

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
JOÃO HENRIQUE KUROSKI CONSTANTINO

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Syagrus romanzoffiana*
(CHAM.) GLASSMAN (ARECACEAE)

CURITIBA

2023

JOÃO HENRIQUE KUROSKI CONSTANTINO

**CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE *Syagrus romanzoffiana*
(CHAM.) GLASSMAN (ARECACEAE)**

Monografia apresentada como requisito à
obtenção do grau de bacharel, Curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Bomfim
de Alcantara

Co-orientador: Prof. Dr. Bruno Francisco
Sant`Anna-Santos

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Giovana Bomfim de Alcantara, por me dado a chance de desenvolver esse trabalho.

À Angela Cristina Ikeda, técnica no Laboratório de Biotecnologia Florestal, que junto com minha orientadora me auxiliou na realização de todos os experimentos.

A Fundação Araucária pelo apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico realizado no Estado do Paraná.

Aos meu co-orientador Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos e minha orientadora anterior Patricia Soffiatti que foram e continuam sendo referências na jornada acadêmica que eu pretendo seguir.

Aos meus melhores amigos, pelos anos de amizade e companheirismo e aos meus colegas que participaram da minha jornada acadêmica até aqui.

À minha mãe, a pessoa mais importante na minha vida, agradeço pela minha criação, minhas morais, minha educação e agradeço por ter uma mãe tão legal e me apoiar em todos os momentos.

Ao meu irmão e toda a minha família, por todo o apoio que eles ofereçam durante minha vida.

RESUMO

Syagrus romanzoffiana (Cham.) Glassman (Arecaceae), popularmente conhecida como jerivá, é uma espécie de palmeira de ampla distribuição no Brasil. O jerivá está presente na alimentação de animais e do ser humano que consomem tanto o fruto quando o palmito-jerivá. A espécie também apresenta importância medicinal, ornamental e ecológica. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta que facilita a germinação de *S. romanzoffiana*, por apresentar vantagens na superação da dormência da semente. Desse modo, os objetivos do presente trabalho foram estabelecer um protocolo para a germinação *in vitro* de *S. romanzoffiana* a partir da cultura de embriões zigóticos e descrever uma metodologia para a avaliação da viabilidade dos embriões com uso de tetrazólio. Para isso, foram coletados frutos de *S. romanzoffiana*, realizada a excisão dos embriões, estes foram cultivados com ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido giberélico (GA3), perfazendo dois experimentos. Além disso foram avaliados tempo de exposição e concentração do tetrazólio para a avaliação da viabilidade dos embriões. Os resultados mostraram que 39,4% dos embriões do cultivo com 2,4-D e 25% dos embriões do cultivo com GA3 se desenvolveram formando plântulas. Não foi encontrada diferença significativa de massa para as plântulas frescas entre os tratamentos tanto para o 2,4-D quanto para o experimento com GA3. No teste de tetrazólio 75% dos embriões de *S. romanzoffiana* se mostraram viáveis. O protocolo de germinação *in vitro* para *S. romanzoffiana* apresentou resultados satisfatórios de germinação (32,2%) com apenas 27% de contaminação dos meios de cultura.

Palavras-chave: embrião vegetal, palmeira, micropropagação, ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido giberélico (GA3), tetrazólio.

ABSTRACT

Syagrus romanzoffiana (Cham.) Glassman (Arecaceae) also known as queen palm, is a species of palm, widely distributed in Brazil. The queen palm is present in the food of animals and humans who consume both the fruit and the heart of palm. The species also has medicinal, ornamental and ecological importance. *In vitro* cultivation is a tool that helps the germination of *S. romanzoffiana*, as it has advantages in overcoming seed dormancy. Thus, the objectives of the present work were to establish a protocol for the *in vitro* germination of *S. romanzoffiana* from the culture of zygotic embryos and to describe a methodology for the evaluation of the embryo viability with the use of tetrazolium. For this, fruits of *S. romanzoffiana* were collected, the embryos were excised and cultivated with dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or gibberellic acid (GA3), in two experiments. In addition, the exposure time and concentration of tetrazolium were evaluated for embryo viability. The results showed that 39.4% of the embryos cultivated with 2,4-D and 25% of the embryos cultivated with GA3 developed to seedlings. Seedling mass was weighed, and no significant mass difference was found between treatments for both 2,4-D and GA3 experiments. In the tetrazolium test, 75% of the *S. romanzoffiana* embryos were considered viable. The *in vitro* germination protocol for *S. romanzoffiana* showed satisfactory germination results (32.2%) with only 27% contamination of the culture media.

Key-words: plant embryo, palm tree, micropropagation, dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), gibberellic acid (GA3), tetrazolium.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. FAMÍLIA ARECACEAE	9
2.2. GÊNERO <i>Syagrus</i>	9
2.3. JERIVÁ (<i>Syagrus romanzoffiana</i> (Cham.))	10
2.4. CULTIVO VEGETAL <i>IN VITRO</i>	11
2.5. ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)	13
2.6. ÁCIDO GIBERÉLICO (GA3)	13
2.7. TETRAZÓLIO	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. MATERIAL VEGETAL	15
3.2. MEIO DE CULTURA	18
3.3. EXPERIMENTO COM ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) E COM ÁCIDO GIBERÉLICO	18
3.4. EXPERIMENTO COM TETRAZÓLIO	19
4. RESULTADOS	20
4.1. RESULTADOS DO EXPERIMENTO COM ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D)	21
4.2. RESULTADOS DO EXPERIMENTO COM ÁCIDO GIBERÉLICO	23
4.3. ANÁLISE DO EXPERIMENTO COM TETRAZÓLIO	24
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

Syagrus romanzoffiana (Cham.) Glassman popularmente conhecida como jerivá, pertencente à família Arecaceae, é uma palmeira nativa da América do Sul com distribuição no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (BEGNINI et al., 2013). Seu fruto possui importância na alimentação de diversas espécies de animais. Na alimentação humana o fruto e o palmito-jerivá são consumíveis, além de ter importância medicinal e ornamental tanto para o paisagismo urbano quanto para o ecossistema (BEGNINI et al., 2013; NOBLICK, 2017; RAUPP et al., 2007).

As sementes de *S. romanzoffiana* apresentam taxa de germinação baixa (26%) assim como baixa velocidade de emergência (10%) devido a existência de um mecanismo de dormência (GUION & KAGEYAMA, 1996; SOARES OLIVEIRA et. al., 2015), sendo evidenciado por compostos fenólicos inibidores da germinação (JOSÉ et al., 2000). A emergência pela germinação é lenta, entre 90 a 180 dias. Com o objetivo de acelerar a germinação e facilitar a produção de mudas, além da remoção da polpa auxiliar na germinação da semente o cultivo de embriões *in vitro* apresenta-se como uma alternativa para essa espécie (GUION & KAGEYAMA, 1996).

O cultivo *in vitro* de plantas é uma ferramenta que dá suporte para diversas linhas de pesquisa nas áreas de genética, fisiologia vegetal, fitopatologia, fitotécnica, entre outras (BARRUETO CID & TEIXEIRA, 2015). Um dos usos para o cultivo *in vitro* a partir do embrião é possibilitar a propagação de espécies cuja dormência da semente pode ser difícil de superar (RIBEIRO et al., 2011). Principalmente para as sementes de palmeiras (WALDOW et al., 2013).

Waldow et al. (2013) estabeleceram um protocolo para germinação *in vitro* de *Butia eriospatha* (Arecaceae) usando embriões zigóticos. Assim como *S. romanzoffiana*, *B. eriospatha* também tem um processo de germinação lento. E para o estudo da germinação de *Butia capitata* (Arecaceae) foi utilizado ácido giberélico (GA3) a fim de induzir o processo de germinação das sementes (DIAS et al., 2013). De acordo com Dias et al. (2013), *B. capitata* (Arecaceae) é classificada como uma espécie de dormência não profunda devido a eficiência do GA3 na germinação.

Ainda são escassos os trabalhos com germinação *in vitro* de *S. romanzoffiana*. Um dos trabalhos mais recentes que trata da germinação das sementes de *S. romanzoffiana* é de Soares et al. (2015), que realizaram um experimento de germinação enterrando as sementes e acompanhando o desenvolvimento a cada mês durante um ano, assim como do teste de tetrazólio. A germinação máxima obtida no trabalho foi de 26%, enquanto que o teste de tetrazólio apresentou uma viabilidade de 80% para as sementes da espécie.

A cultura *in vitro* a partir de embriões pode ser viável para muitas espécies que apresentam dificuldade de germinação e um tempo muito longo para a produção de mudas como é o caso de *S. romanzoffiana*. E a propagação *in vitro* tem sido utilizada para muitas outras espécies de palmeiras como, por exemplo, *Acrocomia aculeata* (SOARES et al., 2011), *Butia capitata* (RIBEIRO et al., 2011), *Elaeis guineensis* (BRAZILIO et al., 2012), *Astrocaryum huaimi* (GUIMARÃES et al., 2012), *Orbignya oleifera* (ALBERTO et al., 2012), *Astrocaryum aculeatum* (RODRIGUES et al., 2013) e *Syagrus coronata* (SANTOS-MOURA, 2013).

No presente trabalho utilizamos a metodologia da propagação *in vitro* para avaliar a germinação dos embriões de *S. romanzoffiana* em meio de cultura, contendo dois compostos que atuam como indutores de germinação. Foram utilizados ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido giberélico (GA3), e coletados os dados do desenvolvimento dos embriões em plântulas e da massa que as plântulas desenvolvidas atingiram. Também foi conduzido o teste de tetrazólio para os embriões da espécie.

Os objetivos da presente monografia foram estabelecer um protocolo para a germinação *in vitro* de *S. romanzoffiana* a partir da cultura de embriões zigóticos e descrever uma metodologia utilizando tetrazólio para a avaliação da viabilidade dos embriões.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FAMÍLIA ARECACEAE

A característica arborescente de grande parte das palmeiras as distinguem das outras monocotiledôneas, que são em maioria plantas herbáceas. Possuem uma morfologia marcante, os caules são geralmente eretos e colunares e possuem uma terminologia quase que exclusiva para a família: estipe. Mas a diversidade morfológica também é expressiva na família, havendo também representantes com caules prostrados, subterrâneos e até mesmo modificados para o hábito lianescente. E suas sementes variam de alguns milímetros de diâmetro até a maior semente conhecida “coco de mer” (*Lodoicea maldivica* (J. F. Gmelin) Persoon) que chega a pesar até 25 kg (DEL POZO et al., 2020; DE SOUZA et al., 2020).

As palmeiras podem ser encontradas nas regiões tropicais e subtropicais pelo mundo, possuem grandes variações em termos de riqueza de espécies e morfologia. É estimado que existam nessa família cerca de 2600 espécies e 181 gêneros. As palmeiras são importantes especialmente em comunidades rurais, onde são matéria-prima para construção, tecidos, combustível, alimento, além de terem uso medicinal e ornamental nas grandes áreas urbanas (DEL POZO et al., 2020; DE SOUZA et al., 2020).

As palmeiras também apresentam interações ecológicas com muitas espécies, sendo fonte de recursos fundamentais para espécies polinizadoras e frutívoras, sendo assim, necessárias em projetos de reflorestamento (EISERHARDT et al., 2011). Dado esse grande interesse no grupo e a ameaça da expansão das atividades antrópicas, muitas espécies da família estão ameaçadas de extinção (NUNES et al., 2008).

2.2. GÊNERO *Syagrus* Mart.

Syagrus é um gênero de palmeiras pertencentes a tribo Cocoseae (subfamília Arecoideae), subtribo Attaleinae (NOBLICK, 2017). Predominantemente sul-americano, grande parte das espécies do gênero são nativas do Brasil. Sua distribuição pelo continente se estende da região leste da Colômbia até a Guiana

Francesa, do sul do Uruguai e norte da Argentina, sendo o Chile o único país que não possui representantes do gênero (NOBLICK, 2017). Existem atualmente 69 espécies, 1 subespécies e 14 híbridos naturais (NOBLICK, 2017; 2018; SOARES E GUIMARÃES 2019; SANT'ANNA-SANTOS ET AL. NO PRELO). As espécies do gênero *Syagrus* ocupam uma variedade de habitats, como as florestas tropicais úmidas, Amazônia e a Mata Atlântica, e também regiões mais secas como a caatinga, cerrado e campos rupestres (NOBLICK, 2017).

Morfologicamente, o gênero pode ser reconhecido por espécies que possuem desde caules colunares altos até completamente subterrâneos, dando um aspecto de acaulescente. As folhas são alternadas e dispostas em espiral no caule, às vezes em cinco linhas quase verticais, ligeiramente espiraladas ou em fileiras. As flores são dispostas em espiral nas ráquulas, são unissexuais com flores masculinas e femininas encontradas na mesma inflorescência. As inflorescências são interfoliare, eretas ou pendentes, espigadas (não ramificadas) ou ramificadas em uma ordem com poucos ou numerosos ramos florais (ráquulas). Os frutos de *Syagrus* apresentam apenas uma semente, com raras exceções, o mesocarpo é polposo e possui fibras longitudinais, o endocarpo é duro (NOBLICK, 2017). De 1987, ano da última revisão sobre o gênero até a realizada por Noblick, em 2017, o número de espécies conhecidas de *Syagrus* praticamente dobrou, devido ao acesso a áreas ainda não exploradas e ao aumento do número de estudantes atuando com a família Arecaceae (NOBLICK, 2017).

2.3. JERIVÁ (*Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman)

Syagrus romanzoffiana (Figura 1), espécie popularmente conhecida como jerivá ou jeribá, é uma palmeira nativa da América do Sul com larga distribuição no Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (NOBLICK, 2017). *S. romanzoffiana* é a espécie com distribuição mais meridional, sendo encontrada em diversos habitats nas florestas semidecíduas da Bacia do Paraná e na Mata Atlântica, também nas estepes, restingas, campos e na mata de araucárias. (JORGE et al., 2021; NOBLICK, 2017; SOARES, 2023).



Figura 1 - *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman (família Arecaceae). Espécime localizada no *Campus* Politécnico da UFPR (A) e espécime localizada próximo ao Jardim botânico de Curitiba (B).

Syagrus romanzoffiana possui importância como fonte de alimentação para diversas espécies de animais, seus frutos e sementes são consumidos por uma ampla variedade de insetos, aves e mamíferos (LISTAR REFERENCIA). Na alimentação humana, os frutos e o palmito-jerivá também são apreciados e apresentam importância medicinal e ornamental (NOBLICK, 2010; 2017). É largamente cultivada no Brasil e ao redor do mundo, o que a torna uma das espécies de palmeira mais comum crescendo em ambiente nativo ou em cultivo (NOBLICK, 2017). Floresce e frutifica durante quase o ano todo, mais intensamente nos meses de setembro a janeiro, a maturação dos frutos ocorre principalmente entre janeiro e abril (NOBLICK, 2017). Seus frutos são lisos globosos, com polpa fibrosa e carnosa de cor amarela (NOBLICK, 2017).

2.4. CULTIVO VEGETAL *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* de plantas é uma ferramenta que dá suporte para diversas linhas de pesquisa nas áreas de genética, fisiologia vegetal, fitopatologia, fitotécnica, entre outras. O cultivo *in vitro* pode ser utilizado para obter plantas mais resistentes e

produtivas, além de promover avanços tecnológicos como a descoberta das citocininas, protoplastos, haploides, limpeza clonal e também aprimorando os meios nutritivos e os métodos de micropropagação (BARRUETO CID & TEIXEIRA, 2015).

Devido a capacidade das plantas para a reprodução assexuada são desenvolvidas práticas que exploram essa capacidade como, o enraizamento de estacas, a enxertia, apomixia e a micropropagação, esta realizada *in vitro*. Comercialmente é mais interessante que espécies e cultivares sejam propagados assexuadamente para preservar e garantir a uniformidade de suas características. Dentre essas práticas a micropropagação oferece uma boa relação custo-benefício, permite a uniformidade e controle das condições nas quais as amostras estão sujeitas além de ser possível a produção em grande escala do material selecionado (BARRUETO CID & TEIXEIRA, 2015).

Um dos usos para o cultivo *in vitro* a partir do embrião é possibilitar a propagação de espécies cuja dormência pode estar relacionada com as características do envoltório da semente que protege o embrião, isso permite o estudo do processo de germinação e do desenvolvimento inicial das plantas (RIBEIRO et al., 2011). Para algumas sementes como as de palmeiras, o cultivo *in vitro* se torna uma alternativa que facilita a superação da dormência e germinação. E por ficarem protegidos dentro da semente os embriões são explantes que apresentam baixa taxa de contaminação (WALDOW et al., 2013).

Garantida a qualidade do explante e a assepsia do processo, o outro componente para a realização do cultivo *in vitro* é o meio nutritivo ou meio de cultura. O meio de cultura é o responsável pela sobrevivência do explante. Os fatores a serem considerados no protocolo de confecção do meio são: o tipo de meio, como o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962); suplementos de reguladores de crescimento; concentração de sacarose; seus macronutrientes (cálcio, magnésio, enxofre, potássio, fósforo e nitrogênio) e micronutrientes (zinco, ferro, cobre, manganês, cloro, molibdênio e boro), além de água destilada, pH e vitaminas. Demais componentes do meio de cultivo são especificados em cada protocolo e determinados por cada experimento (BARRUETO CID & TEIXEIRA, 2015).

2.5. ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

O ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) é uma auxina sintética derivada do ácido fenoxiacético e também um herbicida amplamente utilizado em todo o mundo. É utilizado no controle de diversas ervas daninhas e para o manejo florestal. Historicamente vem sendo utilizado desde a Guerra do Vietnã pelos Estados Unidos como um agente desfolhante, onde junto com o ácido triclorofenoxiacético (2,4,5 - T) e o pentaclorofenol (PCF) forma o "agente laranja" (AMARANTE et al., 2003).

Como auxina, o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) pode ser usado em concentrações não tóxicas a fim de mimetizar os efeitos de auxinas naturais e estimular o crescimento das plantas (FRÖHLICH et al., 2021). Pode ser uma auxina alternativa ao ácido indolbutírico (AIB), como observado no enraizamento de estacas de porta-enxertos de videira (TOFANELLI, 2014), ou também, na promoção do desenvolvimento e produção de plantas de soja (FRÖHLICH, 2021).

O uso de 2,4-D sintético para induzir o crescimento de embriões somáticos é traçado até os trabalhos de Halperin e Wetherell (1964) que mostraram que um calo era produzido a partir de qualquer parte de uma cenoura e que esses calos formavam embriões somáticos ao serem transferidos para meios com níveis reduzidos de auxina. Essa técnica foi adotada como padrão para o estudo da embriogênese somática (RAGHAVAN, 2004).

No trabalho desenvolvido por Waldow et al. (2013) foi estabelecido um protocolo para germinação *in vitro* de *Butia eriospatha* usando embriões zigóticos. Assim como *Syagrus romanzoffiana*, *B. eriospatha* também tem um processo de germinação lento, utilizando teste de tetrazólio e cultivo contendo tratamentos com ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) os autores obtiveram uma taxa de 80% de embriões viáveis com o uso do 2,4-D.

2.6. ÁCIDO GIBERÉLICO (GA3)

As giberelinas são um grupo de hormônios vegetais que atuam no controle do desenvolvimento de vários processos como germinação, alongamento do caule, floração, formação dos frutos e crescimento das plantas (SERRANI et al., 2007). O

ácido giberélico (GA3), obtido de forma sintética, pode ser usado para obter uma resposta de crescimento e desenvolvimento da planta (PEDÓ, et al., 2018).

O ácido giberélico também apresenta uma função de superação de dormência de sementes. Como observado no trabalho de Rego et al. (2018), o ácido giberélico auxilia na superação da dormência fisiológica de sementes de graviola (*Annona muricata*) e de sementes de maracujá-suspiro (*Passiflora nitida*) (PASSOS et al. 2004). No trabalho desenvolvido com *Butia capitata* (Arecaceae) por Dias et al. (2013) eles utilizaram ácido giberélico para estudar os seus efeitos na germinação das sementes. Nesse trabalho classificação *B. capitata* como uma espécie de dormência não profunda devido a eficiência do GA3 em estimular a germinação.

Sendo um hormônio que atua em diversos processos de crescimento nas plantas, os trabalhos envolvendo giberelinas possuem diversas outras abordagens, por exemplo, na aplicação exógena de ácido giberélico em plantas de feijão e as respostas no desenvolvimento das sementes (PEDÓ et al., 2018) ou do papel da giberelina no crescimento dos frutos de tomates (JONG et al., 2009; SERRANI et al., 2007).

2.7. TETRAZÓLIO

A partir do século 20, com o crescimento da produção agrícola em massa, a avaliação da qualidade fisiológica das sementes se tornou foco de tecnologistas, produtores e pesquisadores do sistema de produção de sementes. Fazia-se necessário um método rápido e preciso para determinar a viabilidade das sementes (FRANÇA-NETO & KRZYŻANOWSKI, 2018; SOUSA et al., 2017). Surgiram diversos testes baseados na coloração, aspecto, peso volumétrico, densidade, velocidade de embebição, atividades enzimáticas nas sementes, mas que não mostraram sucesso pois não avaliavam sementes individualizadas e eram pouco precisos (FRANÇA-NETO & KRZYŻANOWSKI, 2018).

O pesquisador da área de fisiologia de sementes, Dr. Georg Lakon, vinha estudando métodos de coloração a partir da redução de sais de selênio para a determinação da viabilidade de sementes. Na busca de um sal similar, mas não tóxico e que apresentasse a mesma finalidade, ele concluiu que o 2,3,5-trifenil cloreto de

tetrazólio era apropriado para a função e desenvolveu métodos para várias sementes de cereais e para milho. O teste está entre as Regras para Análise de Sementes, usado pelo Ministério da Agricultura do Brasil (BRASIL, 2009). Hoje é um dos principais testes dentre os diversos métodos de avaliação da viabilidade de sementes pela indústria, se destacando para sementes que apresentam dormência e as que germinam lentamente, em amostras ou individualmente (FRANÇA-NETO & KRZYZANOWSKI, 2018).

O teste se baseia na determinação da atividade de enzimas desidrogenase envolvidas no processo de respiração celular. Essas enzimas provocam a reação de redução do sal de tetrazólio que, portanto, ocorre apenas em células vivas e resulta na formação de um composto de coloração vermelha mais intensa nos tecidos do embrião da semente, enquanto que os tecidos não viáveis mantem sua coloração original (FRANÇA-NETO & KRZYZANOWSKI, 2018; SOUSA et al., 2017; IOSSI et al., 2016). Para cada espécie é necessário o desenvolvimento de uma metodologia eficiente e adaptada do teste de tetrazólio. Fatores como as condições de armazenamento, pré-condicionamento e avaliação da coloração da semente ou dos embriões são particulares de cada espécie vegetal (IOSSI et al., 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Os frutos de matrizes de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman foram coletados na região urbana de Curitiba - PR nos meses de outubro e novembro de 2022. As matrizes estão localizadas no *campus* Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (lat: -25.449390, long: -49.233082) (Figura 2), no *campus* Botânico (UFPR) (lat: -25.446515, long: -49.238470) e próximo ao Jardim Botânico de Curitiba (lat: -25.439312, long: -49.238191). Os frutos foram armazenados sob refrigeração (4°C), no Laboratório de Biotecnologia Florestal no Departamento de Ciências Florestais da UFPR até o início da etapa de experimentação.



Figura 2 - *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) matriz do *campus* Politécnico (A). Detalhe para o cacho de frutos (B).

A primeira etapa para o acesso ao embrião se deu pela retirada da polpa, esta foi realizada manualmente, seguida pela lavagem em água corrente (Figura 3). As sementes foram secas para a segunda etapa de acesso ao embrião com a abertura da semente. Foi utilizada uma morsa torno de bancada (Figura 4) para romper a semente e acessar o embrião, um método que se mostrou rápido e que garantia a obtenção dos embriões sem danificá-los.

A quebra das sementes foi realizada no momento da inoculação dos embriões nos meios de cultura para diminuir as chances de contaminação, visto que os embriões não foram desinfestados na realização dos experimentos. Todos os experimentos descritos na sequência foram realizados no laboratório de Biotecnologia Florestal no Departamento de Ciências Florestais da UFPR.



Figura 3 - Retirada da polpa e obtenção da semente de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.). Frutos recém lavados (A). A retirada da polpa realizada manualmente em meio de água corrente com o uso de uma pequena espátula (B). Após a retirada da polpa as sementes foram secas para a próxima etapa de abertura da semente (C).

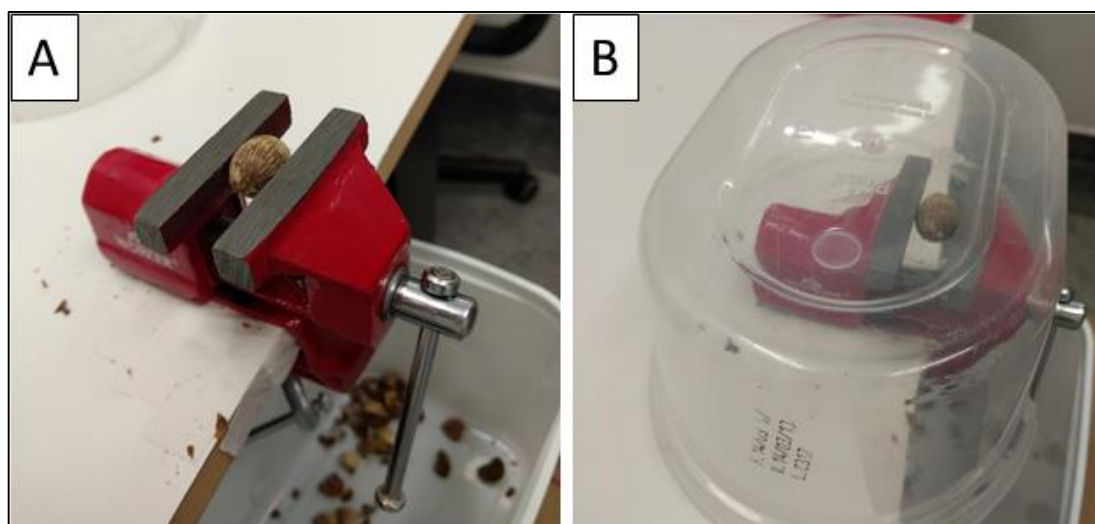


Figura 4 - Morsa torno de bancada usada para a abertura da semente (A). Proteção para evitar a perda da semente e acidentes (B).

3.2. MEIO DE CULTURA

Os embriões foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Tabela 1). Nos experimentos para os tratamentos com o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e com ácido giberélico (GA3) foram utilizadas as seguintes soluções para a preparação de 1000 mL de meio MS: macronutrientes (100 mL), micronutrientes (1 mL), vitaminas (2,625 mL), Fe-EDTA (5 mL), sacarose (30,0 g), ágar (7,0 g) e glutamina (0,5 g) (Tabela 1) (MINARDI et al., 2011).

TABELA 1 - COMPONENTES DAS SOLUÇÕES DE MACRONUTRIENTES, MICRONUTRIENTES, VITAMINAS E FE-EDTA PARA O MEIO DE CULTURA MS

Macronutrientes		Vitaminas	
NH ₄ NO ₃ 10x	16,5 g	Ácido nicotínico 500x	0,25 g
KNO ₃ 10x	19 g	Piridoxina 500x	0,25 g
KH ₂ PO ₄ 10x	1,7 g	Tiamina HCl 500x	0,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O 10x	4,4 g	Meso Inositol 500x	50 g
MgSO ₄ .7H ₂ O 10x	3.7 g	Glicina 500x	1,0 g
Micronutrientes		Fe-EDTA	
MnSO ₄ .H ₂ O 1000x	16,90 g	FeSO ₄ .7H ₂ O 100x	5,56 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O 1000x	8,6 g	EDTA 100x	7,45 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 1000x	0,25 g		
CuSO ₄ .5H ₂ O 1000x	0,025 g		
CoCl ₂ .6H ₂ O 1000x	0,025 g		
H ₃ BO ₃ 1000x	6,2 g		
KI 1000x	0,83 g		

3.3. EXPERIMENTO COM ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D) E COM ÁCIDO GIBERÉLICO

Em ambos os experimentos com ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e com ácido giberélico os embriões foram inoculados em meio de cultura MS (Tabela 1) com 0,25% de carvão ativado. A inoculação dos embriões em meio de cultura foi realizada em câmara de fluxo laminar, e os tubos de ensaio de 50 mL contendo 10mL de meio foram vedados com tampa plástica e envolvidos com papel alumínio para não ficarem expostos a luminosidade e mantidos em sala de crescimento, a 25 ± 2°C por 21 dias.

Posteriormente o desenvolvimento dos embriões foi avaliado por mais cinco semanas, totalizando oito semanas (56 dias) a partir da inoculação dos embriões.

As concentrações dos quatro tratamentos com ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) foram: 0,00; 0,25; 0,50 e 1,00 mg L⁻¹. E com ácido giberélico (GA3): 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, foram realizadas quatro repetições e inoculados dez embriões por parcela (4x4x10).

Ao fim das 8 semanas dos experimentos, foram coletados os dados dos embriões que se desenvolveram e formaram plântulas, dos que não se desenvolveram e dos que sofreram contaminação por microrganismos. A massa (g) das plântulas desenvolvidas foi medida e os dados submetidos a análise de variância (ANOVA).

3.4. EXPERIMENTO COM TETRAZÓLIO

Para avaliação da viabilidade dos embriões foi utilizado o teste do tetrazólio. Os embriões foram submetidos a três diferentes concentrações de tetrazólio (0,25%, 0,5% e 1%), em dois tempos de embebição (três e cinco horas) com quatro repetições e dez explantes por parcela (3x4x10). E sob temperatura ambiente de 25 ± 2°C, na ausência de luminosidade (BRASIL, 2009). Após a exposição ao tetrazólio, os embriões foram lavados e analisados quanto à coloração para a diferenciação e contagem dos embriões vivos coloridos daqueles não viáveis, que não apresentam coloração avermelhada.

4. RESULTADOS

Primeiramente, para a análise dos experimentos com o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e com o ácido giberélico foi realizada uma classificação qualitativa do estado final do desenvolvimento dos embriões (Figura 5).

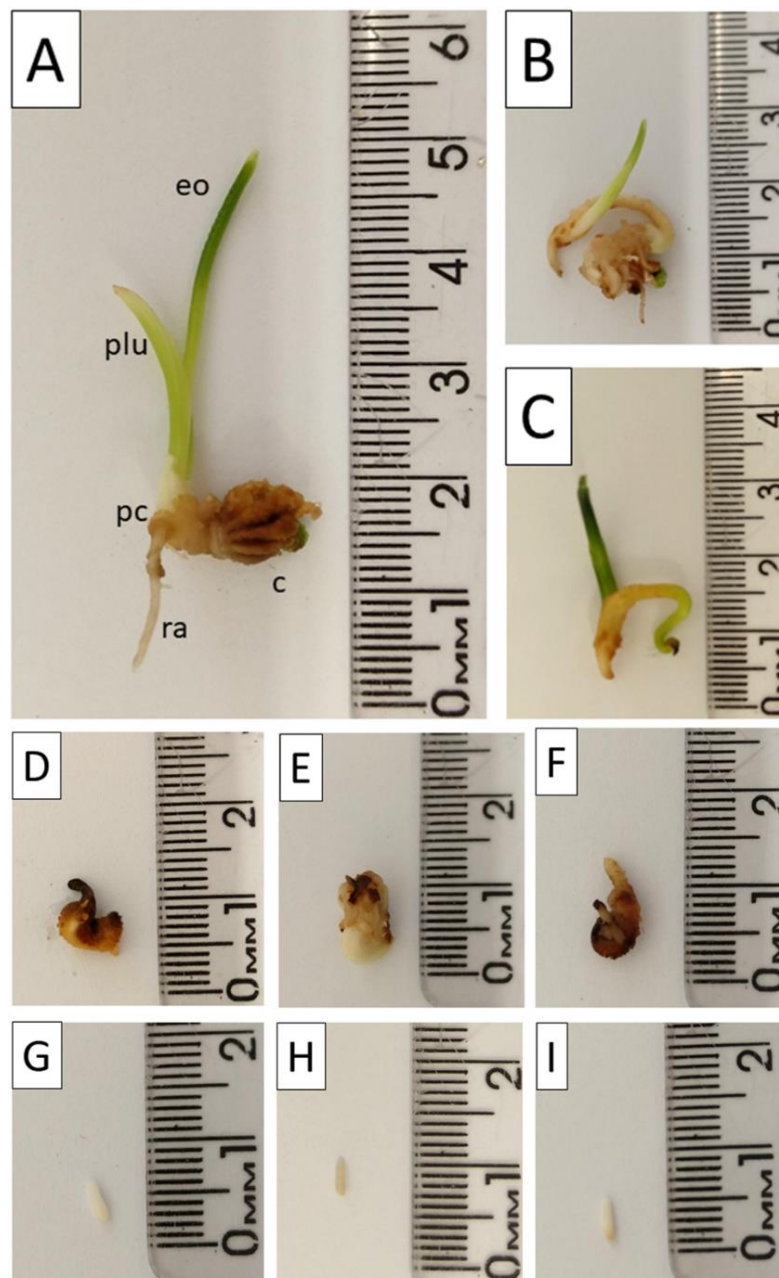


Figura 5 - Classificação qualitativa do estado final de desenvolvimento dos embriões de *S. romanzoffiana*: desenvolvidos em plântulas (A-C); que tiveram um período de desenvolvimento e morreram (D-F); não desenvolvidas (G-I). Legenda: ra - raiz; pc - pecíolo cotiledonar; plu - plúmula; eo - eófilo; c- calo.

Os três estados finais de desenvolvimento dos embriões foram: os que se desenvolveram e formaram plântulas, os que experimentaram um período de desenvolvimento e morreram, e os que não se desenvolveram. E além disso, foram observados os que tiveram seus meios contaminados por microrganismos (Figura 6).

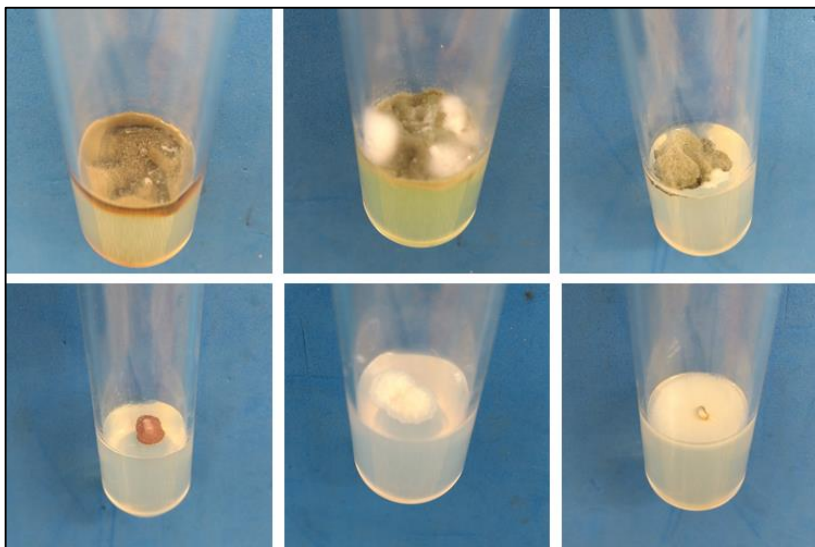


Figura 6 - Exemplos de meios de cultura dos experimentos instalados contaminados.

4.1. RESULTADOS DO EXPERIMENTO COM ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D)

Os dados percentuais do experimento com ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) estão presentes no gráfico 1.

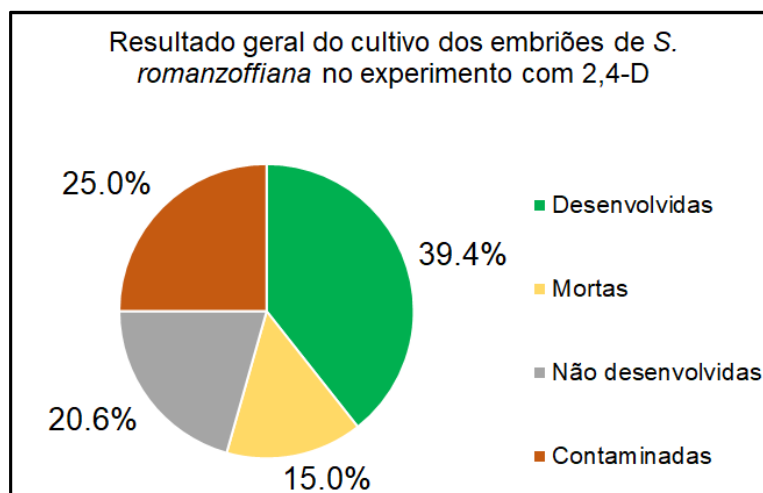


Gráfico 1 - Resultado geral do cultivo dos embriões de *S. romanzoffiana* no experimento com 2,4-D.

No experimento com ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) 75% dos meios não foram contaminados durante o experimento enquanto os 25% restantes foram contaminados. Além disso a massa (g) dos embriões que se desenvolveram e formaram plântulas foi quantificada para cada tratamento (Tabela 2) (Gráfico 2). E utilizando os dados das massas foi realizada análise de variância (ANOVA) e comparação das médias entre os tratamentos. Foi obtido um F_0 de 1.204 e $p = 0.350$ ($F(p<0,05) (3,12) = 3.49$). Esse resulta indica que as médias populacionais não demonstraram uma diferença significativa para a massa (g) entre os tratamentos.

TABELA 2 - MÉDIA DE MASSA (G) AS PLÂNTULAS DE *S. romanzoffiana* FORMADAS NO EXPERIMENTO COM 2,4-D PARA CADA TRATAMENTO.

Tratamentos	Concentração de 2,4-D	Média da massa (g)
1	0,00 mg L ⁻¹	0,14327
2	0,25 mg L ⁻¹	0,20406
3	0,50 mg L ⁻¹	0,23578
4	1,00 mg L ⁻¹	0,17429

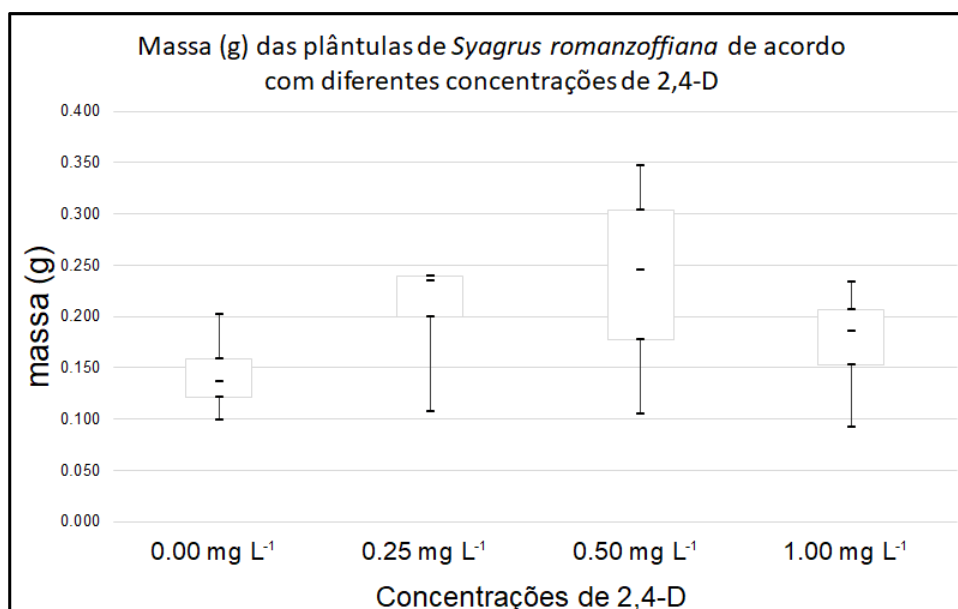


Gráfico 2 - Massa (g) das plântulas de *S. romanzoffiana* de acordo com diferentes concentrações de 2,4-D (0,00, 0,25, 0,50, 1,00 mg mL⁻¹).

4.2. RESULTADOS DO EXPERIMENTO COM ÁCIDO GIBERÉLICO

Os dados percentuais do experimento com ácido giberélico estão presentes no gráfico 3.

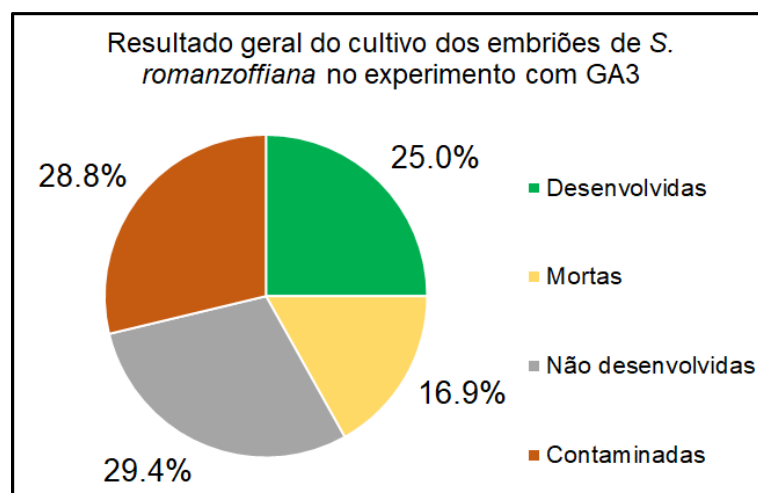


Gráfico 3 - Resultado geral do cultivo dos embriões de *S. romanzoffiana* no experimento com ácido giberélico.

No experimento com ácido giberélico 71,2% dos experimentos instalados não foram contaminados durante o experimento enquanto os 28,8% restantes foram contaminados, assim como no experimento com ácido diclorofenóxiacético (2,4-D). Foi pesada a massa (g) dos embriões que se desenvolveram e formaram plântulas para cada tratamento com giberelina (Tabela 3) (Gráfico 4). A partir da análise de variância (ANOVA) para comparar as médias das massas das plântulas entre os tratamentos, foi obtido um F_0 de 1,687 e $p = 0,222$ ($F(p < 0,05)(3,12) = 3,49$). Esse resultado indica que as médias populacionais não demonstraram uma diferença significativa para a massa (g) entre os tratamentos.

TABELA 3 - TABELA DA MÉDIA DE MASSA (G) AS PLÂNTULAS DE *S. romanzoffiana* FORMADAS NO EXPERIMENTO COM ÁCIDO GIBERÉLICO PARA CADA TRATAMENTO.

Tratamento	Concentração de ácido giberélico	Média da massa (g)
1	0,00 mg L ⁻¹	0.05793
2	1,0 mg L ⁻¹	0.04554
3	2,0 mg L ⁻¹	0.04112
4	4,0 mg L ⁻¹	0.04304

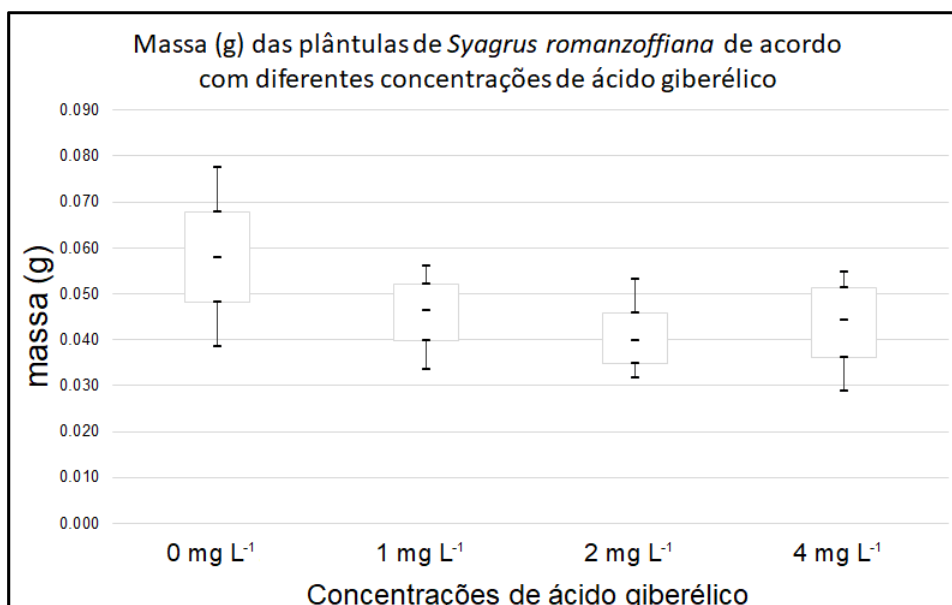


Gráfico 4 - Gráfico da massa (g) das plântulas de *S. romanzoffiana* em quatro concentrações de ácido giberélico (0, 1, 2 e 4 mg L⁻¹).

4.3. ANÁLISE DO EXPERIMENTO COM TETRAZÓLIO

O teste de tetrazólio foi realizado com três concentrações 0,25%, 0,5% e 1% após três e cinco horas. Nesse teste os resultados foram bem evidentes entre os embriões corados que apresentaram atividade nos tecidos vivos e os não corados que não apresentaram. Na concentração de 0,25% (Figura 7), 30% dos embriões se mostraram inviáveis, na concentração de 0,50% (Figura 8), 17,5% inviáveis e na maior concentração, 1,00% (Figura 9), 27,6% dos embriões se mostraram inviáveis. Em média 25% dos embriões de mostraram inviáveis.

Há também notável diferença entre a coloração no tempo de três e cinco horas, sendo preferível aguardar cinco horas para coloração mais intensa. Principalmente porque são notáveis as regiões do embrião que se colorem mais intensamente, e nos registros realizados com três horas de teste essas regiões não ficam bem demarcadas. É perceptível uma diferença de intensidade da coloração entre os testes com 0,25% e 1,00%, e embriões com uma coloração parcial em relação ao demais no teste com concentração de 1,00% podem ser considerados potencialmente inviáveis.

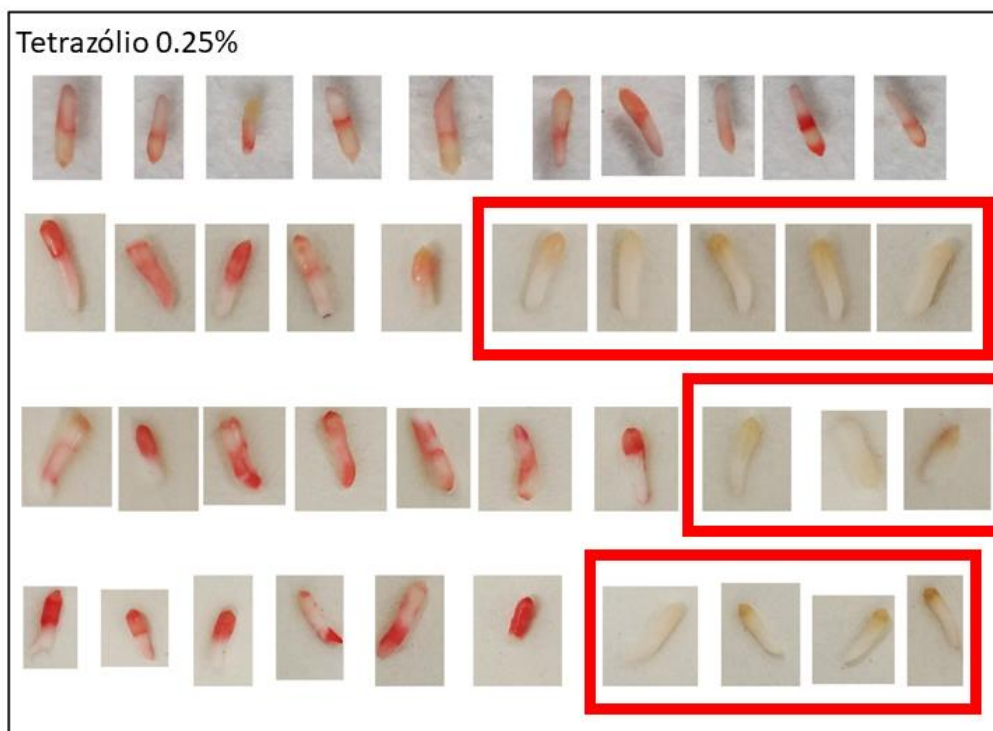


Figura 7 - Resultados do Teste de Tetrazólio para os embriões de *S. romanzoffiana* com a concentração de 0,25% após 5 horas. Em destaque (vermelho) os embriões inviáveis.

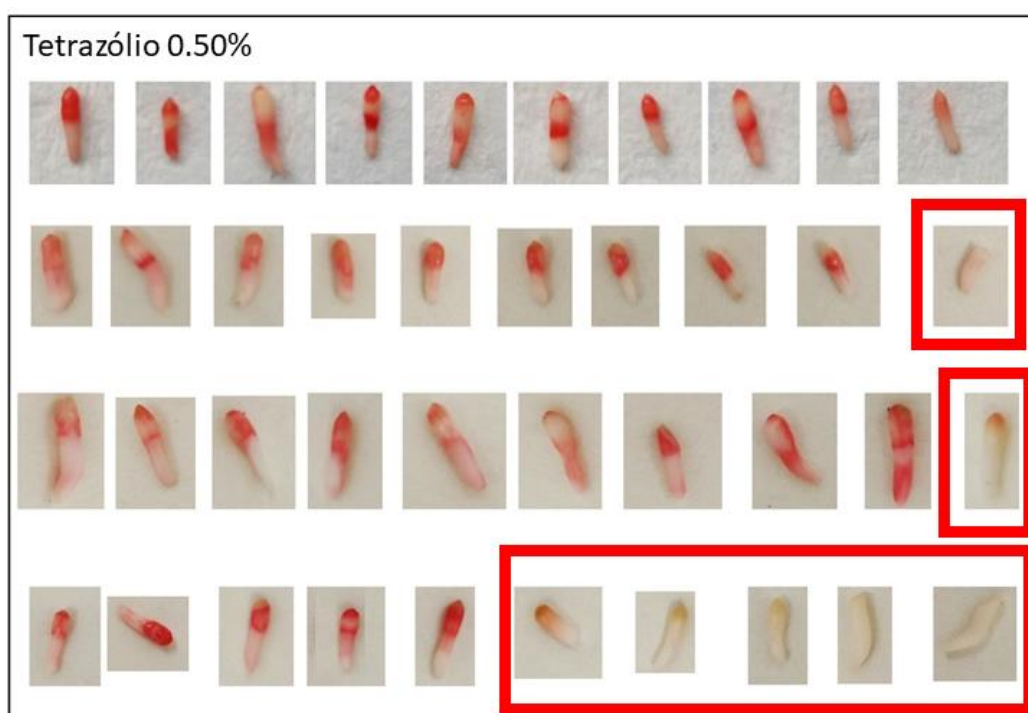


Figura 8 - Resultados do Teste de Tetrazólio para os embriões de *S. romanzoffiana* com a concentração de 0,50% após 5 horas. Em destaque (vermelho) os embriões inviáveis.

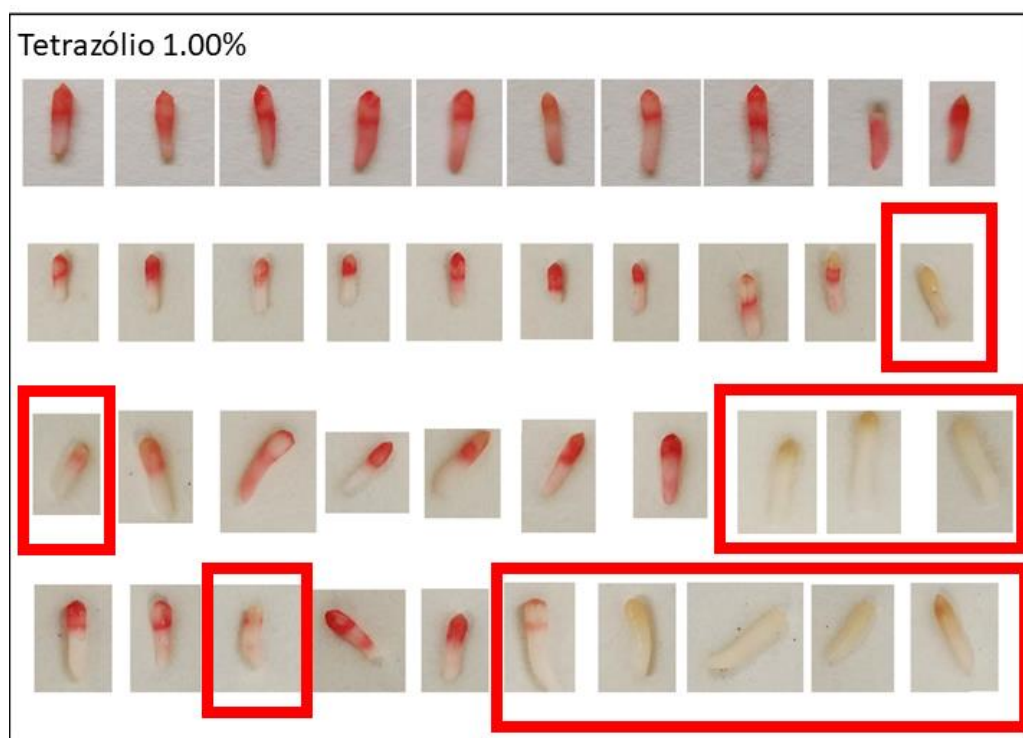


Figura 9 - Resultados do Teste de Tetrazólio para os embriões de *S. romanzoffiana* com a concentração de 1,00% após 5 horas. Em destaque (vermelho) os embriões inviáveis.

Por fim, na tabela 4 é apresentada uma comparação entre os resultados de todos os três experimentos. O teste de tetrazólio avalia o potencial de viabilidade dos embriões então estes podem se desenvolver, mas ainda estão sujeitos a morrerem. Enquanto que os percentuais de embriões que não se desenvolveram ficaram próximos, embora seja impossível comparar com fidelidade devido ao percentual de meios que foram contaminados.

TABELA 4 - COMPARAÇÃO PERCENTUAL DE SUCESSO DO DESENVOLVIMENTO E VIABILIDADE DOS EMBRIÕES DE *Syagrus romanzoffiana*.

Experimento	Se desenvolveu	Se desenvolveu e morreu	Não se desenvolveu	Contaminada
2,4-D	39.38%	15.00%	20.63%	25.00%
GA3	25.00%	16.88%	29.38%	28.75%
Tetrazólio	75,00%*		25,00%	-

5. DISCUSSÃO

De acordo com resultados gerais observados nos experimentos com ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) e o ácido giberélico (GA3). 32,2% dos embriões inoculados se desenvolveram e formaram plântulas, um percentual maior que o obtido por Ribeiro et al. (2011) de 26% de plântulas verdes, no trabalho com a germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de *Butia capitata* (Mart.) Becc. Os autores também verificaram um maior número de plântulas enraizadas em seu cultivo no escuro, de diferente do observado no presente trabalho, no qual no cultivo sob iluminação tanto nos meios de cultura com 2,4-D quanto com GA3 houve pouco desenvolvimento de raízes, mesmo após os 21 dias iniciais de cultivo no escuro.

26,9% das inoculações nos experimentos, tanto com 2,4-D quanto com GA3 resultaram em meios contaminados. Um percentual que pode ser reduzido utilizando a desinfestação dos embriões antes da inoculação, considerando que em todos os experimentos não foi realizada nenhuma lavagem dos embriões. Foi assumido que o embrião estaria numa condição asséptica dentro da semente e assim que a semente era aberta o embrião era retirado e inoculado no meio de cultura. Além disso 15,9% das plântulas morreram durante o desenvolvimento e 25% dos embriões nem chegaram a se desenvolver, lembrando que os frutos foram coletados em condições de maturação diferentes. Assim, é possível que estabelecer um protocolo de coleta mais rígido pode melhorar os resultados.

Ainda que não tenham sido verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para cada experimento utilizando 2,4-D ou GA3, foi observada uma diferença significativa no ganho de massa (g) entre o uso de 2,4-D e GA3. A média geral de massa para as plântulas tratadas com 2,4-D foi de 0,189 g, enquanto que a média geral de massa para as tratadas com GA3 foi de 0,045 g, ou seja, o ganho de massa das plântulas tratadas com 2,4-D foi pelo menos quatro vezes maior que o ganho de massa das tratadas com GA3. Essa diferença de massa é causada pela presença dos calos no desenvolvimento das plântulas tratadas com 2,4-D. Além disso a ausência de diferença significativa entre os tratamentos dos dois experimentos e o controle (concentração de 0 mg L⁻¹) indica que essa não há necessidade de um indutor de germinação, que resultará em menor custo de preparo do meio de cultura.

Foi notável na maioria das plântulas um desenvolvimento celular desordenado e caloso para as plântulas tratadas com 2,4-D, o que não aconteceu no experimento com GA3. Ainda que os calos tenham sido os responsáveis pela grande diferença de massa, não foi observado um desenvolvimento anormal no restante das plântulas, para ambos os experimentos. Isso se relaciona com o desenvolvimento de calos em inúmeros trabalhos com o uso do 2,4-D a fim de induzir crescimento de embriões somáticos. Como, desde o primeiro exemplo, sendo o trabalho de Halperin e Wetherell (1964) no qual mostraram que um calo era produzido a partir de qualquer parte de uma cenoura e que esses calos formavam embriões somáticos.

O resultado do teste de tetrazólio, mostrou que de todos os embriões testados 25% deles se mostraram inviáveis, um valor percentual que não se encontra longe dos valores de embriões que não se desenvolveram nos experimentos com 2,4-D e GA3. Além disso, dos dois tempos de embebição dos embriões em tetrazólio, três e cinco horas, três horas de embebição não são suficientes para obter uma coloração definida dos embriões, sendo assim é recomendado usar o tempo de embebição de cinco horas para maior clareza dos resultados. O trabalho de Iossi et al. (2016) onde avaliaram os embriões de *Syagrus romanzoffiana* com o teste de tetrazólio mostrou 61% de viabilidade média entre os embriões, para a concentração de 0,2% tetrazólio à 40°C e período máximo de 6 horas. O trabalho de Soares et al. (2015) mostrou 80% de viabilidade de sementes de *S. romanzoffiana* a partir do teste de tetrazólio. Enquanto que no presente trabalho foi obtido 75% de viabilidade média entre as três concentrações utilizadas (0,25%, 0,5% e 1%) à 25°C, resultados que não aparentam ser tão divergentes dos demais autores.

6. CONCLUSÃO

Foi estabelecido um protocolo para a germinação *in vitro* de *Syagrus romanzoffiana* a partir da cultura de embriões zigóticos. E a metodologia descrita utilizando tetrazólio para a avaliação da viabilidade dos embriões se mostrou satisfatória.

REFERÊNCIAS

- ALBERTO, P.S.; LEITE, M.S.; PEREIRA, F.D.; SILVA, F.G. Cultivo *in vitro* de embriões de babaçu sob diferentes concentrações de sacarose e carvão ativado. In: **Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Campus Rio Verde do IF Goiano**. 1., 2012, Rio Verde. Anais... Rio Verde: DPPG, 2012. Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/agrarias/efeito%20da%20sacarose.pdf>>. Acesso em: 27 outubro 2022.
- AMARANTE JÚNIOR, O. P. DE; SANTOS, T. C. R. DOS; NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. L. Breve revisão de métodos de determinação de resíduos do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 223–229, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000200015>
- BARRUETO CID, L. P., TEIXEIRA J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 4ª ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília - DF. Embrapa, 2015. *E-book*. Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=1077494>>. Acesso em: 15 dez. 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de sementes**. 1 ed. 399 p. Brasília. Mapa/ACS, 2009.
- BRAZILIO, M.; BISTACHIO, N.J.; PERINA, V.C.S.; NASCIMENTO, D.D. Revisão: O Dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 2, n. 1, p. 27-45, 2012. Disponível em: <<http://fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/view/51>>. Acesso em: 21 outubro 2022.
- DE SOUZA, F. G.; DE ARAÚJO, F. F.; DE PAULO FARIAS, D.; et al. Brazilian fruits of Arecaceae family: An overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. **Food Research International**, v. 138, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109690>
- DEL POZO, D. G.; MARTÍN-GÓMEZ, J. J.; TOCINO, Á.; CERVANTES, E. Seed geometry in the Arecaceae. **Horticulturae**, v. 6, n. 4, p. 1–22, 2020. <https://doi.org/10.3390/horticulturae6040064>
- DIAS, D. S.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; et al. Effects of seed structures, sucrose and gibberellic acid on the germination of *Butia capitata* (Arecaceae). **Seed Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 371–382, 2013. <https://doi.org/10.15258/sst.2013.41.3.05>
- EISERHARDT, W. L.; SVENNING, J. C.; KISSLING, W. D.; BALSLEV, H. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): Determinants of diversity and distributions across spatial scales. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1391–1416, 2011. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr146>
- FRANÇA-NETO, J. DE B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja.

Embrapa Soja (Documento 406), p. 109, 2018. <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1098452/metodologia-do-teste-de-tetrazolio-em-sementes-de-soja>>. Acesso em: 21 outubro 2022.

FRÖHLICH R.; GUIMARÃES V. F.; JUNIOR R. C.; BRITO T. S.; SILVA A. S. L.; VITTO D. C.; ANKLAN M. A. Desenvolvimento e produção de plantas de soja tratadas com ácido 2,4 diclorofenoxiacético em subdosagem. **Cultivando o Saber**. p. 138, v. 14, 2021. <<https://cultivandosaber.faq.edu.br/index.php/cultivando/article/view/1060>>. Acesso em: 21 outubro 2022.

GUIMARÃES, D.N.; LANDI, L.G.P.; ALBERTO, P.S.; PEREIRA, F.D.; SILVA, F.G. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de tucum (*Astrocaryum huaimi* Mart.): avaliação do tipo e concentração do meio de cultivo. In: **Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IF Goiano**. 1., 2012, Rio Verde. Anais... Rio Verde: DPPG, 2012.

GUION, D. C.; KAGEYAMA, P. Y. Teste de germinação de *Syagrus romanzoffiana* (Chamisso) Glassman. In: **Congresso Nacional De Botânica**, 47., 1996, Nova Friburgo. Resumos. Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil, 1996. p. 467.

HALPERIN W., WETHERELL D.F. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. **American Journal of Botany**, 51: 274-283, 1964. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1964.tb06630.x>

IOSSI, EMERSON et al. Chemical Composition and Tetrazolium Test of *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman Seeds. **Revista Brasileira de Fruticultura [online]**. v. 38, n. 4, 2016. <https://doi.org/10.1590/0100-29452016550>

JONG, M.; MARIANI, C.; VRIEZEN, W. H. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 5, p. 1523–1532, 2009. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp094>

JORGE, N., DA SILVA, A.C., VERONEZI, C.M., *Syagrus romanzoffiana*. In: FREITAS DE LIMA, F., LESCANO, C.H., PIRES DE OLIVEIRA, I. (eds) **Fruits of the Brazilian Cerrado**. Springer, Cham. p. 141-159, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62949-6_9

JOSÉ, A. C.; DAVIDE, A. C.; PAIVA, L. V. Detecção de compostos fenólicos em sementes de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassm). In: **Congresso e Exposição Internacional Sobre Florestas**, 6., 2000, Porto Seguro. Resumos técnicos. Rio de Janeiro: Instituto Ambiental Biosfera, 2000. p. 96-97.

MINARDI, B. D.; VOYTENA, A. P L.; RANDI, A. M.; ZAFFARI, G. R. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. Ex Drude) Becc. **Insula**, n. 40, p. 70-81, 2011. <<https://periodicos.ufsc.br/index.php/insula/article/view/2178-4574.2011n40p70>>. Acesso em: 23 outubro 2022.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NOBLICK L.R. *Syagrus*. In: LORENZI H, NOBLICK L, KAHN F, FERREIRA E, editors. **Brazilian Flora Lorenzi: Arecaceae (palms)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. pp. 304-360, 2010.

NOBLICK L. R. A revision of the genus *Syagrus* (Arecaceae). **Phytotaxa**, v. 294, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.294.1.1>

NOBLICK L.R. *Syagrus guaratingensis*: a new species from Bahia, Brazil. **Palms**. 62(2): 77–86, 2018.

NUNES, A. M.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; DE CARVALHO, A. Z.; CARDOSO, G. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 702–707, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000300024>

PASSOS, I. R. DA S., MATOS, G. V. DA C., MELETTI, L. M. M., SCOTT, M. D. S., BERNACCI, L. C., & VIEIRA, M. A. R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 380-381, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000200051>

PEDÓ, T.; MARTINAZZO, E. G.; BACARIN, M. A.; et al. Crescimento de plantas e vigor de sementes de feijão em resposta à aplicação exógena de ácido giberélico. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 757–770, 2018. <https://doi.org/10.19084/RCA17169>

RAGHAVAN, V., Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. **Am. J. Bot.**, 91: p. 1743-1756, 2004. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1743>

RAUPP. S. D., KULCHETSCKI L., BOSMULER C. L. Processamento de Palmito Jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) em conserva. **Revista Tecnológica**. v. 16 p. 75-85. 2007. Disponível em: <<http://ri.uepg.br:8080/riuepg/handle/123456789/425>>. Acesso em: 01 dezembro 2022.

REGO, C. H. Q.; CARDOSO, F. B.; COTRIM, M. F.; CÂNDIDO, A. C. DA S.; ALVES, C. Z. Ácido Giberélico Auxilia Na Superação Da Dormência Fisiológica E Expressão De Vigor Das Sementes De Graviola. **Revista De Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 3, p. 83–86, 2018. <https://doi.org/10.32404/rean.v5i3.2354>

RIBEIRO, L.M.; NEVES, S.C.; SILVA, P.O.; ANDRADE, I.G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, v. 58, n. 2, p. 133-139, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000200001>

RODRIGUES, P.H.V.; FERREIRA, F.F.; AMBROSANO, G.M.B.; GATO, A.M.G. Propagação *in vitro* de tucumã do Amazonas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, p. 55-59, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000143>

SANT'ANNA-SANTOS B.F., AZEVEDO I.F.P., MICHELI R., SOFFIATTI P. Morpho-anatomical novelties of a dwarf *Syagrus* (Arecaceae) of canga: implications for ecology, conservation, and taxonomy. **Plant Systematics and Evolution**. *no prelo*.

SANTOS-MOURA, S.M. **Morfologia de frutos, diásporos, plântulas, mudas e cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.** 2013. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns. 73f. Disponível em: <https://www.ppgpa.ufrpe.br/sites/default/files/testes-dissertacoes/11-sueli_santos-moura.pdf>. Acesso em: 02 dezembro 2022.

SERRANI, J. C.; SANJUÁN, R.; RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. **Plant Physiology**, v. 145, n. 1, p. 246–257, 2007. <https://doi.org/10.1104/pp.107.098335>

SOARES, J.D.R.; RODRIGUES, F.A.; PASQUAL, M.; NUNES, C.F.; ARAÚJO, A.G. Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 773-778, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000040>

SOARES, K.P. *Syagrus* in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2023. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15745>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

SOARES K.P., GUIMARÃES C. *Syagrus amicorum*, a new Arecaceae from Bahia, Brazil. **Phytotaxa**. 387(2): 158–164, 2019. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.387.2.8>

SOARES OLIVEIRA, T. G. JOSÉ, A. C. RIBEIRO, L. M. ROCHA FARIA, J. M. Longevity and germination of *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae) seeds and its ecological implications. **Revista de Biología Tropical**, v. 63, n. 2, p.333-340, 2015. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/12157>. Acesso em: 11 novembro 2022.

SOUSA, V. A. de; SCHEMBERG, E. A.; AGUIAR, A. V. de. Germinação *in vitro* do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 86, p 147-151, 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31971/1/Germinacao-in-vitro-do-polen-de-jeriva.pdf>>. Acesso em: 02 dezembro 2022.

SOUSA, D. M. M.; BRUNO, R. DE L. A.; SILVA, K. DA R. G.; TORRES, S. B.; ANDRADE, A. P. Viabilidade e vigor de sementes de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz pelo teste de tetrazólio. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 48, n. 2, p. 381–388, 2017. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170044>

TOFANELLI, M. B. D.; FREITAS, P. L.; PEREIRA, G. E. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid as an Alternative Auxin for Rooting of Vine Rootstock Cuttings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 3, p. 664–672, 2014. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-266/13>

WALDOW, D. A. G.; REINIGER, L. R. S.; GOLLE, D. P.; CURTI, A. R. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriospatha*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 5, p. 2179–2188, 2013. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n5p2179>