqrt{\%}$ e os números de contagem, em $\sqrt{x+1}$. O programa utilizado para análise dos dados foi software SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A semente de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é composta pelo tegumento, o endosperma e o embrião. Ela é alongada, com aproximadamente 4,5 cm de comprimento e tem uma das faces curva e a outra retilínea, característica adequada para alojar o embrião. A largura da região mediana é de aproximadamente 1,0 cm (Figura 2A).

O tegumento é de cor marrom e tem inúmeras invaginações causadas pelo atrito entre o endocarpo e o endosperma (Figura 2A). O embrião está inserido lateralmente em uma das extremidades da semente, é constituído por uma região cilíndrica, referente ao pecíolo cotiledonar, e por uma região distal constituída pelo limbo cotiledonar ou haustório (Figura 2B).

A estrutura do embrião de babaçu acompanha o padrão geral observado em outras palmeiras, e que são peculiares a forma de bojo e as pronunciadas invaginações do haustório (PANZA et al., 2004; HENDERSON, 2006). No entanto, segundo Aguiar e Mendonça (2003) e Orozco-Segovia et al., (2003), geralmente as sementes de palmeiras contém embriões pequenos em relação ao tamanho da semente e da grande quantidade de endosperma. No caso do babaçu, os embriões são maiores que o padrão médio observado em palmeiras com média de 1cm de comprimento e 0,1 cm de diâmetro.

A viabilidade de multiplicação *in vitro* de babaçu via embriões zigóticos é aceitável, já que em todos os tratamentos houve a germinação que teve início após sete dias de cultivo. Neste período, foi visível o processo de embebição dos embriões, evidenciado pela expansão do pecíolo cotiledonar, situado na região basal, seguida pela diminuição do haustório, que atrofia, e tende a se desprender do pecíolo cotiledonar (Figura 2C).

A partir desse ponto foi quantificada a porcentagem de embriões germinados.

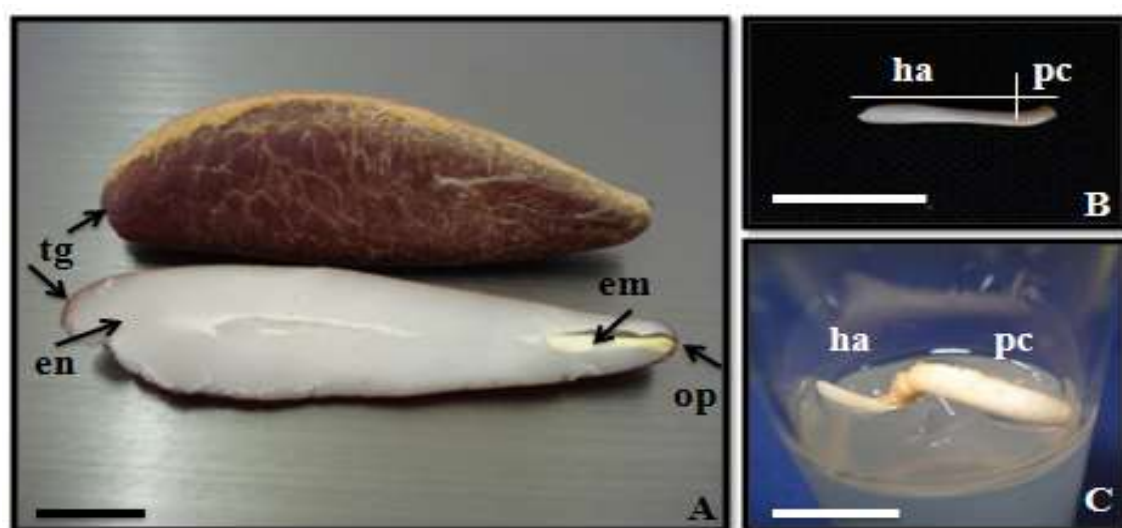


Figura 2- Semente de *Orbignya oleifera* Burret. inteira e em corte transversal (A); embrião zigótico (B); embrião germinado (C). (Barra igual a 1,0 cm de comprimento). **em:** embrião; **tg:** tegumento; **en:** endosperma; **op:** opérculo; **pc:** pecíolo; **ha:** haustório. Foto: Mariluz S. Leite. Rio Verde – GO, 2012.

ENSAIO (I): Interação de ANA e KIN na germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu.

Verificou-se que não houve efeito para as características: índice de velocidade de germinação (IVG), parte aérea, oxidação e crescimento médio de plântulas.

Com relação as demais características avaliadas: germinação, pecíolo cotiledonar, raiz e formação de calos, foi verificado que a interação ANA x KIN não exerceu

influência. A utilização de KIN também não foi efetivo nas características: pecíolo cotiledonar, raiz e formação de calos. Já para a germinação, a utilização de ANA é que não foi significativa (Tabela 1).

As maiores porcentagens de germinação foram obtidas quando no meio não se utilizou KIN ou quando este estava a 1 μM , médias de 80 e 88%, respectivamente. A menor porcentagem foi verificada quando se utilizou 2 μM de KIN, média de 71% (Tabela 1).

A maior taxa de pecíolo cotiledonar formado foi obtida na ausência de ANA, média de 28%. Já para os meios contendo 1 e 2 μM de ANA, obteve-se as menores médias 5,3 e 1,3%, respectivamente (Tabela 1).

Quanto as raízes, ao contrário do pecíolo cotiledonar, o meio ausente de ANA proporcionou a menor porcentagem de formação de raiz, média de 1,3%. As maiores porcentagens foram obtidas no meio com 1 e 2 μM de ANA, médias 21,3 e 20,0%, respectivamente, ou seja, a presença de ANA, melhora a formação de raízes, e a ausência diminui a formação delas (Tabela 1).

Para a formação de calos, as maiores concentrações de ANA proporcionaram maiores taxas de crescimento. Quando utilizado 2 μM de ANA, obteve-se média de 33,3%, a 1 μM , taxa de 20%, na ausência de ANA não houve formação de calos. Embora na interação ANA x KIN não tenha tido efeito significativo para esta característica, verifica-se que quando se utilizou 1 μM de ANA, o aumento da concentração de KIN, reduziu a formação de calos, o que é favorável (Tabela 1).

Deste modo, verifica-se que a utilização de ANA proporcionou a formação de raízes, mas também induziu a formação de calos e diminuiu a formação do pecíolo cotiledonar. Visando otimizar melhores concentrações e tipos de reguladores de crescimento, optou-se em verificar a adição de BAP (1 e 2 μM). Os resultados obtidos estão apresentados nos ensaios II e III.

Tabela 1- Porcentagem de germinação, formação de pecíolo cotiledonar, raiz e calos, avaliados aos 120 dias de cultivo em embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), com diferentes interações de ANA e KIN. Rio Verde-GO, 2012.

ANA (μM)	KIN (μM)			Médias
	0	1	2	
Germinação (%) aos 120 dias				Médias
0	72,0 Aa ^Z	92,0 Aa	72,0 Aa	79,0 A
1	88,0 Aa	88,0 Aa	64,0 Ab	80,0 A
2	80,0 Aa	84,0 Aa	76,0 Aa	80,0 A
Médias	80,0 a	88,0 a	71,0 b	
Pecíolo cotiledonar (%) aos 120 dias				Médias
0	8,0 Ab	44,0 Aa	32,0 Aa	28,0 A
1	8,0 Aa	8,0 Ba	0,0 Ba	5,3 B
2	4,0 Aa	0,0 Ba	0,0 Ba	1,3 B
Médias	6,7 a	17,3 a	10,7 a	
Formação de raiz (%) aos 120 dias				Médias
0	0,0 Ba	4,0 Aa	0,0 Ba	1,3 B
1	32,0 Aa	20,0 Aa	12,0 Aa	21,3 A
2	32,0 Aa	12,0 Aa	16,0 Aa	20,0 A
Médias	21,3 a	12,0 a	9,3 a	
Formação de calos (%) aos 120 dias				Médias
0	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 C
1	36,0 Aa	12,0 Bb	12,0 Bb	20,0 B
2	28,0 Aa	36,0 Aa	36,0 Aa	33,3 A
Médias	21,3 a	16,0 a	16,0 a	

^ZMédias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna, e mesma letra minúscula, em cada linha, não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Observou-se que os embriões, de coloração creme, foram crescendo, alogando o pecíolo cotiledonar, que manteve a mesma coloração, e deste surgiram a parte aérea (folhas cotiledonares) de coloração verde (Figura 3). Nos tratamentos em que o meio de cultivo estava sem NAA e/ou 1 μM , foi observado maior crescimento do pecíolo (Figura 3 A, B, C) e menor formação de raiz (Figura 3 D, E, F). Já em altas concentrações de ANA foi constatada tendência de formação de calos e o surgimento de múltiplas raízes. Os calos formados surgiam da base do pecíolo, eram friáveis e marrom (Figura 3 G, H, I).

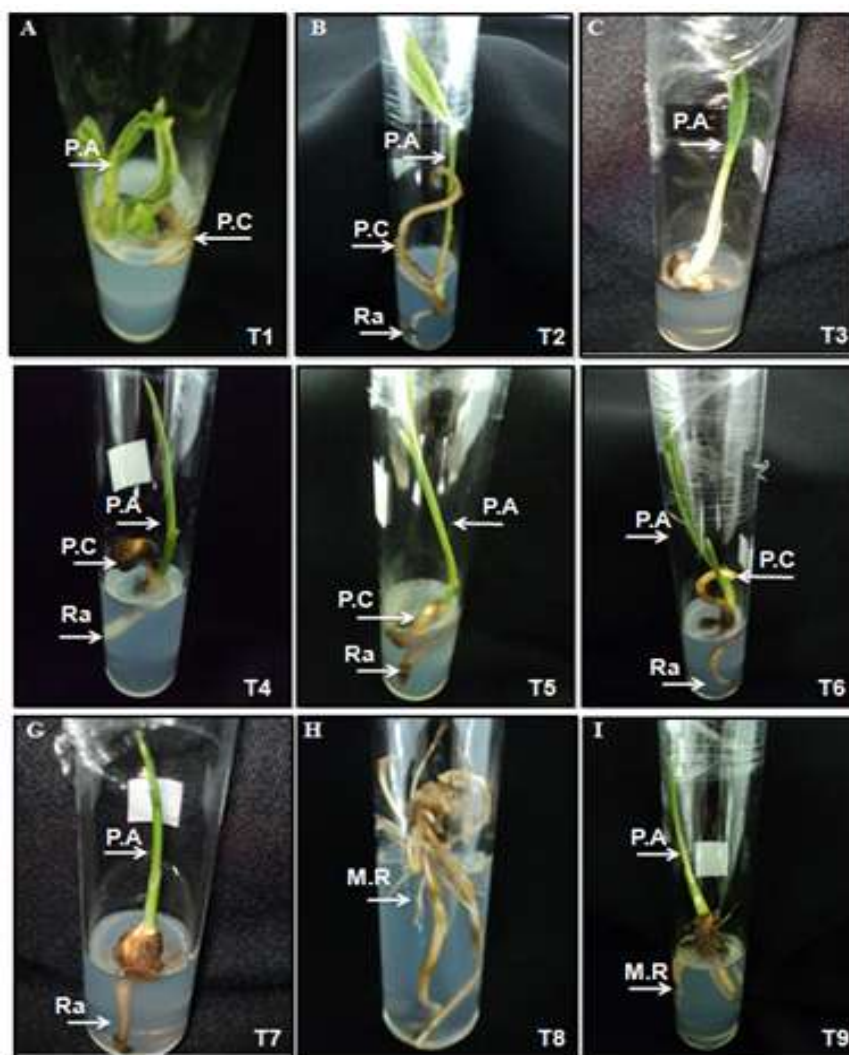


Figura 3- Germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) cultivados por 120 dias em meio 50% MS suplementado com diferentes concentrações de ANA e KIN: A) **T1**: ANA (0 μ M) e KIN (0 μ M); B) **T2**: ANA (0 μ M) e KIN (1 μ M); C) **T3**: ANA (0 μ M) e KIN (2 μ M); D) **T4**: ANA (1 μ M) e KIN (0 μ M); E) **T5**: ANA (1 μ M) e KIN (1 μ M); F) **T6**: ANA (1 μ M) e KIN (2 μ M); G) **T7**: ANA (2 μ M) e KIN (0 μ M); H) **T8**: ANA (2 μ M) e KIN (1 μ M) e I) **T9**: ANA (2 μ M) e KIN (2 μ M). Parte aérea (P.A); Pecíolo cotiledonar (P.C); Raiz (Ra); Múltiplas raízes (M.R).

ENSAIO (II): Interação de ANA e KIN em meio de cultivo suplementado com BAP (1µM) na germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.)

Não ocorreram efeitos para as características: germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), parte aérea, oxidação (avaliados aos 120 dias de cultivo) e comprimento médio de plântulas (avaliados aos 90 e 120 dias de cultivo) (Tabela 2).

Observou-se ainda, que houve interação significativa entre ANA x KIN para a formação de calos. As maiores concentrações de ANA utilizadas proporcionaram as maiores taxas de crescimento. Quando utilizada 2 µM de ANA, obteve-se média de 38,67%, a 1 µM, taxa de 20,0%, na ausência de ANA não houve formação de calos (Tabela 2). Já para o regulador KIN, foi verificado que quando utilizou 2 µM ocorreu menor porcentagem de calos, média de 9,33%. As maiores porcentagens foram obtidas em meio ausente de KIN e com 1 µM de KIN, médias 25,33 e 24,0%, respectivamente. Assim, a adição de ANA aumenta a formação de calos, mas a combinação deste regulador com doses mais elevadas de KIN diminui esta formação. Tais combinações são recomendáveis por diminuir a formação de calos, o que é indesejável para este caso (Tabela 2).

Com relação as demais características avaliadas: pecíolo cotiledonar, formação de raiz e comprimento médio de plântulas (avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo), verifica-se que não houve significância na interação ANA x KIN e nem na utilização de KIN (Tabela 2). Adição de ANA no meio de cultivo não foi favorável para o comprimento médio de plântulas, tanto para aquelas avaliadas aos 30, quanto daquelas avaliadas aos 60 dias. As maiores plântulas foram obtidas em meio ausente de ANA, médias de 2,28 cm para aquelas avaliadas aos 30 dias e 3,21 cm para as avaliadas aos 60 dias de cultivo (Tabela 2).

Adição de ANA no meio de cultivo também não favoreceu a formação do pecíolo cotiledonar, obteve-se média de 50,67% no meio ausente de ANA, e médias de 9,33 e 4,0% quando no meio foi adicionado 1 e 2 µM de ANA (Tabela 2).

Ao contrário das demais características avaliadas a adição de ANA no meio de cultivo proporcionaram a maior formação de raiz, médias de 6,66 e 20,0% para 1 e 2 µM de ANA, respectivamente. Embriões cultivados em ausência de ANA no meio não formaram raízes (Tabela 2).

Em todos os tratamentos houve o crescimento dos embriões, evidenciado pelo alongamento do pecíolo cotiledonar dando origem a formação da parte aérea. Os tratamentos em que se utilizou a menor concentrações de ANA ocorreu maior crescimento do pecíolo cotiledonar, e da parte aérea, porém houve pouca formação de raízes (Figura 4

A, B, C). A medida que a concentração de ANA aumentou houve maior formação de raízes e diminuiu a formação do pecíolo cotiledonar (Figura 4 D- H). Embora, utilizando três tipos de reguladores de crescimento no meio de cultivo, foi baixa a porcentagem de formação de calos, este, sempre presente, quando utilizados 2 μ M de ANA (Figura 4 I).

Tabela 2- Comprimento médio de plântulas, avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo, formação de pecíolo cotiledonar, raiz e calos, avaliados aos 120 dias de cultivo em embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), cultivados *in vitro* com diferentes interações de ANA e KIN, suplementado com 1 μ M de BAP. Rio Verde – GO, 2012.

ANA (μ M)	KIN (μ M)			Médias
	0	1	2	
Comprimento médio de plântulas (cm) aos 30 dias				Médias
0	1,98 Aa ^z	2,68 Aa	2,17 Aa	2,28 A
1	1,84 Aa	1,58 Ba	1,83 Aa	1,75 B
2	1,52 Aa	1,23 Ba	1,62 Aa	1,46 B
Médias	1,78 a	1,83 a	1,87 a	
Comprimento médio de plântulas (cm) aos 60 dias				Médias
0	2,98 Aa	3,73 Aa	2,90 Aa	3,21 A
1	2,66 Aa	2,25 Ba	2,96 Aa	2,62 B
2	2,38 Aa	2,19 Ba	2,28 Aa	2,28 B
Médias	2,68 a	2,72 a	2,71 a	
Pecíolo Cotiledonar (%) aos 120 dias				Médias
0	64,0 Aa	40,0 Aa	48,0 Aa	50,67 A
1	8,0 Ba	4,0 Ba	16,0 Ba	9,33 B
2	8,0 Ba	4,0 Ba	0,0 Ca	4,00 B
Médias	26,67 a	16,00 a	21,33 a	
Formação de raiz (%) aos 120 dias				Médias
0	0,0 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba	0,00 B
1	8,0 Aa	8,0 Ba	4,0 Ba	6,66 A
2	16,0 Aa	28,0 Aa	16,0 Aa	20,00 A
Médias	8,00 a	12,00 a	6,67 a	
Formação de Calos (%) aos 120 dias				Médias
0	0,0 Ca	0,0 Ba	0,0 Ba	0,00 C
1	16,0 Ba	44,0 Aa	0,0 Bb	20,00 B
2	60,0 Aa	28,0 Ab	28,0 Ab	38,67 A
Médias	25,33 a	24,00 a	9,33 b	

^zMédias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna, e mesma letra minúscula, em cada linha, não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

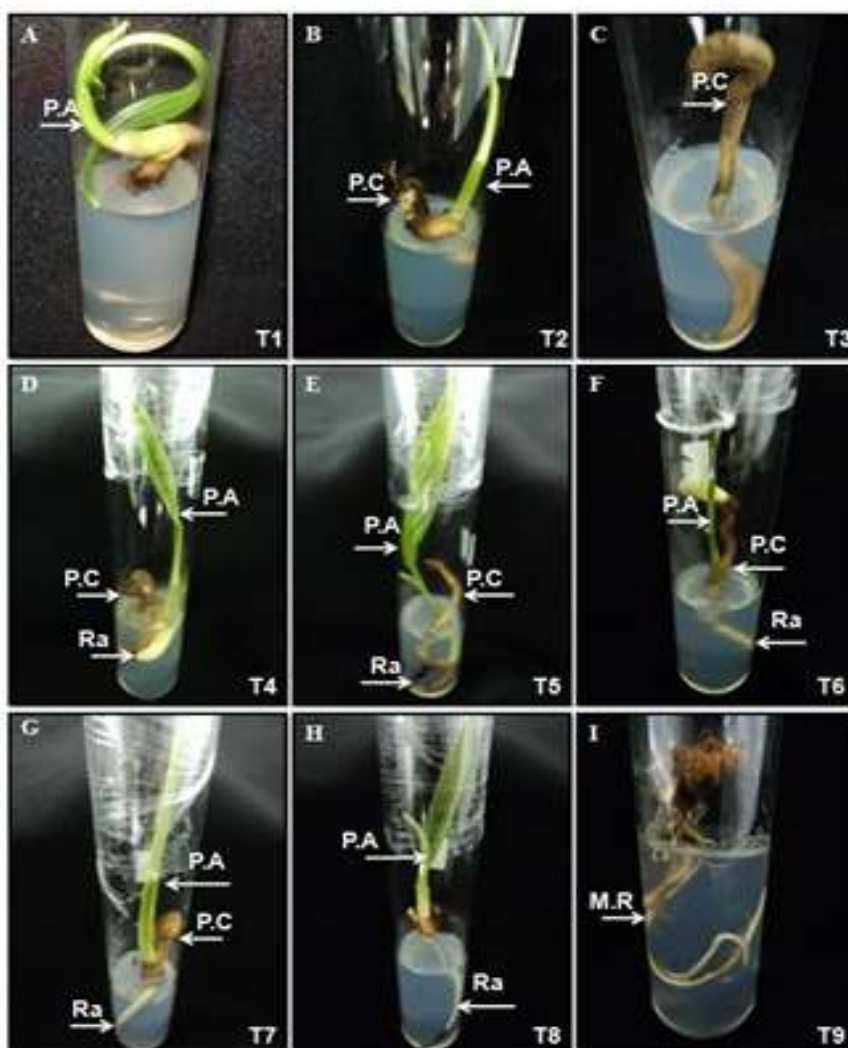


Figura 4- Germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) cultivados por 120 dias em meio 50% MS, suplementado com 1 μ M de BAP e diferentes interações ANA e KIN; A) **T1**: BAP (1 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (0 μ M); B) **T2**: BAP (1 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (1 μ M); C) **T3**: BAP (1 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (2 μ M); D) **T4**: BAP (1 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (0 μ M); E) **T5**: BAP (1 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (1 μ M); F) **T6**: BAP (1 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (2 μ M); G) **T7**: BAP (1 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (0 μ M); H) **T8**: BAP (1 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (1 μ M) e I) **T9**: BAP (1 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (2 μ M). Parte aérea (P.A); Pecíolo cotiledonar (P.C); Raiz (Ra); Múltiplas raízes (M.R).

ENSAIO (III): Interação de ANA e KIN em meio de cultivo suplementado com BAP (2µM) na germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.)

Não houve efeito significativo para germinação, I.V.G., formação de parte aérea e formação de raiz. Para as demais características avaliadas: pecíolo cotiledonar, comprimento médio de plântulas, oxidação e formação de calos, verifica-se que a interação ANA x KIN não foi significativa (Tabela 3).

A utilização de KIN no meio de cultivo foi favorável ao aumento do comprimento médio de plântulas, em todas as épocas de avaliações (30, 60, 90 e 120 dias de cultivo). As concentrações de 1 e 2 µM de KIN propiciaram as maiores médias de crescimento. Quanto a utilização de ANA no meio de cultivo, somente aos 30 dias foi observado efeito significativo, média de 1,77 cm. Assim sendo, a adição de 2 µM de BAP reduziu o efeito negativo de ANA para esta característica (Tabela 3).

A ausência de ANA no meio de cultivo favoreceu a taxa de formação do pecíolo cotiledonar e aumentou a taxa de oxidação. O pecíolo cotiledonar cresceu 22,67%, enquanto a taxa de oxidação aumentou 32,0%. Dessa forma, percebe-se que a adição de ANA previne a oxidação dos explantes (Tabela 3).

Com relação à formação de calos, maiores concentrações propiciaram maiores taxa de formação, média de 46,67 e 38,67%, no meio contendo 2 e 1 µM de ANA, respectivamente (Tabela 3).

Comparando com os demais ensaios (I e II), visualmente foi observado que neste ensaio (III), houve um menor crescimento da parte aérea, maior formação de calos e maior número de explantes oxidados em todos os tratamentos. Possivelmente, por causa da maior concentração de reguladores de crescimento presentes no meio (Figura 5).

A ausência de ANA no meio de cultivo estimulou o crescimento do pecíolo cotiledonar (Figura 5A, B, C). No entanto, o aumento da concentração de ANA favoreceu a formação de calos (Figura 5 D - I). Os calos formados eram friáveis de coloração branca e/ou creme e alguns deles estavam oxidados (Figura 5F).

Tabela 3- Comprimento médio de plântulas, avaliados aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, porcentagem de pecíolo cotiledonar, oxidação e formação de calos, avaliados aos 120 dias de cultivo em embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), cultivados *in vitro* com diferentes interações de ANA e KIN, suplementado com 2µM de BAP. Rio Verde – GO, 2012.

ANA (µM)	KIN (µM)			Médias
	0	1	2	
Comprimento médio de plântulas aos 30 dias (cm)				Médias
0	1,64 A ^y a ^z	1,77 Aa	1,89 Aa	1,77 A
1	1,32 Aa	1,62 Aa	1,47 Aa	1,47 B
2	1,00 Bb	1,58 Aa	1,54 Aa	1,37 B
Médias	1,31 b	1,64 a	1,63 a	
Comprimento médio de plântulas aos 60 dias (cm)				Médias
0	2,11 Aa	2,36 Aa	2,21 Aa	2,22 A
1	1,91 Aa	2,38 Aa	2,23 Aa	2,17 A
2	1,50 Ab	2,42 Aa	2,08 Aa	2,01 A
Médias	1,83 b	2,39 a	2,18 a	
Comprimento médio de plântulas aos 90 dias (cm)				Médias
0	2,25 Aa	2,45 Aa	2,39 Aa	2,36 A
1	1,91 Aa	2,53 Aa	2,40 Aa	2,27 A
2	1,53 Ab	2,67 Aa	2,17 Aa	2,14 A
Médias	1,88 b	2,56 a	2,33 a	
Comprimento médio de plântulas aos 120 dias (cm)				Médias
0	2,35 Aa	2,50 Aa	2,53 Aa	2,46 A
1	1,97 Aa	2,82 Aa	2,63 Aa	2,47 A
2	1,59 Ab	3,36 Aa	2,67 Aa	2,56 A
Médias	1,96 b	2,95 a	2,61 a	
Pecíolo cotiledonar (%) aos 120 dias				Médias
0	24,0 Aa	32,0 Aa	12,0 Aa	22,67 A
1	0,0 Ba	0,0 Ba	12,0 Ab	4,00 B
2	0,0 Ba	8,0 Ba	0,0 Aa	2,67 B
Médias	8,0 a	13,3 a	8,0 a	
Oxidação (%) aos 120 dias				Médias
0	44,0 Aa	28,0 Aa	24,0 Aa	32,00 A
1	8,0 Ba	12,0 Ba	12,0 Aa	10,67 B
2	8,0 Bb	0,0 Bb	24,0 Aa	10,67 B
Médias	20,0 a	13,3 a	20,0 a	
Formação de calos (%) aos 120 dias				Médias
0	12,0 Ba	4,0 Ba	20,0 Aa	12,00 B
1	56,0 Aa	56,0 Aa	28,0 Ab	38,67 A
2	40,0 Aa	44,0 Aa	32,0 Aa	46,67 A
Médias	36,0 a	34,67 a	26,67 a	

^zMédias seguidas pela mesma letra maiúscula, em cada coluna, e mesma letra minúscula, em cada linha, não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

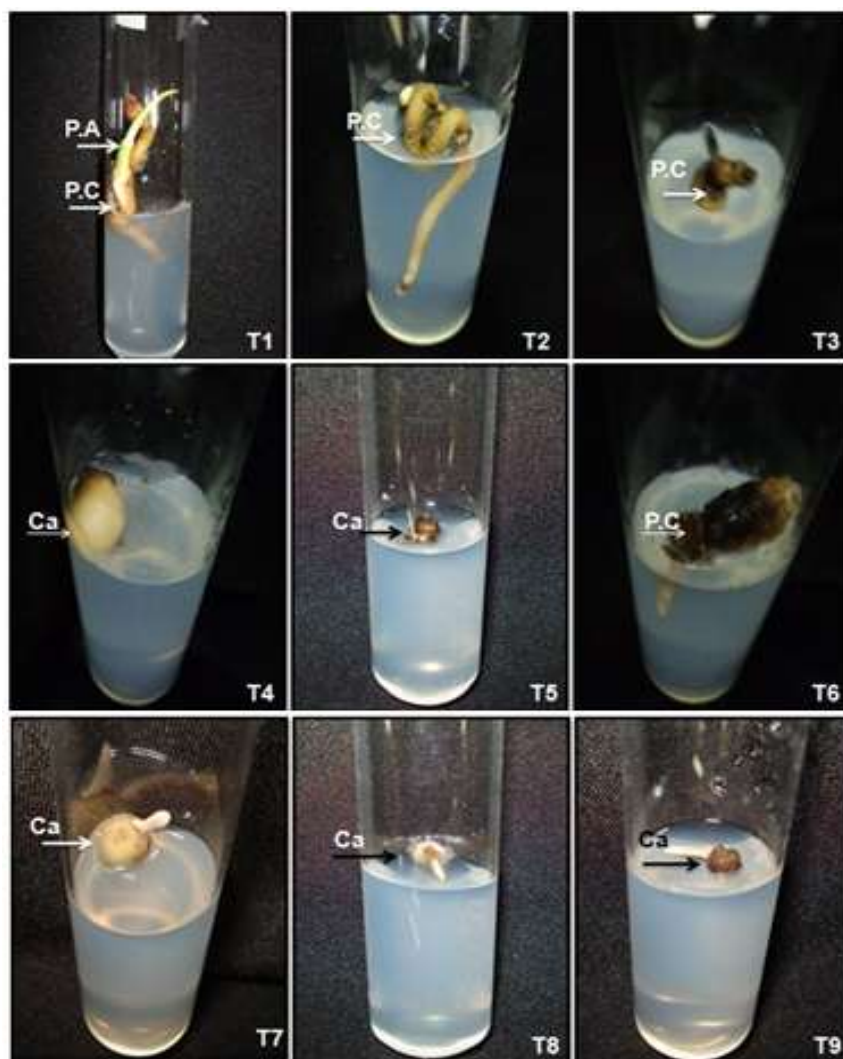


Figura 5- Germinação e crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) cultivados por 120 dias em meio 50% MS, suplementado com 2 μ M de BAP; A) **T1:** BAP (2 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (0 μ M); B) **T2:** BAP (2 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (1 μ M); C) **T3:** BAP (2 μ M), ANA (0 μ M) e KIN (2 μ M); D) **T4:** BAP (2 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (0 μ M); E) **T5:** BAP (2 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (1 μ M); F) **T6:** BAP (2 μ M), ANA (1 μ M) e KIN (2 μ M); G) **T7:** BAP (2 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (0 μ M); H) **T8:** BAP (2 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (1 μ M) e I) **T9:** BAP (2 μ M), ANA (2 μ M) e KIN (2 μ M). Parte aérea (P.A); Pecíolo cotiledonar (P.C); Calogênese (Ca).

Pelos resultados obtidos, comparando os três ensaios, altas concentrações de ANA no meio de cultivo, induziram a formação de calos e foi crescente a sua formação à medida em que aumentou a concentração de BAP, verificados no ensaio (II) e (III). A ausência de ANA no meio de cultivo favoreceu a formação do pecíolo cotiledonar e o comprimento médio de plântulas, verificados nos três ensaios. A utilização de 2 μM de BAP no meio de cultivo (ensaio III) oxidou os explantes que não formaram raízes e formaram calos.

Dessa forma, percebe-se que a utilização de BAP a 1 μM (ensaio II) no meio de cultivo, foram obtidos melhores resultados com relação ao pecíolo cotiledonar e ao comprimento médio de plântulas. Já para a formação de raízes a utilização de 2 μM de ANA foi favorável.

Quanto a utilização de KIN, não foi significativa para a maioria das características avaliadas em todos os ensaios, porém foi significativa a sua utilização para o crescimento do pecíolo cotiledonar dos explantes em que se formaram calos (ensaio III).

Portanto, recomenda-se a combinação de 1 μM de BAP + 2 μM de ANA para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu.

Relatos feitos por Hu e Ferreira (1998) descrevem que em embriões excisados em estágio maduros ou próximo podem germinar e crescer no meio inorgânico, e os reguladores de crescimento tornam dispensáveis. Já Ledoet al., (2007), em seus trabalhos com embriões zigóticos de coqueiro-anão (*Cocos nucifera* L.) relatam que ANA, BAP e carvão ativado promovem maior crescimento do sistema radicular e da parte aérea da espécie estudada. De acordo com os trabalhos de Asemota et al., (2007) com tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) a obtenção de calos foram evidenciados com altas concentrações de ANA.

Pelos resultados obtidos nestes ensaios, observa-se que o cultivo *in vitro* de embriões de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é viável mesmo com alguns obstáculos como a retirada do embrião do endocarpo, sem causar injúrias físicas, e a sensibilidade dos embriões a utilização dos reguladores de crescimento.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os melhores resultados para formação do pecíolo cotiledonar e o comprimento médio de plântulas foram obtidos com a utilização de 1 μM de BAP no meio de cultivo.
- A concentração de 2 μM de ANA favoreceu a formação de raízes.

- Recomenda-se a combinação de 1 μ M de BAP + 2 μ M de ANA para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a CAPES, ao CNPq, ao Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde, pelo auxílio financeiro concedido a esta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M.O.; MENDONÇA, M.S.; Morfo-Anatomia da Semente de *Euterpe precatória* Mart. (Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.37-42, 2003.

ASEMOTA, O.; EKE, C.R; ODEWALE, J.O. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.6, n.20, p.2353-2357, 2007.

COSTA, N.M.S.; ALOUFA, M.A.I.: Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) **Revista ciências Agrônômica**, Fortaleza, v.38, n.3, p.276-279, 2007.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

EL-KAZZAZ, A.A.; EL-BAHR, M.K. A method for *in vitro* propagation of the Egyptian date palm cultivar Samany. **Arabian Journal Biotechnology**, v.4, n.2, p. 285-292. 2000.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A Computer Statistical Analysis System. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez., 2011

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture . The technology**. 6 ed. England: Exegetics, v.1, p.575, 1993.

HENDERSON, F.M. Morphology and anatomy of palm seedlings. **The Botanical Review**, v.72, p.273-329, 2006.

HIANE, P.A.; RAMOS FILHO, M.M.; RAMOS, M.I.L.; MACEDO, M.L.R. Bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, p.256-259, 2005.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. *In vitro* embryology of *Ilex*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: **EMBRAPA-SPI; EMBRAPA CNPH**, v. 2, p. 371-393, 1998.

LEDO, 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**, 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 açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LIMA J. R. O., SILVA R. B.; E SILVA C. M. Biodiesel de babaçu (*Orignya sp.*) obtido por via etanólica, **Química Nova**, v.30: 600, 2007.

LIMA, A.M.; VIDAURRE, G.B.; LIMA, R.M.; BRITO, E.O. Utilização de fibras (epicarpo) de babaçu como matéria-prima alternativa na produção de chapas de madeira aglomerada. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.645-650, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MELO B, Pinto JEBP, Luz JMQ, Peixoto JR; Juliatti FC -Efeitos de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Journal Bioscience.**, v.17, n.1, p.49-59, june, 2001.

MELO B; Pinto JEBP; Luz JMQ; Peixoto JR; Juliatti FC- Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*syagrus oleracea* (mart.) becc.] **Ciências e agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, nov./dez., 2001.

MOLLA, M.M.H. et al. *In vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) embryo culture in Bangladesh. **Biotechnology**, v.3, p.98-101, 2004.

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

OROZCO-SEGOVIA, A.; BATIS, A.I.; ROJA-ARÉCHIGA, M; MENDOZA, A. Seed biology of palms: a review. **Palms**, v.47, p.79-94, 2003.

PANZA V.; LÁINEZ, V.; MALDONADO, S. Seed structure and histochemistry in the palm. *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.145, p.445-453, 2004.

PECH-AKÉ, A. et al. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v.43, p.247-253, 2007.

PEREIRA, J.E.S. et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei* Burret). **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.2, p.251-256, 2006.

SILVA, M. V. V.; SALES, J. F.; SILVA, F. G.; SPEROTTO, P. A.; RUBIO NETO, A. The influence of moisture on the *in vitro* embryo germination and morphogenesis of babassu (*Orbignya phalerata* Mart.). **Acta Scientiarum. Agronomy**. 2011. No prelo.

SANTANA, M.C.; TEIXEIRA, S.L. Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Biologia Geral e Experimental**, v.5, p.30-33, 2004.

SARASAN, V. et al. *In vitro* germination and induction of direct somatic embryogenesis in “Bottle Palm” (*Hyophorbe lagenicaulis* L. Bailey H. E. Moore), a critically endangered mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1107-1111, 2002.

SPERA, M.R.N. et al. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.12 p.1567-1572, 2001.

TEIXEIRA, L.C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v.26, p.18-27, 2005.

TZEC-SIMA, M. A; ORELLANA, R.; ROBERT, M. L: *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (Mexico). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.42; p. 54-58, 2006.

CAPÍTULO 2

Cultivo *in vitro* de embriões de babaçu sob diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado

RESUMO: O babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é uma palmeira oleaginosa com alto valor econômico, e está entre as espécies utilizadas na indústria extrativista brasileira, uma vez que é aproveitada integralmente. Sua propagação é via semente, sendo esta baixa, lenta e desuniforme, por isso, buscou-se a contribuição das técnicas de cultura de tecidos, para melhorar este processo. Este trabalho, objetivou avaliar o crescimento *in vitro* de babaçu sob diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado. Embriões maduros foram inoculados em meio MS 50% das concentrações dos sais, combinados com diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹) e carvão ativado (0 e 2 g.L⁻¹). Foram realizadas contagens em dias alternados para avaliação da porcentagem de germinação e IVG. Aos 30, 60, 90 e 120 dias, avaliou-se o comprimento médio de plântulas e aos 120 dias de cultivo foram avaliados: formação do pecíolo cotiledonar, da parte aérea, enraizamento e oxidação dos explantes. Verificou-se que a utilização de 15 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo, na ausência de carvão ativado, promoveu as melhores médias para formação da parte aérea e enraizamento; não é necessário o uso de carvão ativado para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.)

Palavras-Chave: *Orbignya oleifera* (Burret.), biodiesel, Arecaceae.

ABSTRACT: Babassu (*Orbignya oleifera* Burret.) is an oilseed palm with high economic value which is used in Brazilian extractivist industry, once that completely utilized. The propagation by seed is low, slow and irregular, so tissue culture techniques are important to improve this process. The purpose of this work was to evaluate the *in vitro* growth of babassu under different concentrations of sucrose and activated charcoal. Mature embryos were inoculated in MS 50% of salt concentration, combining different sucrose concentrations (0, 15, 30, 45 and 60 g.L⁻¹) and activated charcoal (0 and 2 g.L⁻¹). The percentage of germination and germination speed index (GSI), were evaluated on alternate days. At 30, 60, 90 and 120 days were evaluate the average length seedling and at 120 days: cotyledonar petiole growth, length of shoots and roots and explants oxidation. Culture medium containing 15 g.L⁻¹ of sucrose and absence of activated charcoal promoted the best formation of shoots and roots. It is not necessary to use activated charcoal for *in vitro* culture of zygotic embryos of babassu (*Orbignya oleifera* Burret.)

Key Words: *Orbignya oleifera* (Burret.), biodiesel, Arecaceae.

INTRODUÇÃO

O babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é uma palmeira nativa do Brasil, que se encontra distribuída nos estados de Goiás, Tocantins, Maranhão, Pará e Piauí. A região dos babaçuais compreende 18,5 milhões de hectares de floresta, de forma extrativista do fruto, um produto com alto valor comercial e industrial, cuja exploração envolve o trabalho de mais de 300 mil pessoas (ALBIERO et al., 2007). O potencial do babaçu continua inexplorado sendo possível o aproveitamento econômico para produção de carvão, óleo combustível, gás, lubrificante e óleo comestível. No que tange a produção de óleo combustível, o óleo de babaçu possui características excelentes para produção de biodiesel, por ser sua composição predominantemente láurica (LIMA et al., 2007).

Assim, como para a maioria das palmeiras, a multiplicação do babaçu ocorre via semente. A inconveniência deste tipo de propagação é que além do longo período e do lento crescimento, as plantas originadas deste processo possuem alta variabilidade por se tratar de um tipo gâmico de multiplicação. Por esse motivo, a utilização de técnicas para promover a propagação vegetativa é sem dúvida, um importante passo para a domesticação e exploração racional deste tipo de palmeira (PEREIRA et al., 2006).

A propagação *in vitro* constitui uma ferramenta importante para plantas com dificuldade de serem multiplicadas vegetativamente, como é o caso das Arecaceae (LEDO et al., 2001). Assim, a cultura de embriões zigóticos é recorrida por ser de grande valia na produção de mudas uniformes dessas espécies, por permitir, dentre outras aplicações, a produção de plantas livres de patógenos e aceleração dos programas de melhoramento (MELO et al., 2001).

Habitualmente as culturas mantidas *in vitro* são heterotróficas e a sacarose é a principal fonte de carbono utilizada para facilitar o crescimento dos explantes. A sacarose é comumente utilizada como fonte energética e para a manutenção de um potencial hídrico adequado no meio de cultivo. Estudos sobre a demanda por sacarose podem contribuir para maior conhecimento sobre o estado nutricional e de maturação dos embriões, além de fornecer subsídios para entendimento do processo germinativo (FERREIRA et al., 2002; GARCIA et al., 2002).

Dentre os principais problemas relacionados com a propagação via cultura de embriões, está a ocorrência de altos índices de oxidação. A oxidação de compostos fenólicos está relacionada com a liberação de toxinas no meio de cultivo e, normalmente, tem efeito prejudicial ou mesmo limitante ao crescimento do embrião ou de plântulas (MELO et al., 2001). Para reduzir este problema são adicionados ao meio de cultivo, antioxidantes como ácido ascórbico, polivinilpirrolidone (PVP), carvão ativado e incubação inicial dos explantes no escuro. O carvão ativado é utilizado pelo poder de absorver substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, como também pode promover o crescimento de embriões (PASQUAL et al., 1990), ele também absorve 5-hydroxymethylfurfural (composto orgânico derivado de desidratação de determinados açúcares) produzido pela autoclavagem da sacarose, impurezas do ágar, etileno produzido pela cultura, mas também absorve componentes do meio de cultivo, como as vitaminas, citocininas, auxinas e ácido ascórbico (DRUART e WULF, 1993).

Considerando a necessidade da realização de estudos básicos de micropropagação com *Orbignya oleifera* (Burret.), objetivou-se com este trabalho avaliar o crescimento *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu, sob diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura e Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde-GO.

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pela Dra. Maria Cristina de Sousa, da Universidade Federal do Acre, *Campus* Floresta, na cidade de Cruzeiro do Sul - AC. A exsicata se encontra depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás, *Campus* Jataí, sob o número de coleta 5641.

Os frutos foram coletados após a abscisão, no mês de março do ano de 2011, em uma população de plantas ocorrentes na fazenda Santa Bárbara, no município de Piranhas – GO, com as coordenadas 16° 22'015" S - 51° 55'715" W, altitude 389 m.

Após a coleta, os frutos maduros foram selecionados e quebrados em prensa hidráulica para o rompimento do endocarpo. Posteriormente, as amêndoas foram retiradas do interior dos frutos, e os embriões zigóticos foram removidos (Figura 1 A - D).



Figura 1. Frutos maduros de *Orbignya oleifera* (Burret.) (A); prensa hidráulica utilizada para extrair as sementes (B); fruto dobabaçu em corte transversal e em corte longitudinal (C); embriões zigóticos de babaçu (D). (Ep: epicarpo; Me: mesocarpo; En: endocarpo e amêndoas) Foto: Mariluz S. Leite. Rio Verde – GO, 2012.

Assepsia

Os embriões foram revestidos com gaze e imersos em álcool 70% por 1 minuto, em seguida foram imersos em solução a 20% de hipoclorito de sódio - NaOCl (água sanitária comercial – 2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e lavados três vezes com água estéril em câmara de fluxo laminar.

Estabelecimento *in vitro*

Os embriões de babaçu foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio de cultivo MS 50% das concentrações dos sais (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 3,5g.L⁻¹ de Ágar (Marca: Dinâmica®), com diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹) e carvão ativado (0 e 2 g.L⁻¹), ajustando o pH a 5,7±3, autoclavados a 121°C e a pressão de 1,05 kgcm⁻², durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os embriões inoculados foram mantidos em sala de crescimento por 120 dias, com temperatura de 25±3 °C, umidade relativa de 45%, sendo que a cada 30 dias os embriões foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico ao que lhe deu origem, e foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 45-55 μmol m⁻²s⁻¹, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Avaliações e Delineamento experimental

Foram realizadas contagens em dias alternados para avaliação da porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG). Aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo avaliando o comprimento médio de plântulas, e aos 120 dias de cultivo foram avaliados: a germinação, IVG, formação de parte aérea, formação do pecíolo cotiledonar, enraizamento e a oxidação dos embriões zigóticos de babaçu.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5x2, cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹) e duas concentrações de carvão ativado (0 e 2 g.L⁻¹), sendo 10 tratamentos com 25 repetições (cada uma constituída por um tubo de ensaio), totalizando 250 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância com aplicação do teste F a 5% de probabilidade e as médias, analisadas por regressão, com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A semente de babaçu possui o endosperma homogêneo, oleaginoso, de consistência dura, cor branca, ocupando todo o espaço interno da semente (Figura 2 A). O embrião se encontra lateralmente, periférico, de forma cilíndrica, alongado, com uma das extremidades constituída pelo pecíolo cotiledonar e a outra extremidade constituída pelo haustório (Figura 2 B). Verificou-se que a germinação dos embriões teve início após 7º dia de cultivo. Os embriões embeberam, posteriormente houve expansão do pecíolo cotiledonar, e conseqüentemente a redução do haustório (Figura 2 C).

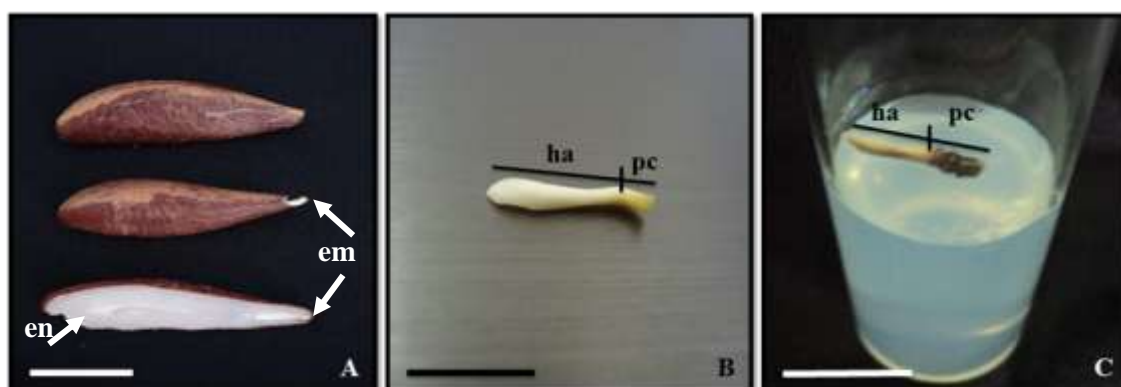


Figura 2- Sementes de *Orbignya oleifera* Burret, inteira e em corte transversal (A), embrião zigótico (B), processo de embebição e crescimento do pecíolo cotiledonar (C) (Barra igual a 1,5 cm de comprimento). **em:** embrião; **en:** endosperma; **pc:** pecíolo cotiledonar; **ha:** haustório. Foto: Mariluz S. Leite. Rio Verde – GO, 2012.

De acordo com a análise de variância, a interação (sacarose x carvão ativado) e o efeito isolado da sacarose e do carvão ativado não influenciaram nas características como a germinação e oxidação dos explantes.

Com relação as demais características avaliadas, comprimento médio de plântulas, formação de parte aérea, pecíolo cotiledonar e raízes, foi verificado que as diferentes concentrações de sacarose exerceram influência na resposta *in vitro*. Já para o vigor, verificou-se que o carvão ativado não exerceu influência.

O modelo de regressão quadrática teve o melhor ajuste em resposta a estas características. Observou-se que para o vigor, na ausência de sacarose e carvão ativado, obteve-se a menor média, à medida que aumentou a concentração de sacarose, na ausência ou presença de carvão ativado, elevando também o vigor (Figura 3A).

Quanto a formação de parte aérea, na ausência de carvão ativado, o ponto máximo na função quadrática indica que 34 g.L⁻¹ de sacarose atingem a maior concentração (40%), quando, então, tem início um decréscimo neste incremento (20%)

para concentração de 60 g.L⁻¹. Já na presença do carvão ativado, o ponto máximo estimado foi de 34,5 g.L⁻¹ de sacarose que produziu maior formação de parte aérea (46%), que decresceu à medida que aumentou a concentração para 60 g.L⁻¹ de sacarose(22%) (Figura 3B).

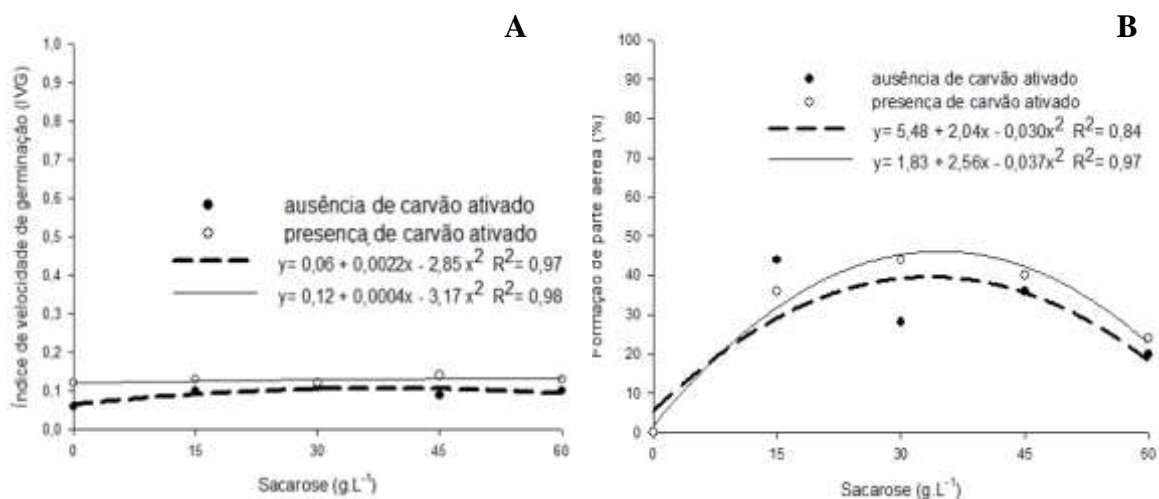


Figura 3- Efeito de diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado no índice de velocidade de germinação (IVG) (A), e formação de parte aérea (B), em embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), avaliados aos 120 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.

Quanto ao comprimento médio de plântulas avaliado aos 30 dias de cultivo, na ausência de carvão ativado, verificou-se que o ponto máximo estimado foi de 35,5 g.L⁻¹ de sacarose, obtendo maior comprimento médio de 2,7 cm, a partir desse ponto com o aumento da concentração para 60 g.L⁻¹ de sacarose, houve um decréscimo no comprimento médio de plântulas para 2,15 cm. Já na presença de carvão ativado, o ponto máximo foi obtido com 57 g.L⁻¹ de sacarose, com média de 3,03 cm (Figura 4 A).

Foi constatado aos 60 dias de cultivo, na ausência de carvão ativado, que 37,5 g.L⁻¹ de sacarose proporcionou plântulas com maior comprimento médio de 3,8 cm, a partir desta concentração teve início um decréscimo neste incremento de 3,03 cm, para concentração de 60 g.L⁻¹. Já na presença de carvão ativado o ponto máximo estimado foi de 46,5 g.L⁻¹ de sacarose, obtendo maior média 4,04 cm (Figura 4 B).

Quanto ao comprimento médio de plântulas avaliado aos 90 dias de cultivo, na ausência de carvão ativado, observou-se que o ponto de máxima foi de 39 g.L⁻¹ de sacarose, obtendo maior comprimento médio de 4,5 cm, em que a partir desse ponto a concentração foi aumentada para 60 g.L⁻¹ de sacarose, houve um decréscimo para 3,60

cm. Já na presença de carvão ativado, o ponto máximo estimado foi de 47 g.L⁻¹ de sacarose que produziu o maior comprimento médio de plântulas 5,05 cm, que decresceu à medida que aumentou a concentração para 60 g.L⁻¹ de sacarose (4,79 cm) (Figura 4 C).

Para avaliação do comprimento médio de plântulas aos 120 dias de cultivo, na ausência de carvão ativado, o ponto máximo estimado foi de 40 g.L⁻¹ de sacarose, obtendo média de 5,05 cm, a partir desse ponto com o aumento da concentração para 60 g.L⁻¹ de sacarose, houve um decréscimo nesse incremento, obtendo média de 4,2 cm. Já na presença do carvão ativado, para atingir o ponto de máxima, utilizando 41,5 g.L⁻¹ de sacarose, obtendo média de 5,12 cm, quando, então, tem início a um decréscimo (4,45 cm) para a concentração de 60 g.L⁻¹ (Figura 4 D).

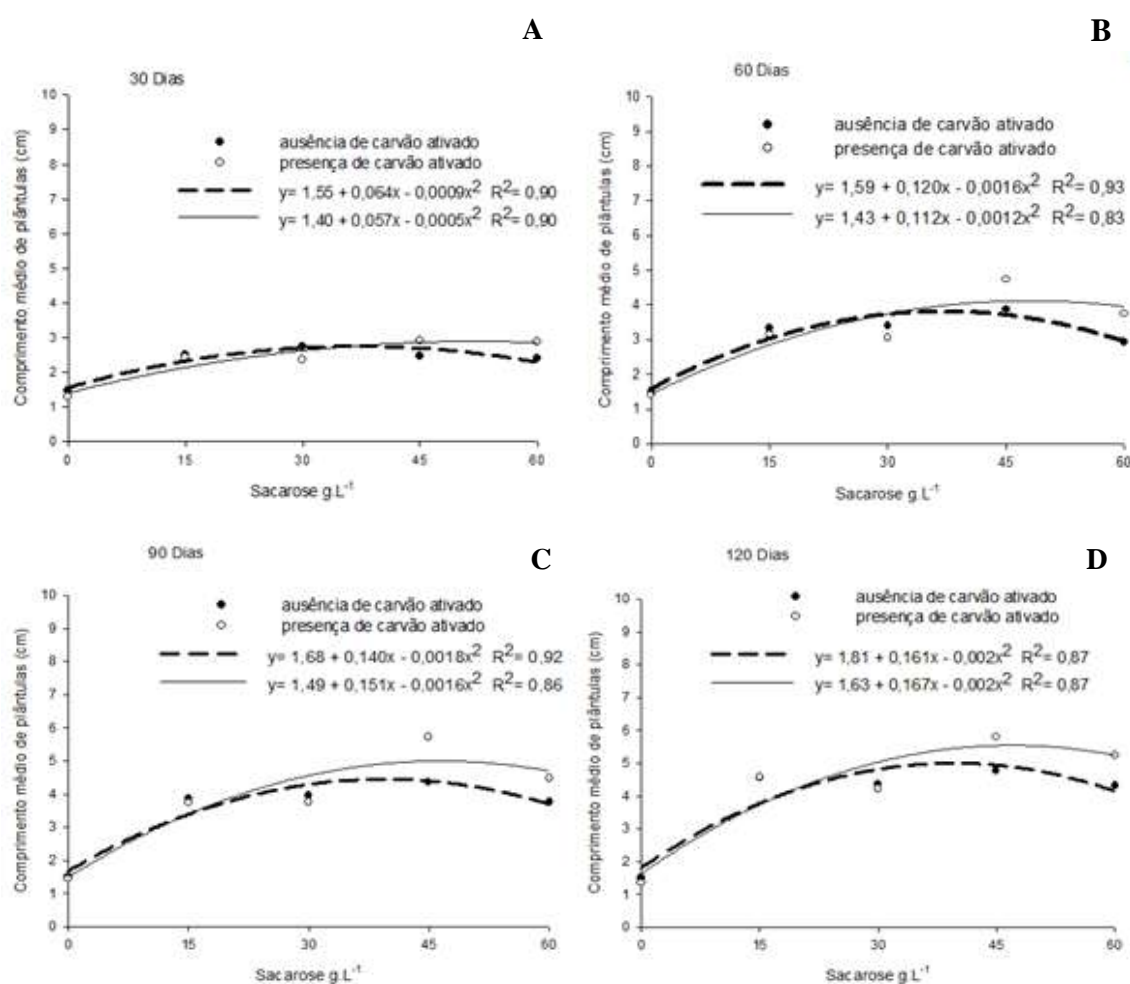


Figura 4- Efeito de diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado no comprimento médio de plântulas de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), avaliado aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.

A maior formação do pecíolo cotiledonar ocorreu quando os embriões foram cultivados em 49 g.L⁻¹ de sacarose (47%). Já na presença do carvão ativado, a maior

formação do pecíolo cotiledonar ocorreu quando os embriões foram cultivados em 60 g.L⁻¹ de sacarose (32,5%) (Figura 5 A).

O maior percentual de plântulas enraizadas quando não utilizado carvão ativado, ocorreu em meio suplementado com 32,2 g.L⁻¹ de sacarose (40,5%). Já na presença de carvão ativado, maior percentual de plântulas com raízes ocorreu em meio suplementado com 38 g.L⁻¹ de sacarose (42,5%) (Figura 5 B).

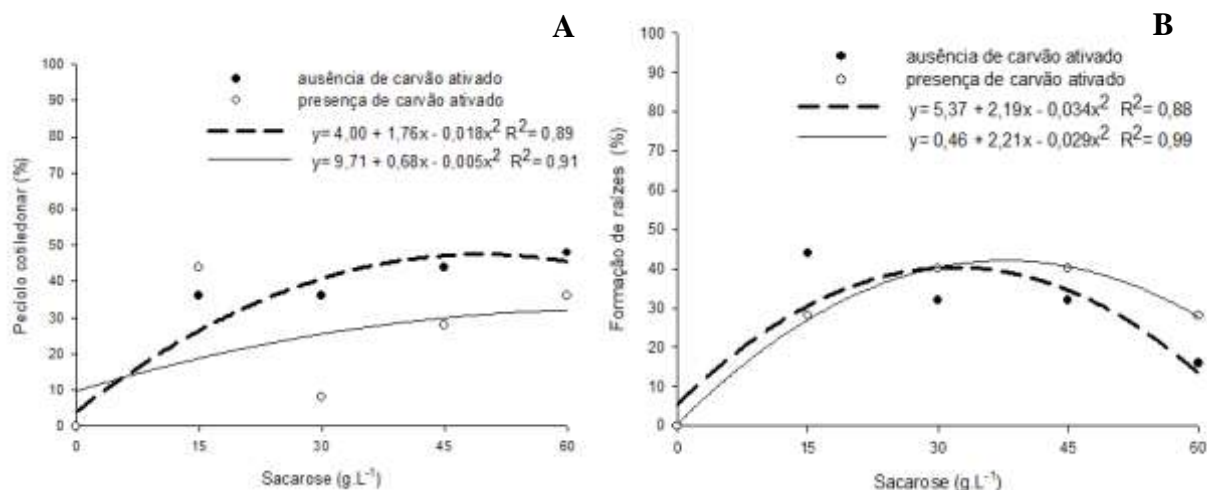


Figura 5- Efeito de diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado na formação de pecíolo cotiledonar (A); na formação de raiz (B), provenientes de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), avaliados aos 120 dias de cultivo. Rio Verde-GO, 2012.

Constatando com os dados estatísticos (Figura 6 A e B), observou-se que os embriões, na ausência de sacarose foram germinados em razão das reservas nutricionais dos cotilédones, porém não houve crescimento.

Nos tratamentos com as menores concentrações de sacarose, houve maior formação de parte aérea e enraizamento, porém menor comprimento médio de plântulas (Figura 6 C e D). Com aumento da concentração de sacarose, foram obtidos os melhores comprimento médio de plântulas e formação do pecíolo cotiledonar, porém menor formação raiz (Figura 6 E, F, G, H, I e J).

Durante todo processo de germinação e crescimento das plântulas, o índice de oxidação foi baixo, e não houve formação de calos.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que, na ausência de carvão ativado, menores quantidades de sacarose foram necessárias para obtenção de plântulas *in vitro*. Já na presença de carvão ativado, verificou-se que nas concentrações mais elevadas de sacarose obtiveram os melhores resultados.

A concentração de 45 g.L⁻¹ de sacarose na presença ou ausência de carvão ativado favoreceu ao maior comprimento médio de plântulas.

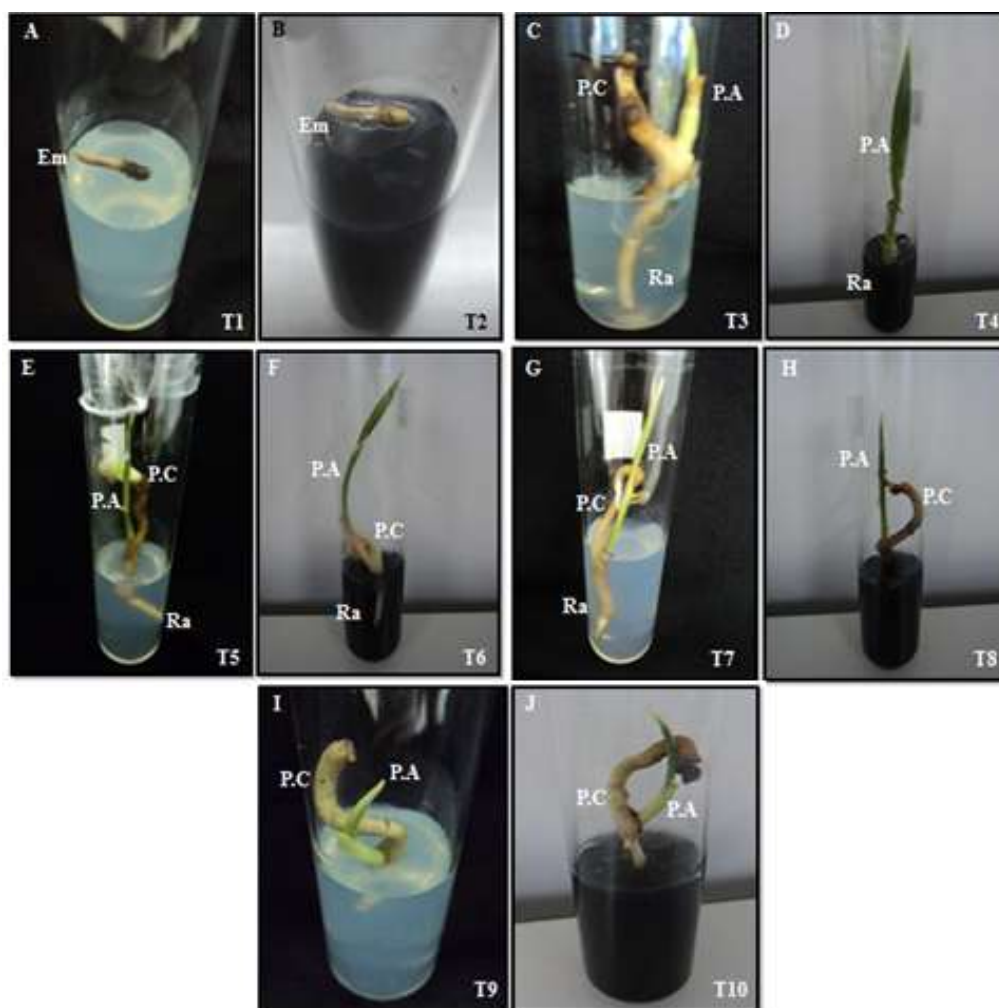


Figura 6- Cultivo *in vitro* de embriões de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) em diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado, avaliados aos 120 dias de cultivo; A) **T1**: carvão ativado (0 g.L⁻¹) e sacarose (0 g.L⁻¹); B) **T2**: carvão ativado (2 g.L⁻¹) e sacarose (0 g.L⁻¹); C) **T3**: carvão ativado (0 g.L⁻¹) e sacarose (15 g.L⁻¹); D) **T4**: carvão ativado (2 g.L⁻¹) e sacarose (15 g.L⁻¹); E) **T5**: carvão ativado (0 g.L⁻¹); e sacarose (30 g.L⁻¹); F) **T6**: carvão ativado (2 g.L⁻¹) e sacarose (30 g.L⁻¹); G) **T7**: carvão ativado (0 g.L⁻¹) e sacarose (45 g.L⁻¹); H) **T8**: carvão ativado (2 g.L⁻¹) e sacarose (45 g.L⁻¹); I) **T9**: carvão ativado (0 g.L⁻¹) e sacarose (60 g.L⁻¹); J) **T10**: carvão ativado (2 g.L⁻¹) e sacarose (60 g.L⁻¹). Embriões germinados sem desenvolvimento (Em); parte aérea (P.A); pecíolo cotiledonar (P.C); raiz (Ra). Rio Verde GO. 2012.

A adição de sacarose no meio para cultivo de embriões zigóticos é observada por vários autores, em diferentes espécies de plantas principalmente para embriões nos

estádios iniciais de desenvolvimento (pró-embriões). De modo geral, quanto mais jovens os embriões, tanto maior será a osmolaridade requerida para o meio (TORRES et al., 2005).

Dados semelhantes foram obtidos por Garcia et al., (2002), trabalhando com embriões zigóticos de oliveira (*Olea europaea* L.), concluíram que o fornecimento exógeno de carboidratos foi dispensável para a germinação, porém, a ausência de sacarose no meio de cultivo, ocasionou baixo nível de desenvolvimento e inviabilizou a obtenção de plântulas para a aclimatização. Já Pereira et al., (2006), em seus trabalhos com embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei* Burret) mostra que baixas concentrações de sacarose também são indicadas para a germinação de embriões obtidos de frutos maduros, e que a adição de 15 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo foi suficiente para atingir os melhores índices de germinação e, concentrações maiores foram necessárias para sustentar o crescimento das plântulas.

Estes dados corroboram com os trabalhos de Ribeiro et al., (2011), que na ausência de sacarose não houve formação de raízes, em embriões zigóticos de coquinho- azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc.], o fato indica a insuficiência de reservas de carboidratos necessários ao desenvolvimento da plântula.

Estes resultados diferem dos obtidos por Ledo et al., (2007), em que observaram que na cultura de embriões de coqueiro anão (*Cocos nucifera* L.) a concentração de 60 g L⁻¹ de sacarose foi necessária para promover o maior desenvolvimento da parte aérea. Para a regeneração *in vitro* de embriões de coqueiro anão o uso de 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultivo foi eficiente na eliminação do escurecimento causado pela oxidação.

Segundo Nicoloso et al., (2001), a adição de carvão ativado ao meio de cultivo nem sempre tem sido vantajosa. Em culturas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen], esses autores relataram que, em presença do carvão ativado, foram observadas respostas negativas tanto da matéria seca da parte aérea quanto do desenvolvimento do sistema radicular. Eles acreditam que a presença do carvão ativado adsorve consideravelmente os elementos químicos presentes no meio, diminuindo a disponibilidade destes.

Em cultura de pereira (*Pyrus communis* L.), a concentração de 1% de carvão ativado adicionado ao meio de cultivo não favoreceu o enraizamento, o que foi associado à capacidade que o carvão ativado tem de reter substâncias (ERIG et al., 2004).

CONCLUSÕES

- A utilização de 15 g.L⁻¹ sacarose no meio de cultivo, na ausência de carvão ativado, promoveu as melhores médias para formação parte aérea e enraizamento.
- Não é necessário o uso de carvão ativado para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.)

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a CAPES, ao CNPq, ao Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde, pelo auxílio financeiro concedido a esta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIERO, D.; MACIEL, A.J.S.; LOPES, A.C.; MELLO, C.A.; GAMERO, C.A. Proposta de uma máquina para colheita mecanizada de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) para a agricultura familiar. **Acta Amazônica**, v.37, n.3, p.337-346, 2007.

DRUART, P.H.; WULF, O. de. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 97-99, 1993.

ERIG, A.C.; WULFFSCHUCH, M.; BRAGA, E. J. B. *In vitro* rooting of pear tree (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.275-277, 2004.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A Computer Statistical Analysis System. **Ciências Agrotécnica**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez., 2011

FERREIRA, M. G. R; CÁRDENAS, F E N; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A; DAMIÃO F.C.F: Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.246-248, 2002.

GARCÍA, J. L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, p. 95-100, 2002.

LEDO, 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**, v.42, 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 açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LIMA, J.R.O.; SILVA, R.B.; SILVA, C.C.M.; SANTOS, L.S.S.; JUNIOR, J.R.S.; MOURA, E.M.; MOURA, C.V.R.; Biodiesel de Babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Revista Química Nova**, v.30, n.3, pg.600-603, 2007.

MELO, B.; PINTO, J.E.B.P.; 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 guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, p.1301-1306, 2001.

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

NICOLOSO, F. T. ERIG, A. C.; MARTINS, C. F. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.1, p.11-18, 2001.

PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; RAMOS, J.D. Influência do GA3 e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja 'Natal'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 10, p. 1477-1482, out. 1990.

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* Burret.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.2, p.251-256, mar./abr.; 2006.

RIBEIRO, L.M.; NEVES, S.C.; SILVA, P.O.; ANDRADE, I.G.; Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc.]. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n.2, p. 133-139, mar/abr, 2011.

TORRES, A.C.; DUVAL, F.G.; RIBEIRO, D.G.; BARROS, A.F.F.; ARAGÃO, F.A.D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.3, p.789-792 jul.-set., 2005.

CAPÍTULO 3

Diferentes tipos de vedações no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu

RESUMO: O babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é uma palmeira altamente oleaginosa, cuja biomassa do fruto são utilizadas para produção de biocombustível. Em razão das dificuldades de germinação da espécie, busca-se a contribuição das técnicas de cultivo de embriões zigóticos, que se destaca como uma alternativa viável para ampliação de estudos sobre a germinação. Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência dos diferentes tipos de vedações na propagação *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu. Embriões maduros foram inoculados em meio MS 50% das concentrações dos sais, vedados de quatro maneiras: tampão de algodão, tampa plástica, película de PVC e tampa plástica envolvidos com película de PVC. Foram realizadas contagens em dias alternados para avaliação da porcentagem de germinação e IVG. Aos 30, 60, 90 e 120 dias, avaliou-se o comprimento médio de plântulas e aos 120 dias de cultivo foram avaliados: formação do pecíolo cotiledonar, da parte aérea, enraizamento e oxidação dos explantes. Verificou-se que o tipo de vedação dos tubos de ensaio influenciou significativamente o crescimento de plântulas de babaçu; o uso de tampão de algodão proporcionou incrementos significativos no crescimento *in vitro* de plântulas de babaçu.

Palavras-Chave: *Orbignya oleifera* (Burret), meio de cultivo, biodiesel.

ABSTRACT: Babassu (*Orbignya oleifera* Burret.) is a highly oleaginous palm whose biomass of fruit is used for biofuel production. Considering difficulties of germination of this species, alternative techniques as zygotic embryos are used to expanding studies of

germination. This study purpose was to evaluate the influence of different types of seal for the *in vitro* propagation of zygotic embryos of babassu. Mature embryos were inoculated in MS 50% of salt concentration, sealed by four ways: cotton plug, plastic cover, PVC film and plastic cover involved by PVC film. The percentage of germination and the germination speed index (GSI), were evaluated on alternate days. At 30, 60, 90 and 120 days were evaluate the average length seedling and at 120 days: cotyledonar petiole growth, length of shoots and roots and explants oxidation. The seal type influenced significantly the seedlings growth of babassu. The cotton plug promoted significant increase *forin vitro* growing of babassu seedling.

Key Words: *Orbignya oleifera* (Burret.), medium culture, biodiesel.

INTRODUÇÃO

O babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) pertence à família Arecaceae (Palmae), e está distribuído em florestas ou em áreas abertas. A palmeira de babaçu é nativa nas regiões centro-oeste, norte e nordeste do Brasil. Os maciçossão localizados em áreas de transição entre as florestas úmidas da bacia amazônica, o cerrado e o semi-árido do nordeste brasileiro, cobrindo aproximadamente 18,5 milhões de hectares distribuídos nos estados do Maranhão, Piauí, Tocantins, Goiás, Amazonas, Pará e Mato Grosso (LIMA et al., 2006).

O babaçu é uma palmeira usada na produção de fibras, carvão, perfume, sabão, óleo de cozinha, lubrificantes e produtos medicinais. Atualmente, a palmeira de babaçu faz parte do cenário amazônico com grande densidade em áreas degradadas que não foram manejadas e conseqüentemente abandonadas. Além disso, tem-se observado a incidência dessas plantas como bioindicadores de ambientes alterados, com forte tendência a aumentar sua densidade em áreas pertinentes às conseqüências dos impactos ambientais (cultivos, pastagens e capoeiras) (MIRANDA et al., 2001).

Tem importância também para a indústria de combustíveis, como uma forma de biodiesel, em que a utilização da biomassa do fruto para produção de biocombustível é de grande interesse econômico (MARTINS et al., 2009). Por causa dos métodos de processamento, o óleo das sementes oferece um rendimento de extração de 67% e pode ser usado em forma pura ou misturado à gasolina em motores a diesel (LIMA et al., 2007).

No entanto, a germinação de espécies da família *Arecaceae* é lenta, irregular e, muitas vezes tem uma baixa taxa de multiplicação, sendo que sua forma de propagação ocorre de forma sexuada (MARCOS FILHO, 2005). Dadas as dificuldades de germinação do babaçu, o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos é uma técnica promissora para avançar o conhecimento desta espécie que é difícil de propagar por outros meios, permitindo assim, o estudo do crescimento embrionário, contribuindo para reduzir o tempo necessário para a produção da planta (PEREIRA et al., 2006; TZEC-SIMA et al., 2006).

O cultivo *in vitro* é um fator dependente da fonte de carbono, uma vez que o material vegetal não está em condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e, às vezes, não encontram teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento (NEPOMUCENO et al., 2009).

Entre as fontes de carbono, a sacarose é a mais utilizada em plantas cultivadas *in vitro*, é considerada a melhor fonte para o crescimento e diferenciação dos tecidos, além de ser absorvida com maior rapidez (SKREBSKY et al., 2004).

Outro fator de importância a ser observado no cultivo *in vitro* de plantas, refere-se ao microambiente no interior dos frascos de cultivo, que pode estar diretamente relacionado ao tipo de vedação utilizada. Na maioria dos casos, o tipo de vedação é o que determina o nível de trocas gasosas com ambiente externo, que por sua vez pode estar relacionada com a variabilidade no comportamento das culturas (SOUZA et al., 2007).

O tipo de vedação de frasco interfere na aeração e na incidência de luminosidade para os cultivos *in vitro*. Vedações que não são hermeticamente fechadas permitem maiores trocas gasosas entre o ar atmosférico e o ambiente interno dos frascos, promovendo melhor transpiração das folhas e impedindo o acúmulo de etileno (FILHO et al., 2002). Verifica-se que quando ocorre o aumento do CO₂, há redução da umidade relativa e da concentração de etileno em torno da planta. Para tanto, utiliza-se alguns métodos, tais como perfurar a tampa e preencher o orifício com tampões, fazer aberturas laterais nos recipientes de cultura ou tampar os frascos com um filtro, que podem ser usados para aumentar as trocas gasosas (KOZAI e NGUYEN, 2003).

Diante desses fatos e em razão da falta de relatos sobre o cultivo *in vitro* de *Orbignya oleifera* (Burret.), objetivou-se com este trabalho avaliar a influência dos diferentes tipos de vedações na propagação *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura e Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde-GO.

A classificação da espécie em estudo foi efetuada pela Dra. Maria Cristina de Sousa, da Universidade Federal do Acre, *Campus* Floresta, na cidade de Cruzeiro do Sul - AC. A exsicata se encontra depositada no Herbário Jataiense, da Universidade Federal de Goiás, *Campus* Jataí, sob o número de coleta 5641.

Os frutos foram coletados após a abscisão, no mês de março do ano de 2011, em uma população de plantas ocorrentes na fazenda Santa Bárbara, no município de Piranhas – GO, com as coordenadas 16° 22'015''S - 51° 55'715'' W, altitude 389 m.

Posteriormente os frutos foram quebrados em uma prensa hidráulica para o rompimento do endocarpo. Em seguida, as amêndoas foram retiradas do interior do fruto e os embriões zigóticos foram removidos com auxílio de um bisturi.

Assepsia

Os embriões foram revestidos por gaze e imersos em álcool 70% por 1 minuto, em seguida foram imersos em solução a 20% de hipoclorito de sódio - NaOCl (água sanitária comercial – 2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e lavadas três vezes com água estéril em câmara de fluxo laminar.

Estabelecimento *in vitro*

Os embriões de babaçu foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 20 mL de meio MS 50% das concentrações dos sais (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 30 g.L⁻¹ de sacarose, suplementado com 3,5g L⁻¹ de Ágar (Dinâmica®), tendo o pH ajustado a 5,7±3. Posteriormente o meio foi autoclavado a 121°C e a pressão de 1,05 kgcm⁻², durante 20 minutos. Os tubos de ensaio contendo os embriões foram vedados de quatro maneiras: tampão de algodão, tampa plástica (polipropileno), película de PVC e tampa plástica envolvidos com película de PVC. Os tubos de ensaio contendo os embriões inoculados foram mantidos em sala de crescimento por 120 dias, com temperatura de 25±3 °C, umidade relativa de 45%, sendo que a cada 30 dias os embriões foram transferidos para um novo meio de cultivo, idêntico ao que lhe deu

origem, e foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtidas a partir de lâmpadas fluorescentes brancas.

Avaliações e Delineamento experimental

Foram realizadas contagens em dias alternados para avaliação da porcentagem de germinação e IVG. Aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, foi avaliado o comprimento médio de plântulas e aos 120 dias foram avaliados a formação do pecíolo cotiledonar, da parte aérea, enraizamento e a oxidação dos embriões zigóticos de babaçu.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo quatro tratamentos (tampão de algodão, tampa plástica, película de PVC e tampa plástica envolvidos com película de PVC) com 30 repetições, constituída por um tubo de ensaio, totalizando 120 unidades experimentais. Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante análise de variância, testando as médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. O programa utilizado para análise dos dados foi software SISVAR (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os tratamentos ocorreram a germinação dos embriões, sendo viável a multiplicação *in vitro* de babaçu via embriões zigóticos.

O crescimento dos embriões foi evidenciado pelo alongamento do pecíolo cotiledonar, dando origem a formação da parte aérea e enraizamento das plântulas. A parte aérea foi emitida aos 90 dias de cultivo, sendo formada a partir do pecíolo cotiledonar, que se abre uma fenda próxima a região da raiz. Já as raízes foram identificadas aos 120 dias de cultivo, formadas na região inferior do pecíolo cotiledonar. Não houve oxidação dos explantes em nenhum dos tratamentos (Figura 1 A, B, C e D).

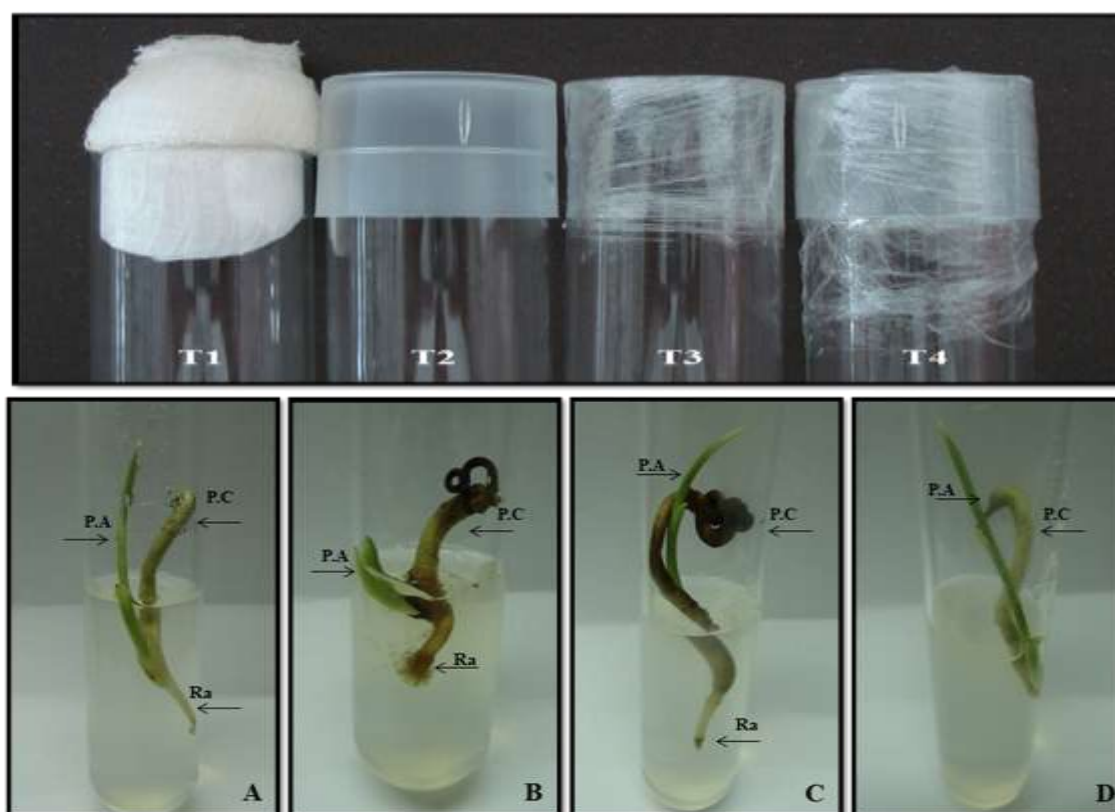


Figura 1- Cultivo in vitro de *Orbignya oleifera* (Burret.), 120 dias em meio 50% MS, com diferentes tipos de vedação. T1: Tampão de algodão (A); T2: tampa plástica; (B); T3: película de PVC (C) e T4: tampa plástica envolvidos com PVC (D). P.A: parte aérea; P.C: pecíolo cotiledonar e Ra: raiz. Rio Verde-GO, 2012. Foto: Mariluzia Silva Leite.

Verificou-se, pela análise de variância que os tipos de vedação exerceram efeitos para as características: IVG, comprimento médio de plântulas, avaliado aos 30 e 120 dias de cultivo e formação de raízes (Tabela 1).

As características: comprimento médio de plântulas, avaliado aos 60 e 90 dias de cultivo, formação do pecíolo cotiledonar, parte aérea e a oxidação não houve significância.

As plântulas mais vigorosas ocorreram nos tubos vedados com tampão de algodão (Tabela 1).

Quanto ao comprimento médio de plântulas, avaliado aos 30 dias de cultivo, observou-se que a maior média obtida foi de 2,43 cm, quando os tubos foram vedados com tampão de algodão.

Para o comprimento médio de plântulas, avaliado aos 120 dias de cultivo, verificando que os tubos vedados com tampão de algodão e com película de PVC,

foram os que promoveram maiores comprimentos, médias de 5,38 e 5,00 cm (respectivamente). Os menores comprimentos médio de plântulas foram obtidos nos tubos vedados com tampa plástica e tampa plástica envolvida com PVC, médias de 3,92 e 4,36 cm (respectivamente).

Quanto a formação de raízes, observou-se que a menor porcentagem (13,0%), foi obtida quando utilizou tampa plástica envolvida com película de PVC.

Tabela 1- IVG, comprimento médio de plântulas, avaliado aos 30 e 120 de cultivos e formação de raízes aos 120 dias de cultivo, em embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.), com diferentes tipos de vedação. Rio Verde-GO, 2012.

Tipos de Vedação	Índice de velocidade de germinação (IVG)	Comprimento médio de plântulas aos 30 dias de cultivo (cm)	Comprimento médio de plântulas aos 120 dias de cultivo (cm)	Formação de raízes (%) aos 120 dias
Tampão de algodão	0,18 a ^z	2,43 a	5,38 a	77,0 a
Tampa plástica	0,11 b	2,00 b	3,92 b	60,0 a
Película de PVC	0,12 b	2,03 b	5,00 a	43,0 a
Tampa plástica com PVC	0,13 b	2,07 b	4,36 b	13,0 b

^zMédias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O ganho nas trocas gasosas, advindo do tampão de algodão, estimulou a formação de raízes suprimindo a maior demanda transpiratória (SANTANA et al., 2008). Ao longo do crescimento das plântulas, ocorreu condensação de água nas paredes interna dos tubos nos tratamentos com tampa plástica e com tampa plástica com película de PVC. O tipo de vedação dos tubos teve grande influência no cultivo *in vitro* é ela que vai determinar o nível de trocas gasosas com o ambiente externo.

Esses dados corroboram com os de Santana et al., 2008, em que as maiores porcentagens de enraizamento em *Annona Glabra* foram de 85% para os tubos vedados com tampa plástica sem a película de PVC e 75% nos tubos vedados com tampão de algodão.

Segundo Kozai e Nguyen, (2003), o fechamento dos frascos de cultivo com tampão de algodão pode favorecer as trocas gasosas, aumentando a concentração de CO₂ e, simultaneamente, reduzindo a umidade relativa e a concentração de etileno.

Dados foram semelhantes com plântulas de angico [*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul], cultivadas em tubos de ensaio fechados com algodão obtiveram maiores percentuais para o comprimento da parte aérea em relação àquelas cultivadas em tubos de ensaio fechados com película de PVC (NEPONUCENO et al., 2009).

Verificou-se que a utilização de tampa plástica e o tampão de algodão dispõem de vantagens no seu uso por prevenir o ressecamento dos explantes, controlar a contaminação, permitir as trocas gasosas com o ambiente externo e, conseqüentemente, diminuir os gastos na produção final das mudas. Tais vantagens tornam o seu uso sempre aconselhável e vários autores têm destacado essa prática como sendo promissora no estímulo ao fotoautotrofismo aprimorando a propagação *in vitro* (NGUYEN & KOZAI, 2001; SANTANA et al., 2008; NEPOMUCENO et al., 2009).

CONCLUSÕES

- O tipo de vedação dos tubos de ensaio influenciou significativamente o crescimento *in vitro* de plântulas de babaçu;
- O uso do tampão de algodão favoreceu o crescimento *in vitro* de plântulas de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.).

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a CAPES, ao CNPq, ao Instituto Federal Goiano *Campus* Rio Verde, pelo auxílio financeiro concedido a esta pesquisa. À Dra. Maria Cristina de Sousa, pela classificação da espécie em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERREIRA, D.F., SISVAR: A Computer Statistical Analysis System. **Ciências Agrotécnica**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez., 2011

FILHO, W. B.; PEREIRA A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus Illicifolia*. **Eclética Química**. v.27 n. especial, São Paulo, 2002.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.757-781, 2003.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, n.4, p.525-537, 2001.

LIMA, J. R. de O; SILVA, R. B. da ; SILVA, C. C. M. da; SANTOS, L. S. S. dos ; SANTOS, J. R. dos Jr.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. de. Use of babassu fiber (exocarp) as alternative raw material in production of agglomerated wood boards. **New Chemistry Journal**, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

LIMA, A.M.; VIDAURRE, G.B.; LIMA, R.M.; BRITO, E.O. Utilização de fibras (epicarpo) de babaçu como matéria-prima alternativa na produção de chapas de madeira aglomerada. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.645-650, 2006.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.

MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; NAKAGAWA, J.; MACHADO, C. G. Drying and storage of jussara seeds. **Tree Journal**. v. 33, n. 4, p. 635-642, 2009.

MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E.M.; RIBEIRO, M.N.S. **Frutos de palmeiras da Amazônia**, Ministério de Ciência e Tecnologia, Instituto Nacional de pesquisa da Amazônia. Manaus. 120 p. 2001.

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

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. O.; PELACANI, C, R.; SANTANA, J. R. F. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) altschul. **Revista Árvore**,v.33, n.3, p.481-490, 2009.

PEREIRA, J. E. S; MARCIEL, T. M. S; COSTA, F. H. da S; PEREIRA, M. A. A. P. *In vitro* germination of zygotic embryos of murmurú (*Astrocaryum ulei*). **Agrotechnical Science**, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L.I., desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciências Agrotécnica**, v.32, n.1, p.80-86, jan./fev., 2008.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v.34, n.5 p.1471-1477, 2004.

SOUZA, J.A; SILVA, L.C.; CORRÊA, M.G.S.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 em função da vedação, sacarose e material de suporte do meio de cultura. **Scientia Agraria**, v.8, n.2, p.161- 164, 2007.

TZEC-SIMA, M.A; ORELLANA, R.e ROBERT, M.L. *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (Mexico). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 42; p.54-58. 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

- O cultivo de embriões zigóticos de babaçu (*Orbignya oleifera* Burret.) é uma alternativa eficiente para o estabelecimento *in vitro*.
- Verificou-se que o meio MS 50% das concentrações dos sais, foi adequado para o cultivo *in vitro* de embriões de babaçu.
- Recomenda-se a combinação de 1 μ M de BAP + 2 μ M de ANA para o cultivo *in vitro* de embriões de babaçu.
- A adição de sacarose ao meio, em concentrações de 15g.L⁻¹, proporcionou plântulas passíveis de serem aclimatizadas.
- A suplementação de carvão ativado no meio de cultivo não influenciou no crescimento *in vitro* de babaçu.
- O uso de tampão de algodão favoreceu o crescimento *in vitro* de plântulas oriundas de embriões de babaçu.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Um dos maiores obstáculos para realização deste trabalho foi a quebra do endocarpo, pelarigidez do fruto, além da dificuldade para retiraras amêndoas do interior do fruto;
- Outro grande desafio foi a retirada dos embriões intactos do interior das amêndoas, com muita atenção, evitando causar injúrias físicas no embrião, porque embriões injuriados não germinaram;
- Outros reguladores de crescimento podem ser testados, como TDZ (Tidiazuron), quando se objetiva a multiplicação da espécie por embriogênese somática, (lembrando que a espécie estudada não perfilha);

