

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

Propagação de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi

Claudimar Sidnei Fior
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Tese apresentada com um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil
Dezembro de 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Fior, Claudimar Sidnei
Propagação de Butia odorata (Barb.Rodr.) Noblick &
Lorenzi / Claudimar Sidnei Fior. -- 2011.
184 f.

Orientador: Sergio Francisco Schwarz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Recurso genético. 2. Fisiologia de sementes.
3. Frutífera nativa. 4. Produção de mudas. 5. Butia
odorata. I. Schwarz, Sergio Francisco, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“yo aprecio mucho a las palmas, no les voy a dejar que se sequen, tampoco dejarlas tiradas o quemarlas, ... las planté para verlas bonitas.”

“... hay que marcar la hoja de la palma que se orienta hacia la salida del sol y trasplantarla en la misma orientación, a ese punto cardinal.”

Tiburcio Rocha (1924), responsável pelo primeiro butiazal plantado que se tem notícias (Geymonat e Rocha, 2009; Oliveira; Teixeira e Rocha, 2009).

AGRADECIMENTOS

Em cada momento da nossa vida pessoal ou profissional convivemos com pessoas que de maneira desinteressada contribuem para nosso engrandecimento. Um simples gesto ou palavra de incentivo nos fortalece e nos ajuda a seguir em frente. Em alguns momentos somos surpreendidos pelo incentivo até mesmo de pessoas que mal conhecemos.

Para todos os que participaram desse trabalho de maneira definitiva ou através de uma simples troca de ideias, deixo meu sincero agradecimento.

Ao professor Sergio Francisco Schwarz pela orientação e pelo convívio e trabalho harmoniosos;

À professora Atelene Nornam Kämpf, a quem devo muitíssimo pela minha formação acadêmica e iniciação científica;

Aos amigos Cristina Leonhardt e Leandro Pacheco pela decisiva contribuição para meu ingresso na área da horticultura e silvicultura;

À minha esposa, Lia Rosane Rodrigues pelo fundamental incentivo e apoio à minha formação profissional, bem como a seus pais, irmãos e demais familiares pelo convívio e “torcida”;

Aos meus pais Selito e Ildi pela importante educação, dedicação e incentivo; minhas irmãs Silvane e Carine, meu cunhado Leandro e meu sobrinho Léo, pelo convívio e agradáveis momentos de descontração;

Aos amigos de longa data, mas sempre presentes, Gerson S. Tadiello, Cesar G. Prestes, Ricardo Galisteo, Anaíse C. Calil e Cirilo Gruszynski;

Aos amigos Daiane Lattuada, Marta Coutinho da Silva, Henrique Petry, Willian Heintze, Ernani Pezzi e Luana Souza pelo auxílio e troca de ideias durante o curso;

A todos os colegas do Jardim Botânico e da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, em especial aos amigos Luiza Chomenko, Jorge Ferigolo, Ana Maria Ribeiro, Marco Azevedo, Renato Zolet, Márcia Neves, Hilda Alice Gastal e Aline Barcellos;

Aos estagiários e bolsistas que muito contribuíram em diferentes etapas do trabalho: Amanda Pezzi, Marina Gomes, Camila Pereira, Diana

Bertoglio, Denise Ramos, Rochele Scopel, Pedro Schäffer e Evelyn Souza;

Ao Professor Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos e sua equipe (UFMG) pelo envio de diásporos para a realização de parte do trabalho;

Aos pesquisadores Adilson Tonietto, Gilson Schlindwein e Augusto Azambuja pela troca de informações e colaboração no trabalho;

Aos colegas alunos do PPG Fitotecnia e do Departamento de Horticultura e Silvicultura, em especial a Ana Paula Cordeiro, Fabrício Silva Nunes, Mateus Gonzatto, Edwin Rodriguez, Sandra Rieth, Lucécia Souza, Francisco Amaro, Wagner Soares, Júlio Giuliani, Felipe Dias, Mônica Spier, Vinícios Boaro, Alisson Kovaleski, Bruno Casamali, Josiani Pasini, Cristiane Wesp, Divanilde Guerra, Caco Benetti e Leonardo Schneider;

À acadêmica Gabriela Chesim de Souza pela coleta processamento e participação na identificação dos insetos coletados sobre as plantas;

Às pesquisadoras Dra. Luiza Redaeli, Dra. Vera Wolf e Dra. Ana Paula Ott pelas instruções de coleta e identificação dos insetos e ácaro;

À Dra. Rosa Líia Barbieri e à Dra. Magnólia Silva pela troca de informações e importantes contribuições na redação do trabalho;

A todos os funcionários e professores do PPG Fitotecnia e do Departamento de Horticultura e Silvicultura, bem como aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Agronomia da UFRGS,

Muito obrigado.

Autor: Claudimar Sidnei Fior

Orientador: Sergio Francisco Schwarz

RESUMO

Butia odorata é uma palmeira nativa do Sul da América do Sul. É um importante recurso genético regional, principalmente devido à adaptação edafoclimática e potencial para exploração hortícola. A propagação comercial é dificultada pela falta de informações fitotécnicas sobre sementes e formação de mudas. Este trabalho teve por objetivo conhecer aspectos relacionados à germinação e conservação de sementes, desenvolvimento de plântulas, indução à embriogênese somática *in vitro* e adubação e desenvolvimento de mudas em casa de vegetação. Diásporos de populações naturais do Rio Grande do Sul foram analisados e tiveram a viabilidade das sementes analisada *in vitro*. A superação da dormência das sementes foi testada através da escarificação mecânica. Com as plântulas obtidas foram testados o enraizamento *in vitro* e o desenvolvimento de mudas em casa de vegetação. Também foi conduzido um estudo com indução à embriogênese somática a partir de embriões zigóticos e explantes oriundos de inflorescência imatura. Diásporos de *B. odorata* apresentaram teor de água com variação significativa entre matrizes e entre condições visuais de maturação. A massa de 1000 diásporos também foi bastante variável, sendo encontrados, em média, 1890 g, com teor de umidade próxima a 11%. Tão logo estabelecidos *in vitro*, mais de 83% dos embriões germinaram. Sementes de *B. odorata* armazenadas sob baixa umidade do ar e temperatura moderada mantiveram viabilidade elevada por, pelo menos, três anos. A abertura da cavidade embrionária das sementes permitiu a superação da dormência, tanto em semeadura *in vitro* como *in vivo*. As plântulas apresentaram enraizamento *in vitro* satisfatório em meio de cultivo com ácido naftalenoacético combinado a concentrações de sacarose entre 3 e 4,5%. Embriões zigóticos formaram calos em meio de cultivo com concentrações elevadas de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Mudas desenvolvidas em recipientes com substrato orgânico até a fase juvenil não apresentaram exigência elevada em adubação e pH. Na fase juvenil o desenvolvimento foi prejudicado quando a condutividade elétrica do substrato superou 5 mS.cm⁻¹. Mudas conduzidas em casa de vegetação emitiram as primeiras folhas pinadas em torno de quinze meses após a germinação.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (184p.) Dezembro de 2011

Propagation of *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi¹

Author: Claudimar Sidnei Fior
Adviser: Sergio Francisco Schwarz

ABSTRACT

Butia odorata is a palm tree native from southern South America. It is an important regional genetic resource, mainly due to its climate and soil adaptation and its potential for horticultural exploitation. The commercial propagation requires information about seed technology and seedling production. This work was conducted in order to get information concerning aspects related to conservation and germination of seeds, seedling growth, induction of *in vitro* somatic embryogenesis, plant nutrition and seedling growth in greenhouse. Diaspores from natural populations of Rio Grande do Sul State were analyzed and the viability of the seeds was tested *in vitro*. The overcoming seed dormancy was tested by means of mechanical scarification of isolated seeds. Seedlings obtained from these previous tests were submitted to assays for *in vitro* rooting and plant development in greenhouse. Subsequently a study was conducted related to the induction of somatic embryogenesis from zygotic embryos and immature inflorescence tissues. Diaspores of *B. odorata* presented water content with significant variation among donor plants and among visual maturation stages. The mass of 1000 seeds have been quite variable, being found an average of 1890 g, for a moisture content near 11%. Immediately to the *in vitro* establishment, more than 83% embryos germinated. Seeds of *B. odorata* stored under low humidity and moderate temperature maintained high viability for at least three years. The opening of the cavity of the embryonic seeds allowed to break dormancy in both *in vitro* and *in vivo* samples. Seedlings presented satisfactory *in vitro* rooting in culture medium with naphthaleneacetic acid combined with sucrose concentrations from 3 to 4.5%. Zygotic embryos formed callus in culture medium containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Developed seedlings in containers with organic substrate up to the juvenile stage do not have high demand in fertilizer and pH conditions. Development was hampered in juvenile plants when the electrical conductivity of the substrate exceeded 5 mS.cm⁻¹. Seedlings conducted in greenhouse formed the first pinnate leaves approximately fifteen months after germination.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (184p.) December, 2011

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, IDENTIFICAÇÕES TAXONÔMICAS, E INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS.....	4
2.2 <i>BUTIA SPP.</i> : REPRODUÇÃO E INFORMAÇÕES FITOTÉCNICAS.....	10
2.3 CARACTERIZAÇÃO DE DIÁSPOROS E GERMINAÇÃO DE PALMEIRAS.....	13
2.3.1 Dormência em sementes	16
2.3.2 Armazenamento de sementes.....	20
2.4 PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i>	23
2.4.1 Embriogênese somática.....	24
2.5 DESENVOLVIMENTO INICIAL E ADUBAÇÃO DE MUDAS DE PALMEIRAS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 COLETA E ANÁLISE INICIAL DE SEMENTES.....	40
3.1.1 Análise de viabilidade.....	42
3.1.2 Teste de viabilidade de sementes de mesmos diásporos	44
3.1.3 Análise de longevidade de sementes de diásporos armazenados em diferentes ambientes	46
3.2 SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE <i>BUTIA ODORATA</i> E <i>B. CAPITATA</i>	47
3.2.1 Germinação de sementes <i>in vitro</i>	50
3.2.2 Germinação <i>in vivo</i> de sementes escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária.....	50
3.2.3 Germinação <i>in vitro</i> de sementes escarificadas e embriões isolados.....	51
3.2.4 Efeito de procedimentos de superação de dormência na emergência de plântulas em casa de vegetação.	53
3.2.5 Temperatura e germinação associadas à superação de dormência pela abertura da cavidade embrionária	54
3.3 CLASSIFICAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>BUTIA ODORATA</i> QUANTO AO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO.....	55
3.3.1 Análise de viabilidade após dessecação e conservação em temperatura sub-zero.....	55
3.4 ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE PLÂNTULAS DE <i>B. ODORATA</i>	57
3.4.1 Concentrações de ANA no meio de cultivo	58
3.4.2 Concentrações de sacarose no meio de cultivo	59
3.4.3 Ajuste da concentração de ANA.....	59
3.5 TESTES PRELIMINARES VISANDO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>BUTIA ODORATA</i>	60
3.5.1 Calogênese em embriões zigóticos.....	60
3.5.2 Tecidos da inflorescência como explantes iniciais para embriogênese somática	61
3.6 DESENVOLVIMENTO INICIAL DE MUDAS DE <i>BUTIA ODORATA</i>	62
3.7 ADUBAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MUDAS.....	67
3.7.1 Obtenção das mudas utilizadas no experimento.....	67
3.7.2 Instalação do experimento	68

3.7.3 Monitoramento da ocorrência de pragas.....	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1 COLETA E ANÁLISE INICIAL DE SEMENTES.....	72
4.1.1 Análise de viabilidade.....	76
4.1.2 Teste de viabilidade de sementes de mesmo diásporo.....	82
4.1.3 Análise de longevidade de sementes de diásporos armazenados em diferentes ambientes.	85
4.1.3.1 Teor de água	85
4.2 SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM SEMENTES DE <i>BUTIA ODORATA</i> E <i>B. CAPITATA</i>	94
4.2.1 Germinação de sementes <i>in vitro</i>	94
4.2.2 Germinação <i>in vivo</i> de sementes escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária.....	96
4.2.3 Germinação <i>in vitro</i> de sementes escarificadas e embriões isolados.....	99
4.2.4 Efeito de procedimentos de superação de dormência na emergência de plântulas em casa de vegetação.	101
4.2.5 Temperatura e germinação associadas à superação de dormência pela abertura da cavidade embrionária	104
4.3 CLASSIFICAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>BUTIA ODORATA</i> QUANTO AO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO.....	108
4.3.1 Análise de viabilidade após dessecação e conservação em temperatura sub-zero.....	108
4.4 ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE PLÂNTULAS DE <i>B. ODORATA</i>	113
4.4.1 Concentrações de ANA no meio de cultivo	113
4.4.2 Concentrações de sacarose no meio de cultivo	120
4.4.3 Ajuste da concentração de ANA.....	123
4.5 TESTES PRELIMINARES VISANDO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>BUTIA ODORATA</i>	130
4.5.1 Calogênese em embriões zigóticos.....	130
4.5.2 Tecidos da inflorescência como explantes iniciais para embriogênese somática	134
4.6 DESENVOLVIMENTO INICIAL DE MUDAS DE <i>BUTIA ODORATA</i>	136
4.7 ADUBAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MUDAS.....	148
4.7.1 Ocorrência de pragas durante a condução do experimento	166
5 CONCLUSÕES	171
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Conteúdo de água dos diásporos de algumas espécies de palmeiras no ponto de coleta, citadas pela literatura. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.	14
2. Informações sobre os acessos utilizados para os experimentos com superação de dormência de sementes de <i>Butia odorata</i> (ES, SM, SV, CH e IB) e <i>Butia capitata</i> (MG). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.	48
3. Composição dos substratos utilizados no experimento com desenvolvimento inicial de mudas de <i>Butia odorata</i> . FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2010.	63
4. Características químicas da solução nutritiva, da água de irrigação e da água destilada utilizadas nos experimentos. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009.	66
5. Teor de água de diásporos de <i>Butia odorata</i> de dez matrizes coletados de uma população em Encruzilhada do Sul, RS, analisados de maneira agrupada, de acordo com a condição visual de maturação. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.	73
6. Teor de água de diásporos de <i>Butia odorata</i> de dez matrizes coletados de uma população em Encruzilhada do Sul, RS, utilizados para os experimentos de superação de dormência das sementes e teste de longevidade. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.	74
7. Massa de 1000 diásporos de <i>Butia odorata</i> de dez matrizes de uma população em Encruzilhada do Sul, RS. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.	75
8. Análise do desenvolvimento de embriões de <i>Butia odorata</i> semeados <i>in vitro</i> : Média aritmética, desvio padrão médio dos três embriões de cada diásporo e desvio padrão da média de todos os embriões. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.	83
9. Formação de plântulas (%PI/G), tempo médio de germinação (TMG), tempo médio de formação de plântulas (TMP), índice de velocidade de germinação (IVG) e índice de formação de plântulas (IVP) de sementes de <i>Butia odorata</i> coletadas em Encruzilhada do Sul, RS (BO) e <i>B. capitata</i> em Lontra, MG (BC), submetidos a três tratamentos de escarificação das sementes, após 90 dias <i>in vitro</i>	96
10. Percentual de germinação (%G), tempo médio de germinação (TMG) e de formação das plântulas (TMP), índice de velocidade de germinação (IVG) e de formação das plântulas (IVP), percentual de plântulas formadas (%PI) e percentual de plântulas formadas em relação ao número de germinadas	

(PI%/G), de quatro acessos de <i>Butia odorata</i> , cujas sementes foram submetidas à abertura total da cavidade embrionária pela retirada do opérculo, e imediatamente estabelecidas em areia, e mantidas a 25°C constantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.....	97
11. Emergência de <i>Butia odorata</i> em casa de vegetação, a partir de diásporos coletados em Santa Maria, RS, submetidos a tratamentos de quebra de dormência: SE: sementes isoladas dos endocarpos, sem tratamento de escarificação; AT: sementes isoladas dos endocarpos, escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária; D-18h: diásporos inteiros, íntegros, mantidos submersos por 18 horas em água destilada antes da semeadura; e D-40°C: diásporos inteiros, com tratamento pré-semeadura de 3 semanas a 40°C. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.....	102
12. Germinação de <i>Butia odorata</i> em ambiente de germinador, com temperatura constante de 25 °C e alternada de 20-30 °C (16-8h, respectivamente), a partir de sementes escarificadas através da remoção mecânica do opérculo da cavidade embrionária. %G: percentual de germinação; TMG: tempo médio de germinação; %PI: percentual de plântulas formadas; TMP: Tempo médio para formação de plântulas; IVGM: índice de velocidade de germinação; IVPM: índice de velocidade de formação de plântulas; e %PI/G: percentual de plântulas formadas sobre o total de sementes germinadas. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.....	104
13. Enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Butia odorata</i> submetidas a meio de cultivo com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.	114
14. Análise de correlação das variáveis respostas no experimento de enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Butia odorata</i> , em meio de cultivo com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.....	118
15. Enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Butia odorata</i> em meio de cultivo com 0,6 mg.L ⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de sacarose. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.....	121
16. Análise de variância dos dados das avaliações das plântulas de <i>Butia odorata</i> submetidas a enraizamento <i>in vitro</i> em meio de cultivo com 45 g.L ⁻¹ de sacarose e ácido naftalenoacético a 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L ⁻¹ . FZB-RS, Porto Alegre, 2009	126
17. Análise de correlação das variáveis avaliadas em plântulas de <i>Butia odorata</i> submetidas a enraizamento <i>in vitro</i> em meio de cultivo com 45 g.L ⁻¹ de sacarose e ácido naftalenoacético a 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L ⁻¹ . FZB-RS, Porto Alegre, 2009	128
18. Análise do substrato casca de pinus compostada, peneirada em malha de 5 mm, utilizado em ambos os experimentos de desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> , com ênfase nas características químicas. (Laboratório de	

Análises, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2009).....	137
19. Análise dos substratos utilizados em ambos os experimentos de desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> , com ênfase nas características físicas (Laboratório de Análise de Substratos, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2009).....	138
20. Desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> submetidas à primeira etapa do experimento em tratamentos com substratos em combinações dos componentes: casca de pinus compostada (CPC) e casca de arroz carbonizada (CAC), aos 91 dias após o estabelecimento. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2009.	139
21. Desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> submetidas a tratamentos com substratos em combinações dos componentes: casca de pinus compostada (CPC) e casca de arroz carbonizada (CAC), aos 250 dias após o estabelecimento, e a 160 dias em quatro níveis de pH. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009.	142
22. Desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> avaliadas ao final da segunda etapa do experimento com substratos em combinações dos componentes: casca de pinus compostada (CPC) e casca de arroz carbonizada (CAC), aos 250 dias após o estabelecimento, e a 160 dias em quatro níveis de pH. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009.....	144
23. Análise de variância dos dados da avaliação final de mudas de dois acessos de <i>Butia odorata</i> submetidas à adubação com diferentes doses de fertilizante, aos 426 dias após início do experimento. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2011.....	154

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Butia* com ocorrência natural no Rio Grande do Sul. *Butia odorata* (*); *B. eriospatha* (★); *B. paraguayensis* (▲); *B. yatay* (✕); *B. lallemantii* (+); *B. microspadix* (●); *B. catarinensis* (◆) e *B. witeckii* (**).. Adaptado de Lorenzi *et al.*, 2010 e Soares e Longhi (2011). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011. 6
2. Frutos de *Butia odorata* de dez matrizes coletados em Encruzilhada do Sul em fevereiro de 2008. As numerações representam os números de campo registrados no Banco de Sementes do Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. (Classificação dos frutos quanto à coloração do epicarpo: matrizes 79, 81, 82, 83, 84 e 85/08: parcialmente verdes; 73 e 80/08: verde ausente; e 79 e 86/08: verde ausente e parte abscisados) FZB-RS, Porto Alegre, 2008..... 41
3. Ilustração da disposição dos embriões de *Butia odorata* em um frasco com meio de cultivo, a fim de testar a viabilidade de embriões de mesmos diásporos (D1, D2, D3 e D4: identificação dos embriões de quatro diásporos utilizados em cada frasco; E1, E2 e E3: identificação dos três embriões de cada diásporo). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008. 45
4. Aspectos morfológicos de diásporos e sementes de butiazeiro. A: Frutos e diásporos; B: Diásporos; C: Quebra do endocarpo em torno de bancada para extração das sementes; D: sementes removidas dos endocarpos (end=endocarpo, se= semente); E: sementes de quatro acessos (op= opérculo da semente); F: corte longitudinal de uma semente (en= endosperma, ce= cavidade embrionária, em= embrião, or= cavidade embrionária com opérculo removido). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009..... 49
5. Tensiômetro usado para verificação de necessidade de irrigação durante a condução do experimento de adubação e desenvolvimento de mudas de *Butia odorata* em casa de vegetação. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2010. 70
6. Semente de *Butia odorata* sem embrião. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010..... 77
7. Germinação e desenvolvimento de plântulas de *Butia odorata in vitro*. A: embriões com pecíolo cotiledonar espiralizados ao décimo dia *in vitro* – setas brancas: região do botão germinativo; setas pretas: região do haustório; B: Início da emissão da primeira folha, ao 15º dia *in vitro* – pc: pecíolo cotiledonar; pf: primeira folha sendo emitida; ra: raiz. C: planta completa ao 30º dia após o estabelecimento *in vitro*. 81
8. Viabilidade das sementes de *Butia odorata* no ponto de coleta, oriundas de uma população em Encruzilhada do Sul. (C.10d.= embriões crescidos aos 10 dias após semeadura; C/F. 25d. = Percentual de embriões com folha visível em relação aos crescidos aos 25 dias após semeadura; C/R. 25d. =

Percentual de embriões com raiz visível em relação aos crescidos aos 25 dias após sementeira; PI. 90d.= Plântulas completas aos 90 dias após a sementeira; linha tracejada no interior da caixa = média). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.	80
9. Viabilidade das sementes de <i>Butia odorata</i> no ponto de coleta, oriundas de uma população em Encruzilhada do Sul. (Compr. Folha= Comprimento da primeira folha aos 25 dias após a sementeira; Compr. Raiz= Comprimento da raiz aos 25 dias após a sementeira; linha tracejada no interior da caixa=média), UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.	82
10. Análise de similaridade de Jaccard da germinação e desenvolvimento de embriões de <i>Butia odorata</i> oriundos de sementes de mesmos diásporos e diásporos distintos (de i a v: as cinco repetição; de a a d: os quatro diásporos em cada repetição; de 1 a 3 os três embriões de cada diásporo). FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.	84
11. Teor de água dos diásporos de <i>Butia odorata</i> ao longo do período de armazenamento em ambiente de laboratório (Ambiente), câmara fria (5 °C e 80% de umidade relativa do ar (CF) e câmara seca (17 °C e 45% de umidade relativa do ar) (CS). FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2011.	86
12. Temperatura e umidade relativa do ar, máximas e mínimas no local de armazenamento dos diásporos de <i>Butia odorata</i> em condições de laboratório. Linha em preto no interior do gráfico: tempo de armazenamento no período correspondente. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2010.	86
13. Viabilidade de sementes de <i>Butia odorata</i> ao longo do período de armazenamento em ambiente de laboratório (Ambiente), câmara fria (5 °C e 80% de umidade relativa do ar) (CF) e câmara seca (17 °C e 45% de umidade relativa do ar) (CS), testado através do desenvolvimento de embriões <i>in vitro</i> (A = embriões crescidos aos 10 dias e B= plântulas completas formadas aos 90 dias após o estabelecimento). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.....	88
14. Viabilidade de sementes de <i>Butia odorata</i> : frascos com plântulas em desenvolvimento, aos 90 dias após a sementeira. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.	89
15. Viabilidade de sementes de <i>Butia odorata</i> ao longo do período de armazenamento em ambiente de laboratório (Ambiente), câmara fria (5 °C e 80% de umidade relativa do ar) (CF) e câmara seca (17 °C e 45% de umidade relativa do ar) (CS), testado através do desenvolvimento de embriões <i>in vitro</i> (A = Percentual de folhas visíveis em relação ao percentual de embriões desenvolvidos aos 25 dias após estabelecimento e B= Comprimento da folha aos 25 dias após estabelecimento). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.....	92
16. Viabilidade de sementes de <i>Butia odorata</i> ao longo do período de armazenamento em ambiente de laboratório (Amb), câmara fria (5 °C e 80% de umidade relativa do ar) (CF) e câmara seca (17 °C e 45% de umidade relativa do ar) (CS), testado através do desenvolvimento de embriões <i>in vitro</i> (A = Percentual de raízes visíveis em relação ao percentual de embriões desenvolvidos aos 25 dias após estabelecimento e B= Comprimento da raiz aos 25 dias após estabelecimento). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.....	93

17. Germinação e formação de plântulas *in vitro* de *Butia odorata* coletados em Encruzilhada do Sul, RS (A e B) e *B. capitata* coletados em Lontra, MG (B e D), cujas sementes foram submetidas aos tratamentos de escarificação. SE: sementes íntegras; AP: abertura parcial da cavidade embrionária através de corte do opérculo; e AT: abertura total da cavidade embrionária pela retirada total do opérculo. (Letras minúsculas diferentes acompanhando as linhas indicam diferença estatística significativa pelo teste de comparação de médias DMS a 5%). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011..... 95
18. Aspectos da germinação e formação de plântula de *Butia odorata* a partir de sementes escarificadas pela abertura total da cavidade embrionária. A: Germinação em areia; B: Detalhe do alongamento do pecíolo cotiledonar aos oito dias após a sementeira (bg: botão germinativo); C: Plântula completa aos 32 dias após a sementeira (pf: primeira folha; pc: pecíolo cotiledonar; ra: radícula). FZB-RS, Porto Alegre, 2010..... 99
19. Percentual de germinação (G%) e formação de plântulas (PI%) de *Butia odorata* estabelecido *in vitro* a partir dos explantes: sementes escarificadas através da abertura total da cavidade embrionária (Sem) e embriões isolados (Embr.). Os valores P e CV ao lado das barras representam o resultado da ANOVA na comparação entre os explantes iniciais. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010..... 100
20. Emergência de plântulas de *Butia odorata* em casa de vegetação, a partir de diásporos coletados em Santa Maria, RS, submetidos aos tratamentos de superação de dormência: SE: sementes isoladas dos endocarpos, sem escarificação; AT: sementes isoladas dos endocarpos e escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária; D-18h: diásporos inteiros imersos por 18 horas em água destilada; e D-40°C: diásporos inteiros mantidos por três semanas a 40°C, seguidos de 25 °C constantes. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009. 103
21. Temperaturas máximas e mínimas absolutas e médias semanais do ambiente junto à casa de vegetação onde foi conduzido o experimento de sementeira de *Butia odorata* (Dados obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (8º Distrito de Meteorologia - Porto Alegre, 2009). 103
22. Teor de água de diásporos inteiros e de sementes isoladas de *Butia odorata* logo após a coleta; após dez dias em ambiente de laboratório; após 120 dias em ambiente de laboratório; após 120 dias em ambiente de laboratório seguido de 120 dias sob temperatura negativa; e após 120 dias em ambiente de laboratório seguido de 24h em estufa com circulação de ar forçada a 30 °C constantes. Médias seguidas de letras minúsculas para sementes e maiúsculas para diásporos, não diferem estatisticamente pelo teste DMS (5%). FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2011. 109
23. Germinação (G%) e formação de plântulas completas (PI%) a partir de sementes de *Butia odorata* escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária, após armazenadas em ambiente de laboratório por 120 dias (teor de água de 6,14%)(controle); após armazenadas em ambiente de laboratório por 120 dias seguido de 24h em estufa com circulação de ar forçada a 30 °C constantes (teor de água de 3,8%); e seguido de 120 dias sob temperatura negativa (sub-zero). Médias seguidas de letras minúsculas para

G% e maiúsculas para PI% não diferem estatisticamente pelo teste DMS (5%). FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2011.	110
24. Enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>Butia odorata</i> submetidas a meios de cultivo com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (A: percentual de plântulas com formação de calo e B: percentual de plântulas enraizadas). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.	116
25. Plântula de <i>Butia odorata</i> enraizada <i>in vitro</i> em meio de cultivo com 0,6 mg.L ⁻¹ de ANA. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.	119
26. Massa fresca das plântulas de <i>Butia odorata</i> enraizadas <i>in vitro</i> em meios de cultivo com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.	119
27. Enraizamento de plântulas de <i>Butia odorata in vitro</i> em meio de cultivo com 45 g.L ⁻¹ de sacarose e ácido naftalenoacético a 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L ⁻¹ . A: plantas com calo; B: número de raízes e C: comprimento de folhas. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.	127
28. Percentual de explantes com calo (A) e diâmetro médio de calos (B) em embriões zigóticos de <i>Butia odorata</i> cultivados em meio MS com 2 mg.L ⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de 2,4-D. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.	131
29. Percentual de explantes com calo (A) e diâmetro médio dos calos (B) em embriões zigóticos de <i>Butia odorata</i> cultivados em meio MS + 2 g.L ⁻¹ de carvão ativado e diferentes concentrações de 2,4-D. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.	132
30. Temperaturas máximas e mínimas absolutas e médias semanais do ambiente externo à casa de vegetação, de todo o período de condução do experimento com desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> . (Dados obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (8º Distrito de Meteorologia - Porto Alegre, 2009).	147
31. Temperaturas mínimas e máximas absolutas, e médias semanais do ambiente de casa de vegetação durante o período de condução do experimento de adubação e desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> (agosto de 2010 a setembro de 2011). FZB-RS, Porto Alegre, 2011.	149
32. Condutividade elétrica (CE) do substrato casca de pínus compostada nos recipientes com as mudas de <i>Butia odorata</i> no período de 30 dias entre as aplicações de fertilizantes nas concentrações 0, 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ no experimento de adubação e desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> . Método de análise: pour thru. Os valores P correspondem à significância estatística da análise de regressão linear. FZB-RS, Porto Alegre, 2011).	150
33. pH do substrato do substrato do substrato casca de pínus compostada nos recipientes coma as mudas de <i>Butia odorata</i> no período de 30 dias entre as aplicações de fertilizantes nas concentrações 0, 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ no experimento de adubação e desenvolvimento de mudas de <i>Butia odorata</i> . Método de análise: pour thru. Os valores P correspondem à significância estatística da análise de regressão linear. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.	151

34. Avaliações da condutividade elétrica (CE) do substrato do substrato casca de pínus compostada nos recipientes com as mudas de <i>Butia odorata</i> durante o período de condução do experimento de adubação com 0, 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ de fertilizantes. Método de análise: pour thru. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.....	152
35. Avaliações do pH do substrato casca de pínus compostada nos recipientes com as mudas de <i>Butia odorata</i> durante o período de condução do experimento de adubação com 0, 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ de fertilizantes. Método de análise: pour thru. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.	153
36. Avaliações do desenvolvimento das mudas de <i>Butia odorata</i> adubadas por 426 dias com diferentes doses de fertilizantes aplicados no substrato. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.	155
37. Número médio de folhas presentes em mudas de <i>Butia odorata</i> ao longo do período de condução do experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.....	158
38. Número médio de folhas pinadas presentes em mudas de <i>Butia odorata</i> ao longo do período de condução do experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.	159
39. Diâmetro do caule de mudas de <i>Butia odorata</i> ao longo do período de condução do experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.....	160
40. Percentual de mudas de <i>Butia odorata</i> com algum sintoma de distúrbio nutricional ao longo do período de condução do experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.....	161
41. Mudanças de <i>Butia odorata</i> com as intensidades dos sintomas de distúrbio nutricional considerados representativos da escala utilizada na avaliação ao longo do experimento. A: Escala zero (sem sintoma); B: escala 1; C: escala 2; D: escala 3; E: escala 4; F: escala 5; FZB-RS, Porto Alegre, 2011.....	163
42. Intensidade dos sintomas de distúrbio nutricional em mudas de <i>Butia odorata</i> ao final de 426 dias em experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L ⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.....	164
43. Cochonilha <i>Abgrallaspis cyanophylli</i> observada em mudas de <i>Butia odorata</i> . Corpo corado em fuccina ácida após clareamento. Coleta e processamento: Gabriela Chesim de Souza. Identificação: Dra. Vera Wolff. FEPAGRO, Porto Alegre, RS, 2011.....	167
44. Lepidóptero em folhas primárias de <i>Butia odorata</i> . Fundação Zoobotânica, Porto Alegre, RS, 2011.....	169
45. Sintoma de ataque de Eriophyidae em mudas de <i>Butia odorata</i> em casa de vegetação. Setas: localização dos principais sintomas. Fundação Zoobotânica, Porto Alegre, RS, 2011.....	169

46. Ilustração de um indivíduo de ácaro (Eriophyidae) em mudas de *Butia odorata* em casa de vegetação. A: vista ventral; B: vista lateral. Barra: 50µm. Identificação e Foto: Dra. Ana Paula Ott. Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011). 170

1 INTRODUÇÃO

Dentre os requisitos para o desenvolvimento econômico e social brasileiro, estão a valorização e a apropriação do patrimônio genético silvestre. O domínio sobre aspectos reprodutivos, preferências ambientais e conhecimento do potencial das espécies da flora nativa contribui para o desenvolvimento de sistemas de uso sustentável de plantas, inclusive para a contenção do iminente processo de extinção de germoplasma. O conhecimento destes aspectos torna-se uma importante ferramenta, seja para evitar o extrativismo indiscriminado, através da conservação *ex situ*, ou pela contribuição com conhecimentos que subsidiem a manutenção dos genótipos nos locais de ocorrência natural (Fior; Calil e Leonhardt, 2004).

A flora silvestre brasileira apresenta excelente potencial para exploração agrícola. Muitas espécies nativas têm sido exploradas visando a oferecer alternativas de novos produtos ao mercado e, ao mesmo tempo, explorar genótipos ambientalmente adaptados.

O butiazeiro, palmeira característica do Uruguai e do Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul, forma uma associação única no mundo por sua dimensão e densidade. Desenvolve-se fundamentalmente sobre solos planos, inundáveis em épocas de chuvas, embora também seja possível encontrá-lo em regiões serranas (Geymonat e Rocha, 2009).

Através de estudos arqueológicos, constatou-se que frutos de butiá são utilizados por humanos há séculos. Foram encontrados caroços de frutos carbonizados junto a restos mortais de indígenas sepultados há 2000 anos no Rio Grande do Sul (Dantas, 1997, citado por Rossato, 2007) e há 2500 anos no Uruguai (Cardoso, 1995). Também há relatos que, no século XX, as folhas de butiazeiros eram utilizadas para extração de fibras que abasteciam fábricas de colchões, geralmente instaladas em locais onde existiam grandes palmares (Quaraí, Barra do Ribeiro e Santa Vitória do Palmar, RS). Além destas, há informações sobre os seguintes usos: **dos frutos** – para consumo *in natura*, doces, geleias, sorvetes, licores, mel (infusão a base de açúcar, polpa e água); **das sementes** - “café de coco” (sementes torradas e moídas), “óleo de amêndoas” para fabricação de sabão, “azeite de coco”, consumo das sementes *in natura* e alimentação de animais; **das folhas** - extração de fibras para preenchimento de colchões, artesanato, cestas, chapéus, bolsas, redes, armadilhas para caça e pesca, estofado de assentos, tapetes, vassouras, solas de “alpargatas”, cobertura de galpões, pocilgas e estrebarias; **do estipe** - construção de galpões e paióis, além de vasos para plantas (Geymonat e Rocha, 2009; EPAGRI, 2007; Tonietto; Schlindwein e Tonietto, 2009). Resultados de um levantamento etnobotânico realizado na região sul do Rio Grande do Sul sugerem que existe uma forte relação do ser humano com o butiazeiro, a qual é estabelecida desde a infância (Büttow *et al.*, 2009).

A carência de trabalhos científicos sobre propagação de *Butia* dificulta qualquer planejamento para produção de mudas em escala comercial. Informações básicas como beneficiamento de sementes, formas de armazenamento, poder germinativo em condições de viveiro e longevidade, entre

outras, são encontradas de forma discordante ou insuficiente na literatura científica.

Trabalhos recentes têm demonstrado o grande potencial dos frutos de *Butia* para fabricação de inúmeros produtos pela agroindústria. No entanto, avanços neste sentido são barrados pela falta de conhecimento sobre a produção em escala e manejo de mudas.

Por outro lado, são inúmeros os casos de flagrantes de extração ilegal de exemplares adultos de butiazeiros para uso em paisagismo. Estima-se que alguns desses espécimes apresentem idade superior a cem anos, o que descarta a possibilidade de terem sido cultivados para tal finalidade.

Desta forma, salienta-se a necessidade de intensificar esforços no sentido de conhecer aspectos que subsidiem a propagação comercial, como forma primordial de incentivar o cultivo desta espécie a fim de viabilizar a exploração econômica e, ao mesmo tempo, contribuir para sua preservação.

Pelo exposto, o presente trabalho teve por objetivo geral investigar aspectos relacionados à germinação de sementes, ao desenvolvimento *in vitro* de embriões e plântulas, à indução de embriogênese somática a partir de tecidos juvenis e adultos, bem como ao desenvolvimento inicial e formação de mudas em casa de vegetação, a fim de subsidiar a produção de mudas em escala.

Ciente da existência de dúvidas na identificação das populações de *Butia spp*, no presente trabalho optou-se pela classificação proposta por Lorenzi *et al.* (2010). Na revisão bibliográfica e coleta de informações, tomou-se como critério o enquadramento da população citada em cada fonte pesquisada, de acordo com os locais de ocorrência de cada espécie, conforme descrição dos autores da classificação aceita.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Distribuição geográfica, Identificações taxonômicas, e informações ecológicas

As palmeiras têm distribuição em habitat que vão desde o sul da França, com 44º de latitude Norte, como é o caso da espécie *Chamaerops humilis*, até Nova Zelândia, 44º Sul, como a espécie *Rhopalostylis sapida*. No entanto, a grande maioria das espécies são nativas das regiões tropicais da Terra (Johnson, 2010).

O continente sul americano é um dos maiores centros de riqueza e diversidade biológica para essa família, pois quatro das suas cinco subfamílias ocorrem na região (Geymonat e Rocha, 2009). A espécie mais conhecida desta família, o coqueiro-da-bahia (*Cocos nucifera*), teria se originado a partir de ancestrais surgidos na América do Sul no período Paleoceno, há aproximadamente 60 milhões de anos (Gunn, 2004).

Fazem parte das arecáceas aproximadamente 200 gêneros e 3000 espécies. Na América do Sul há cerca de 40 gêneros autóctones, sendo 37 no Brasil. O gênero *Butia* pertence à subfamília Arecoideae, tribo Coccoideae, subtribo Butiinae. Tem distribuição da Bahia e Goiás até o Uruguai, Paraguai e Argentina (Marcato, 2004). Compreende 18 espécies, sendo que 16 delas ocorrem no Brasil (Lorenzi *et al.*, 2010).

O nome *Butia* foi usado pela primeira vez como um subgênero de *Cocos* por Beccari em 1887 (Glassman, 1970). Em 1903, Barbosa Rodrigues fez uma subseção de *Butia* em *Cocos*. Mais tarde, em 1916, Beccari elevou o subgênero *Butia* para a condição de gênero (Glassman, 1970). De acordo com Barbosa Rodrigues (citado por Reitz, 1974), o nome indígena “butia” é uma corruptela de “mbotia”, que, por sua vez, vem de “mbo”: fazer, e “tia”: dente curvo, alusão aos “dentes” que guarnecem lateralmente o pecíolo.

Segundo Marcato (2004), o gênero *Butia* pode ter ancestralidade comum com *Jubaea*, endêmico do Chile, talvez associada ao surgimento da Cordilheira dos Andes, no final do período Mioceno. Segundo este mesmo autor, *Butia* possui várias formas biológicas geradas por radiações adaptativas no gênero. Ocupa ambientes mesófilos e secos, com clima um tanto desfavorável para a maioria das palmeiras. Juntamente com o gênero *Trithrinax*, *Butia* situa-se no limite austral da distribuição das palmeiras, alcançando o Pampa, com clima temperado e vegetação predominantemente herbácea (Geymonat e Rocha, 2009).

No Rio Grande do Sul ocorrem oito espécies do gênero: ***Butia odorata*** (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, ***B. eriospatha*** (Mart. Ex Drube) Becc., ***B. paraguayensis*** (Barb. Rodr.) L. H. Bailey, ***B. yatay*** (Mart.) Becc., ***B. lallemantii*** Deble & Marchiori, ***B. microspadix*** Burret, ***B. catarinensis*** Noblick & Lorenzi (Lorenzi *et al.*, 2010) e ***Butia witeckii*** K. Soares & S. Longhi (Soares e Longhi, 2011) (Figura 1).

A espécie *B. capitata* foi durante muitos anos citada como nativa no Rio Grande do Sul e no Uruguai, sendo considerada, inclusive, da mesma classificação taxonômica que a espécie conhecida popularmente como coquinho-azedo que ocorre nas regiões de Cerrado de Minas Gerais, Goiás e Bahia. No entanto, de acordo com Lorenzi *et al.* (2010), tratam-se de espécies distintas e,

uma vez que *B. capitata* denomina a população do planalto brasileiro anteriormente à descrição das populações do Sul, estas passam a ser identificadas por *B. odorata*, conforme sugerido por Barbosa Rodrigues em 1891 (*Cocos odorata*). De acordo com Lorenzi *et al.* (2010), uma das diferenças morfológicas entre as espécies está na formação de estruturas semelhantes a dentes curvos que se formam na base dos pseudopecíolos de *B. odorata*, enquanto que em *B. capitata*, no lugar de “dentes”, há apenas o desenvolvimento de fibras.

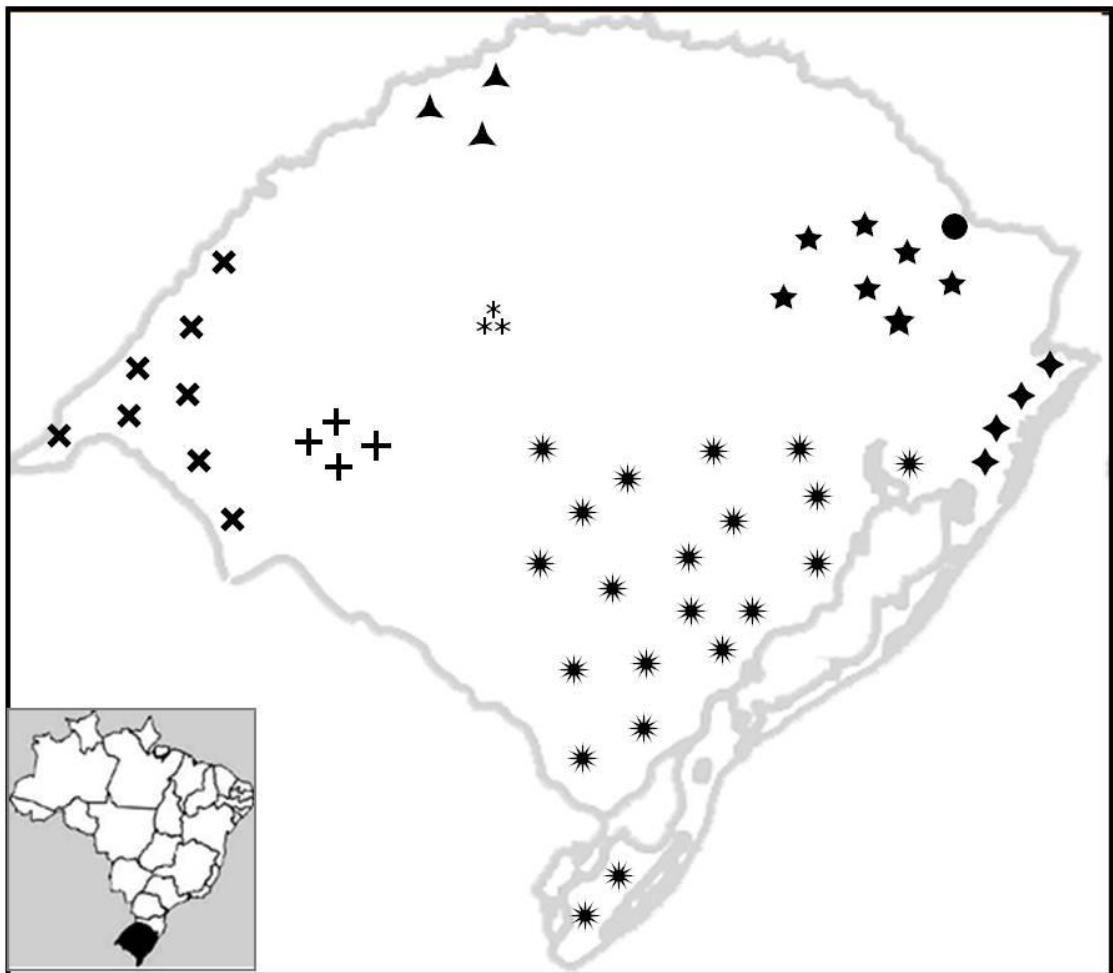


FIGURA 1. Distribuição geográfica das espécies do gênero *Butia* com ocorrência natural no Rio Grande do Sul. *Butia odorata* (*); *B. eriopatha* (★); *B. paraguayensis* (▲); *B. yatay* (✕); *B. lallemantii* (⊕); *B. microspadix* (●); *B. catarinensis* (◆) e *B. witeckii* (⌘). Adaptado de Lorenzi *et al.*, 2010 e Soares e Longhi (2011). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.

Outra alteração de denominação diz respeito às populações que ocorrem no litoral norte do Rio Grande do Sul e ao longo do litoral de Santa Catarina. Identificadas até recentemente por *B. capitata* por alguns autores e *B. capitata* var. *odorata* por outros, foi classificada como pertencente à espécie *B. catarinensis* (Lorenzi *et al.*, 2010).

A espécie *B. lallemantii*, que ocorre nos campos de Alegrete, Manoel Viana e São Francisco de Assis, era considerada até 2006, como pertencente à espécie *B. paraguayensis*, sendo então descrita por Deble e Marchiori (2006) como uma nova espécie do gênero. Segundo estes autores, a denominação da espécie homenageia o autor do primeiro relato de indivíduos com tais características, o médico alemão Ave-Lallemant, que esteve na região em meados do século XIX. De acordo com Geymonat e Rocha (2009), *Butia lallemantii* também ocorre no Uruguai.

No presente ano, Soares e Longhi (2011) analisaram aspectos ecológicos e dados biométricos de uma população de *Butia* em *habitat* natural no município de Quevedos, RS, além de observações de desenvolvimento de plantas oriundas desta população, em ambiente *ex situ*. Esses autores concluíram que trata-se de uma nova espécie, descrevendo-a com a denominação de *Butia witeckii* K. Soares e S. Longhi.

Há hipóteses que, devido à dispersão antrópica de sementes e mudas e à possibilidade de hibridação natural, inclusive intergenérica, como é o caso de híbridos entre *Butia* sp e *Syagrus* sp, os quais produzem sementes viáveis (Bush, 1974), ocorra grande variabilidade fenotípica neste gênero, o que contribui para discordâncias em relação à identificação. Estas hipóteses tornam-se mais prováveis pelo fato de que, possivelmente, todas as oito espécies do gênero *Butia* que ocorrem no Rio Grande do Sul apresentem o mesmo número cromossômico,

pois em estudos recentes com cinco destas espécies, incluindo *B. odorata*, foi constatado o número cromossômico para todas elas, $2n=32$ (Corrêa *et al.*, 2009).

B. odorata apresenta plantas com porte de oito a dez metros, embora possam ser encontrados indivíduos que chegam a 20 metros. Possui estipe simples com circunferência à altura do peito de 1,5m. As folhas são acinzentadas em número de até 32 contemporâneas, das quais há renovação anual de 12 a 14. Sua floração ocorre nos meses de primavera e verão e a maturação dos frutos no verão e outono. É uma espécie monoica e apresenta inflorescências com flores unissexuadas na mesma ráquila. O fruto é uma drupa carnosa, com uma a três sementes. Esta variação geralmente é diretamente proporcional ao diâmetro do endocarpo (Pedron; Meneses e Meneses, 2004; Geymonat e Rocha, 2009; Lorenzi *et al.*, 2010).

Conforme Azambuja (2001), descobertas de estipes fossilizadas indicam que os butiazais da região de Rocha, Castillos e Trienta y Tres, no Uruguai, e, por extensão, de Santa Vitória do Palmar, no Brasil, são anteriores à presença humana nesta região, o que, conforme López (1994), citado por PROBIDES (1999), ocorreu há, pelo menos, cinco milênios. De acordo com estudos, atualmente nestes locais a presença de indivíduos jovens é mínima, predominando plantas com, pelo menos, duzentos anos, pois a presença de rebanhos bovinos e suínos, introduzidos no local há cerca de dois séculos, não permite o estabelecimento e desenvolvimento de plantas jovens. Além disso, a agricultura também tem afetado a regeneração, tanto pela degradação e compactação do solo, como pela diferença dos regimes hídricos provocada pelo cultivo de arroz irrigado. O envelhecimento dos exemplares que atualmente compõem os palmares do Uruguai e a ausência de regeneração natural afetam toda a área dos palmares pondo em perigo de extinção esta associação vegetal.

Além disso, a maior parte das áreas com palmares é de propriedade de produtores rurais, o que torna extremamente difícil a política de conservação (Pezzani, 2007). De acordo com Rivas e Barilani (2004) e Rivas (2005), estes palmares ocupam uma área aproximada de 70 mil hectares, distribuídos em duas grandes regiões: Castillos e San Luis. Estas comunidades vegetais são reconhecidas por sua diversidade biológica, valor cultural e pelo uso tradicional de seus frutos pela população local.

Báez e Jaurena (2000) salientaram que a conservação dos palmares de *B. odorata*, como comunidade ecológica, como paisagem, como recurso natural e como elemento de identidade cultural para as populações da zona dos palmares do Uruguai encontra-se ameaçada. Esses mesmos autores realizaram um estudo sobre a regeneração de palmares de *B. odorata* em condições de pastejo em estabelecimentos rurais. Foi verificado que em condições de presença de baixa lotação de bovinos, alternada com exclusão total estacional, ocorre a regeneração do palmar. Em condição de sub-bosque verificou-se a presença de plantas jovens com bom aspecto. No entanto, indivíduos de maior porte eram mais frequentes em situação de maior exposição solar, como nas bordas dos bosques. Em campos pastejados exclusivamente por equinos verificou-se regeneração de plantas em diferentes fases vegetativas. A seletividade da alimentação destes animais pode explicar tal situação.

No Rio Grande do Sul, a área com maior concentração de butiazeiros encontra-se na região de Tapes e Barra do Ribeiro. São aproximadamente 1200 hectares, com densidade média de 60 a 100 plantas adultas por hectare. Em áreas no entorno, ainda na abrangência da Coxilha das Lombas, também há ocorrência da espécie, porém em menor densidade (Laboratório de Geoprocessamento/FZB-RS – Comunicação pessoal; Oliveira *et al.*, 2007).

Os locais de ocorrência da espécie *B. odorata* no Rio Grande do Sul fazem parte do chamado Bioma Pampa. São ecossistemas com alta diversidade de espécies vegetais e animais. Neles, a vegetação arbórea esteve provavelmente ausente entre 11.500 e 42.800 anos (período glacial, Holoceno Inferior e Médio), havendo extensas áreas de vegetação campestre. Com o aumento da temperatura e frequência de precipitações no Holoceno Superior, ocorreu o início da expansão florestal. Contudo, possivelmente a presença da fauna herbívora nativa da região, associada a grandes animais pastadores imigrados a partir da colisão das Américas do Norte e Sul, tenha controlado o avanço da vegetação arbórea. Quando esses animais maiores foram extintos, há cerca de 8 mil anos, e até a introdução do gado bovino, no século XVII, a expansão desta vegetação pode ter sido controlada pelas queimadas, cujo aumento da frequência foi evidenciado em estudos arqueológicos (Behling *et al.*, 2009).

2.2 *Butia* spp: reprodução e informações fitotécnicas

Em estudos realizados por Rossato (2007) com cinco espécies de *Butia* nativas no Rio Grande do Sul, incluindo *B. odorata*, foi constatado que as flores masculinas apresentam fertilidade anterior às femininas, mesmo em casos de mais de uma inflorescência na mesma planta. Este mesmo autor menciona a presença de flores masculinas tanto no ápice do ráquis como também na parte basal e média. No entanto, em plantas estudadas por Espinosa (2001), em Castillos, há maior proporção de flores masculinas no ápice das ráquias.

Rosa; Castellani e Reis (1998) estudaram aspectos reprodutivos de *B. capitata* em Santa Catarina (*B. catarinensis*, pela classificação considerada neste trabalho). Conforme estes autores, a floração acontece de julho a fevereiro, com maior número de inflorescências em antese em novembro e dezembro. A

maturação das flores masculinas ocorre antes das femininas, caracterizando a protandria, que contribui para a polinização cruzada. No entanto, em plantas com mais de uma inflorescência, a maturação de flores pistiladas e estaminadas pode coincidir no tempo. Também, a abertura gradual das flores, conforme observado, tende a prolongar o tempo para ação dos polinizadores.

De acordo com Rosa; Castellani e Reis (1998) a maturação dos frutos de *B. capitata* (*B. catarinensis*) ocorre de novembro a maio, com pico em fevereiro. No Rio Grande do Sul, existem raros casos de florescimento de *B. odorata* no mês de junho e frutificação em julho (Büttow *et al.*, 2009).

De acordo com Cardoso (1995), cada inflorescência de *B. odorata* desenvolve de 30 a 45 mil flores, com uma relação de flores masculinas e femininas de 12 a 20:1, e cada infrutescência, conforme Rivas e Barilani (2004) produz, em média, pouco mais de mil frutos.

Estudando características fenotípicas das populações de Castillos e San Luis, Rivas (2005) verificou que, para a maioria das variáveis, há elevados níveis de diferenças entre e dentro das populações, dentre elas: frutos por infrutescência, cor do epicarpo, massa e diâmetro dos frutos, massa do endocarpo, número de lóculos, massa de 1000 sementes e número de sementes sãs por fruto. Nas mesmas populações, Rivas e Barilani (2004) verificaram que a coloração dos frutos não diferiu significativamente entre as populações, na distribuição das frequências, sendo classificados em seis classes de cores, desde o amarelo claro até próximo do vinho. Contudo, na população de Castillos foram encontrados frutos de uma coloração que não ocorre nas plantas de San Luis, sugerindo a existência de um alelo específico naquela população. Estes dados corroboram as observações de alguns autores que identificaram características reprodutivas que viabilizam a ocorrência da polinização cruzada, como é o caso

de protandria em *B. catarinensis* (Rosa; Castellani e Reis, 1998).

A estimativa de rendimentos potenciais de frutos, bem como do potencial reprodutivo constituem informações básicas para qualquer empreendimento cujo objetivo seja a conservação e o uso sustentável dos frutos de butiazeiro (Rivas e Barilani, 2004). Da mesma forma, estas informações são relevantes para qualquer planejamento que vise à produção comercial.

Não foram encontradas informações de produtividade de palmares cultivados. Alguns estudos realizados em populações naturais permitem uma estimativa aproximada de produtividade. Rossato (2007) comparou aspectos produtivos das espécies de *Butia* nativas no Rio Grande do Sul e concluiu que a espécie considerada atualmente como *B. catarinensis* apresenta maior potencial para a produção de frutos, já *B. yatay* e *B. paraguayense* para rendimento de óleo, com teores acima de 30%, contra 20% para as demais espécies. Rivas e Barilani (2004), estudando aspectos produtivos da população de *B. odorata* em Castillos, no Uruguai, mensuraram uma produtividade aproximada de 11 toneladas de frutos por hectare, destes, 7,9 toneladas de polpa. Na mesma região, Espinosa (2001) verificou produtividade de frutos de 7,07 toneladas por hectare. A densidade populacional do palmar estudado era de, aproximadamente, 480 plantas por ha.

Schwartz *et al.* (2010) avaliaram o ciclo de produção e a produtividade de plantas de *B. odorata* (*Butia capitata*, conforme a publicação) de três populações de Santa Vitória do Palmar, RS, durante dois períodos reprodutivos consecutivos. O peso das infrutescências e o número de frutos não diferiram entre os períodos, sendo em média de 56 Kg por planta por safra e 1.136 frutos por infrutescência. O peso médio dos frutos foi diferente entre as populações, mas a média geral foi de 11,9 g, com uma relação de massa entre polpa e fruto de 80%. Na média das

populações, em ambos os períodos, a duração do ciclo, desde o florescimento até a maturação dos frutos, foi de 85 dias, considerando que a temperatura média dos meses de outubro a maio variou entre 19 e 20 °C.

2.3 Caracterização de diásporos e germinação de palmeiras

A determinação do momento da coleta de sementes pressupõe o conhecimento de mudanças estruturais nos frutos e nas sementes, principalmente durante a última fase do período de maturação. Os índices indicadores de maturidade variam de acordo com o tipo de fruto e a espécie, e devem ser identificados para cada espécie em particular. Um deles é o conteúdo percentual de água das sementes (Tabela 1). Os índices baseados nas mudanças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, como: tamanho, densidade aparente, teor de umidade e peso de matéria seca, são parâmetros que permitem inferir sobre o estágio de maturação das sementes, fornecendo uma estimativa da época adequada para sua colheita (Piña-Rodrigues e Aguiar, 1993).

O momento esperado para a coleta de sementes é aquele que coincide com os melhores índices de qualidade das mesmas. Esta condição corresponde à fase de maturidade fisiológica da semente que, frequentemente, coincide com a máxima massa de matéria seca (Carvalho e Nakagawa, 1983).

Diásporos de palmeiras podem possuir endocarpo relativamente espesso. Uma tampa de germinação, ou opérculo, pode ser observada na testa ou endocarpo de algumas espécies. O embrião, relativamente pequeno e normalmente cilíndrico, é encontrado sob o opérculo (Pérez, 2009).

TABELA 1. Conteúdo de água dos diásporos de algumas espécies de palmeiras no ponto de coleta, citadas pela literatura. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.

Espécie	Teor de água dos diásporos	Fonte bibliográfica
<i>Geonoma brevispatha</i>	44%	Gomes; Válio e Martins, 2006
<i>Archontophoenix cunninghamii</i>	35%	Luz e Pivetta, 2010
<i>Euterpe edulis</i>	50%	Gomes <i>et al.</i> , 2006
<i>Euterpe edulis</i>	48%	Panza <i>et al.</i> , 2007
<i>Archontophoenix alexandrae</i>	37%	Charlo <i>et al.</i> , 2006:
<i>Butia capitata</i> (sementes isoladas)	5,9%	Lopes <i>et al.</i> , 2011
<i>Butia capitata</i>	11,3%	Lopes <i>et al.</i> , 2011
<i>Butia capitata</i> (sementes isoladas)	6,7%	Lopes <i>et al.</i> , 2007
<i>Butia capitata</i>	14,9%	Lopes <i>et al.</i> , 2007
<i>Dypsis lutescens</i>	35%	Negreiros e Perez, 2004
<i>Phoenix reclinata</i>	15%	Negreiros e Perez, 2004
<i>Roystonea oleraceae</i>	16%	Negreiros e Perez, 2004
<i>Bactris gasipaes</i>	38 a 47%	Bovi; Martins e Spiering, 2004
<i>Archontophoenix alexandrae</i>	47%	Martins; Bovie e Nakagawa, 2003
<i>Oenocarpus minor</i>	46,5 %	Silva <i>et al.</i> , 2006
<i>Elaeis guineensis</i>	10 a 12%	Hong e Ellis, 1996
<i>Syagrus romanzoffiana</i>	17%	Fior <i>et al.</i> , 2003

Conforme Meerow (1991) a germinação das sementes de palmeiras pode ser classificada em dois tipos: germinação remota e germinação adjacente. Na germinação das sementes do tipo remota, o eixo embrionário desenvolve-se a uma certa distância da semente. A primeira estrutura a emergir é chamada de pecíolo cotiledonar, que penetra no solo para então dar origem à raiz primária e à parte aérea da plântula. O cotilédone permanece no interior da semente, funcionando como um órgão para absorção de nutrientes, denominado haustório. O haustório transfere nutrientes do endosperma para a plântula em desenvolvimento.

Queiroz (1986) desenvolveu um estudo com o objetivo de propor um critério de avaliação para reduzir o tempo de acompanhamento dos testes de

germinação de sementes de *Euterpe edulis*, antecipando a avaliação pela visualização da protrusão do botão germinativo. A conclusão foi que o critério pode ser utilizado como indicativo da germinação tendo em vista sua igualdade ao nível estatístico com a emissão de estruturas da plântula. Segundo o autor, o método permite antecipar em seis semanas a avaliação da germinação da espécie.

De acordo com Robinson (2002), para a maioria das palmeiras, alguns cuidados pré-semeadura possibilitaram melhores resultados na germinação, dentre eles: imersão em água para viabilizar a embebição; estratificação em temperatura baixa ou alta, imitando a condição de um banco de sementes natural; escarificação, tanto pela imersão em ácido como corte ou lixamento do endocarpo; e retirada das sementes dos frutos para eliminação de um possível inibidor natural da germinação.

Ao que tudo indica, a presença de luz não é um fator determinante na germinação de palmeiras. Segundo Meerow (1991) a germinação de sementes de palmeiras pode ocorrer em pleno sol, com apenas uma fina camada de substrato para não desidratar as sementes, ou à sombra. Neves *et al.* (2008b) verificaram que a luz não influencia o desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia capitata*, nem o desenvolvimento inicial das plântulas. No entanto, constataram que a emissão de raízes foi superior em ambiente escuro. Respostas semelhantes foram observadas em *Euterpe edulis* por Tavares *et al.* (2008), pois não houve efeito significativo do sombreamento sobre o percentual de germinação e tampouco sobre o índice de velocidade de emergência, quando testados de zero a 80% de sombreamento.

Conforme Meerow (1991), a imersão dos endocarpos em água (trocada diariamente) por um a sete dias antes da semeadura, eleva a taxa de germinação.

Este autor também mencionou que o ácido giberélico não é recomendado para areáceas.

Ferreira e Gentil (2006) concluíram que a remoção do endocarpo e a embebição das sementes de *Astrocaryum aculeatum* durante nove dias antes da semeadura favoreceu a germinação.

Magalhães *et al.* (2008) avaliaram a viabilidade de sementes de *B. capitata* após período de semeadura de diásporos e das sementes isoladas através da análise dos embriões em sal de tetrazólio. Cento e oitenta dias após a semeadura, as sementes isoladas apresentavam-se deterioradas, enquanto que a viabilidade dos embriões nos diásporos permanecia semelhante à condição de recém semeadura.

Fior *et al.* (2003) testaram a emergência de plântulas de *Syagrus romanzoffiana* utilizando diásporos inteiros com 17% de umidade, obtidos de frutos maduros. Sob temperatura constante de 30 °C, através de semeadura entre areia, estes autores obtiveram 88% de emergência com tempo médio de 39 dias.

De acordo com Robinson (2002), sementes de palmeiras tropicais e subtropicais germinam melhor com temperatura do solo entre 27 e 32 °C, enquanto as de ambiente de deserto, entre 34 e 37 °C.

2.3.1 Dormência em sementes

Enquadram-se como dormentes, as sementes cuja germinação inicia em um prazo maior que quatro semanas após a semeadura, desde que em condições ambientais adequadas para a germinação da espécie (Baskin e Baskin, 1998).

A dormência pode ser classificada em dois grupos principais: endógena e exógena. A dormência endógena ou embrionária é causada por algum bloqueio à germinação relacionado ao próprio embrião, que eventualmente pode envolver

tecidos extra-embrionários, e pode ser dividida em: fisiológica, morfológica e morfofisiológica. A dormência exógena ou extra-embrionária é causada pelo tegumento, pelo endocarpo, pelo pericarpo e/ou órgãos extra-florais, em geral com pouca ou nenhuma participação direta do embrião em sua superação. Em geral, os mecanismos associados a essa modalidade de dormência estão relacionados à impermeabilidade, ao efeito mecânico e/ou à presença de substâncias inibidoras dos tecidos, podendo ser dividida em física, química ou mecânica (Cardoso, 2004).

Baskin e Baskin (2004) sugerem que os tipos de dormência fisiológica e física não devem ser tratados de forma isolada e que esses tipos de dormência ocorrem de forma associada. Segundo estes autores, a dormência mecânica é um componente de dormência fisiológica, e que a barreira que restringe o crescimento do embrião (germinação) ocorre em função de um baixo potencial de crescimento do próprio embrião ou a um condicionamento da semente. Embora a germinação de algumas sementes esteja limitada apenas por inibidores impostos pelo fruto, na maioria dos casos a sua influência é combinada com dormência fisiológica do embrião. Os autores ainda relatam como exemplo as leguminosas, cuja dormência causada pela barreira física imposta pela testa da semente não representa um único mecanismo de dormência, como é frequentemente presumido quando a dormência é quebrada artificialmente. Para os mesmos autores ainda há caso de espécies que logo após a coleta apresentam dormência supostamente imposta pela impermeabilidade à água, mas depois de determinado período de armazenamento a germinação ocorre mesmo sem tratamento prévio, o que não ocorria em condição de recém coleta. Estes tipos de sementes podem ainda serem classificadas em diferentes níveis de dormência, principalmente relacionando o tempo necessário para que tal superação ocorra.

A dormência em sementes de palmeiras varia consideravelmente entre as diferentes espécies. Existem desde espécies que exibem dormência reconhecidamente pronunciada, como é o caso de sementes do gênero *Acrocomia* e *Elaeis*, até espécies cujas sementes germinam logo que semeadas, não requerendo quaisquer procedimentos especiais para a obtenção das mudas, como é o caso das sementes do coqueiro-da-bahia (*Cocos nucifera* L.). De modo geral, entretanto, o tempo médio requerido para a germinação da maioria das sementes de palmeiras, sob condições naturais, é superior a um ano (Costa e Marchi, 2008).

Trabalhando com diásporos de frutos maduros de *B. capitata*, Carpenter (1988) obteve maior percentual de germinação a 40 °C. Tratamento com ácido giberélico a 1000 ppm por 24 h e tratamento de escarificação mecânica do endocarpo não alteraram a taxa de germinação, comparados ao controle. Conforme este autor, para a germinação, há necessidade de um período de armazenamento após a coleta. Desta forma, para obter, pelo menos, 66% de germinação, seriam necessários períodos de armazenamento inversamente proporcionais à temperatura do ambiente de armazenamento, em média, 90 dias a 25 °C, 102 dias a 15 °C e 125 dias a 5 °C. A semeadura foi realizada com regime térmico alternado, 40 °C por três semanas, seguido de 30 °C.

Pereira (2008) testou a germinação de *Butia purpurascens* após escarificação com ácido sulfúrico ou lixamento do ápice do endocarpo. Estes tratamentos não favoreceram a germinação, não diferindo do controle. De acordo com o autor, as sementes apresentaram período de dormência de onze meses.

Carpenter (1988) estabeleceu embriões de sementes maduras de *Butia capitata in vitro* e observou que, entre 30 e 50 dias, todos formaram plântulas. O autor propôs que a dormência das sementes desta espécie não está associada ao

embrião.

Sch lindwein *et al.* (2007) submeteram endocarpos de *B. odorata* recém coletados à secagem por 24h a 30 °C (umidade final de 8,58%), seguida de semeadura em diferentes regimes térmicos. Os resultados mostraram que o número de plantas emergidas foi 100% superior ao tratamento controle (umidade de 17,3%). Temperaturas constantes não favoreceram a emergência, sendo nula em todas as condições testadas. Por outro lado, a combinação de 40 e 30 °C resultou, em média, em mais de uma plântula por diásporo semeado.

Lopes *et al.* (2011) testaram tratamentos físicos e químicos para superação de dormência de sementes de *Butia capitata*. Estes autores concluíram que o endocarpo interfere negativamente na germinação. A escarificação através de abertura mecânica do poro germinativo do diásporo, bem como o isolamento das sementes do endocarpo promoveram maior percentagem de germinação, índice de velocidade de emergência, comprimento da raiz e matéria fresca e seca da raiz. No experimento, não houve efeito isolado da pré-embebição em ácido giberélico a 1000 ppm ou em água por 24 horas na percentagem emergência, a partir de diásporos, sementes ou diásporos escarificados.

De acordo com as Regras Internacionais de Análise de Sementes (Brasil, 2009), para análise rápida de viabilidade de espécies que germinam lentamente ou apresentam dormência, aplica-se o chamado “teste do embrião excisado”, através do qual embriões são extraídos das sementes após embebição das mesmas por 24 a 96 horas a 25 °C. Em seguida, os mesmos são incubados por 5 a 14 dias sobre papel filtro umedecido com água destilada, sob fotoperíodo igual ou superior a 8h. Durante as avaliações, são considerados viáveis: os embriões firmes e com pequeno aumento de tamanho e coloração branca, verde ou amarela, dependendo da espécie; com um ou mais cotilédones exibindo

crescimento ou pigmentação verde e embriões em desenvolvimento. Para os resultados, deve ser contabilizado o percentual de sementes que apresentaram embriões viáveis. Neste cálculo, devem ser consideradas inviáveis as sementes que se apresentavam vazias, ou com embrião parcial ou totalmente comprometido.

2.3.2 Armazenamento de sementes

A importância do armazenamento das sementes tem sido reconhecida desde que os seres humanos começaram a domesticar as plantas. No início da agricultura, a necessidade da manutenção de sementes viáveis era de curto prazo, normalmente de uma estação de crescimento para a próxima. O avanço da agricultura, associado ao melhoramento genético e a necessidade de manutenção de bancos de germoplasma, fez com que essa necessidade fosse ampliada a um período muito maior, o que se tornou uma tarefa mais complexa e que exige instalações específicas e uma grande quantidade de informações sobre cada espécie (Hong e Ellis, 1996).

São reconhecidas três categorias principais na classificação do comportamento fisiológico de sementes em armazenamento. Roberts (1973) definiu duas categorias, as ortodoxas e as recalcitrantes. Mais tarde, uma categoria intermediária, entre ortodoxas e recalcitrantes, foi descrita por Ellis; Hong e Roberts em 1990.

Conforme Hong e Ellis (1996) sementes com comportamento ortodoxo podem ser mantidas satisfatoriamente *ex situ* por longo prazo em ambiente apropriado. Relativamente a essa, a manutenção da viabilidade de sementes de espécies recalcitrantes ou intermediária apresenta problemas. É essencial conhecer o comportamento fisiológico das sementes de determinada espécie, de

maneira a identificá-la entre ortodoxa, intermediária ou recalcitrante, a fim de determinar, em primeiro lugar, o ambiente de armazenamento mais adequado e segundo, a probabilidade da duração de armazenamento bem-sucedida. Já as sementes recalcitrantes, em geral, são dispersas da planta matriz com teor de água elevado e não toleram a redução do percentual de umidade sem perda de viabilidade. Em condições de armazenamento, mesmo com a manutenção do teor de água das sementes em níveis elevados, para a maioria das espécies de comportamento recalcitrante ocorre rápida perda de viabilidade, podendo chegar a zero em poucas semanas de armazenamento.

De acordo com Hong e Ellis (1996) sementes que toleram dessecação até 5% de umidade não necessariamente apresentam comportamento de ortodoxa. Como exemplo, os autores citam o trabalho de Seaton e Hailes (1989) e Pritchard e Seaton (1993), onde sementes de *Cattleya aurantiaca* toleraram a dessecação até 3,7% do teor de água, mas apenas 10% germinaram após 90 dias de armazenamento hermético a -18°C. Por isso, os autores sugerem testes combinando níveis de umidade, temperatura e tempo de armazenamento. Ou, no caso em que a quantidade de sementes é muito limitada, sugere-se testar diretamente a -20°C, com conteúdo de umidade de 5%. Neste caso, se todas ou a maioria das sementes sobreviver ao tratamento de dessecação pré-estocagem, mas, no entanto, muitas morrerem durante os doze meses subsequentes de armazenamento, a espécie provavelmente apresenta comportamento intermediário. Mas, se não houver perda de viabilidade durante este período, possivelmente trata-se de semente de comportamento ortodoxo.

Há também gêneros com espécies mostrando diferentes respostas das sementes em relação ao comportamento fisiológico. Um exemplo é o de algumas palmeiras que crescem em florestas relativamente úmidas, tais como *Phoenix*

roebelinii e *Syagrus schizophylla*, e apresentam sementes recalcitrantes, enquanto congêneres em ambientes secos, como *Phoenix rupicola*, *Phoenix sylvestris*, *Phoenix theophrasti*, *Syagrus botryophora*, *Syagrus flexuosa* e *Syagrus yungasensis*, têm sementes ortodoxas (Pritchard *et al.*, 2004). Dickie; Balick e Linington (1992) também observaram que sementes de espécies da família Arecaceae que apresentam comportamento ortodoxo são originárias de habitats secos, enquanto que as de comportamento recalcitrante são nativas de habitats relativamente úmidos.

Para a classificação das sementes de determinada espécie quanto ao comportamento fisiológico, os testes devem levar em conta uma série de fatores para evitar conclusões equivocadas sobre resultados de análises parciais.

A duração do tempo de armazenamento depende tanto dos objetivos como das espécies em estudo, pois a longevidade das sementes varia muito entre as espécies. Ela também pode variar entre os acessos de uma mesma espécie devido a diferenças do genótipo e da procedência. Esta, por sua vez, influencia pelo efeito cumulativo das condições ambientais durante a maturação das sementes, a colheita e a secagem das mesmas. O domínio do conhecimento sobre o comportamento fisiológico de sementes em condições de armazenamento é fundamental para a conservação da viabilidade (Hong e Ellis, 1996).

Sementes de palmeiras, em geral, não podem ser estocadas por muito tempo. Sob condições naturais, sementes de muitas espécies de arecáceas permanecem viáveis por poucas semanas. Somente mediante condições especiais de armazenamento podem ser mais longevas (Robinson, 2002).

De acordo com a classificação apresentada por De Leon (1958) (citado por Costa e Marchi, 2008), sementes de espécies de palmeiras originárias de áreas subtropicais, que apresentam estações secas e úmidas ou quentes e frias bem

definidas, e sementes que apresentam o endocarpo espesso, permanecem viáveis por maior período de tempo. Essas espécies incluem os gêneros *Acrocomia*, *Archontophoenix*, *Arecastrum*, *Arikuryroba*, *Attalea*, *Borassus*, *Brahea*, *Chamaerops*, *Coccothrinax*, *Colpothrinax*, *Copernicia*, *Dictyosperma*, *Elaeis*, *Erythea*, *Howeia*, *Hyphaene*, *Jubaea*, *Mascarena*, *Nannorhops*, *Opsiandra*, *Orbignya*, *Paurotis*, *Phoenix*, *Pseudophoenix*, *Rhapis*, *Sabal*, *Scheelea*, *Serenoa*, *Syagrus*, *Thrinax*, *Trachycarpus* e *Trithrinax*.

2.4 Propagação *in vitro*

O cultivo *in vitro* pode otimizar a produção de mudas em grande escala, pois potencializa o aproveitamento dos propágulos e viabiliza a clonagem. Além disso, o isolamento de embriões pode propiciar seu desenvolvimento de forma a acelerar a formação das mudas.

Wang *et al.* (2003) regeneraram plantas de *Areca catechu* através de organogênese em calos formados de ápices caulinares de plântulas. Para tanto, foi utilizado o meio base Murashige e Skoog (1962) (MS) com suplementação de fosfato de sódio, niacina e peptona. Como fitorreguladores foram utilizados N6-benzilaminopurina (BAP) + tidiazuron (TDZ), ambos a 0,2 mg.L⁻¹. Após três a quatro semanas em cultivo, 50 a 60% dos calos formaram, em média, 2 a 5 brotações por explante. O enraizamento destas brotações foi satisfatório no mesmo meio base suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA). O período total desde o estabelecimento até a formação das plantas completas foi de 20 semanas.

Em *Butia* spp, o cultivo *in vitro* ainda está restrito ao resgate de embriões zigóticos, o que pode contornar algumas dificuldades na formação de mudas, uma vez que o processo de germinação a partir de sementes ainda é bastante

problemático. Assim, a geração de mudas a partir de embriões zigóticos apresenta-se como vantajosa, pois permite o maior aproveitamento das sementes disponíveis e gera lotes mais homogêneos de mudas ainda que segregantes (Fior; Lattuada e Schwarz, 2008; Waldow *et al.*, 2007b; Carpenter, 1988).

Waldow *et al.* (2007a) obtiveram elevados índices de desenvolvimento de embriões zigóticos de *B. odorata in vitro* e definiram como período mais indicado para o subcultivo o 28^o dia após a inoculação.

O desenvolvimento *in vitro* de embriões de *B. odorata* foi superior quando o meio de cultivo utilizado foi o MS com 75% de sais. Além disso, nas concentrações de 50 a 75% ocorreram os menores índices de oxidação dos embriões. No entanto, a concentração de sais não influenciou no desenvolvimento das raízes e na emissão de folhas (Ribeiro *et al.*, 2011).

2.4.1 Embriogênese somática

O estabelecimento de células, tecidos ou órgãos vegetais *in vitro*, sob condições controladas, pode interromper o sistema de sinalização a que estas partes vegetais estão submetidas, sem, contudo, inviabilizá-las. Sendo expostas a uma nova condição ambiental, as células podem apresentar uma resposta morfogênica que não se expressaria *in vivo*. As condições de cultivo podem tanto permitir a continuidade de um padrão de desenvolvimento, inviabilizado na planta, quanto promover a desdiferenciação e a neomorfogênese pelas vias organogênica ou embriogênica (Dodeman; Ducreux e Kreis, 1997); Von Arnold *et al.*, 2002; Jiménez, 2001). Nesta última via, há formação de embriões a partir de células do esporófito (de variados tipos celulares do corpo vegetal) ou do gametófito (Reynolds, 1997). Dessa forma, células podem se desenvolver por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a embriões completos,

sem que ocorra a fusão de gametas (Williams e Maheswaran, 1986).

De acordo com Jiménez (2001) a desdiferenciação da célula vegetal seguida de divisões mitóticas típicas da embriogênese foi registrada pela primeira vez, independentemente, por Steward; Mapes e Mears (1958) e Reinert (1958), em cenoura.

Embriões somáticos possuem um sistema vascular fechado, sem conexão com os tecidos do explante inicial. Esta característica, aliada a sua bipolaridade, diferem dos embriões somáticos dos órgãos vegetais resultantes dos processos de organogênese (Guerra; Torres e Teixeira, 1999).

Na embriogênese somática *in vitro*, células em diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos, adquirindo nova competência morfogênica. Define-se por competência celular a capacidade de as células reagirem a sinais específicos, envolvendo a chamada epigênese, que pode ser definida como a ativação seletiva e diferencial de genes, ou reprogramação celular envolvendo células ou tecidos responsivos. Exemplo representativo da epigênese que ocorre naturalmente em plantas superiores é a transição da fase juvenil para a adulta. Para a embriogênese somática, um exemplo de células receptivas é a camada epidérmica de explantes embrionários. De acordo com algumas evidências, a iniciação de poliembriões nucelares em *Citrus* (exemplo natural de embriogênese somática) acontece em resposta a um estímulo provocado pela alta biossíntese de hormônios, principalmente auxinas, que ocorre nas fases iniciais da embriogênese zigótica (Guerra; Torres e Teixeira, 1999).

Na indução e obtenção de embriões somáticos, os explantes são submetidos a pelo menos duas condições de cultivo. Na primeira, há indução à embriogênese e a segunda à histodiferenciação e o crescimento dos embriões

formados. As condições que favorecem a primeira etapa geralmente inibem a segunda. Em geral, as auxinas, destacando-se o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), são consideradas as substâncias indutoras dos processos de desdiferenciação e rediferenciação, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes (Guerra; Torres e Teixeira, 1999). No entanto, a transição de células somáticas em embriogênicas, pode ser induzida por outros estímulos capazes de afetar a polaridade ou a posição do plano de divisão celular (Dodeman; Ducreux e Kreis, 1997).

Embriões somáticos desenvolvem-se através de estádios similares aos observados na embriogênese zigótica, principalmente a partir do estágio globular. Exceção a isso é o fato de, contrariamente aos embriões zigóticos, os somáticos não se tornarem dormentes e não apresentarem estruturas, como tegumentos, nem endosperma (Dodeman; Ducreux e Kreis, 1997).

Dentre os componentes do meio de cultivo, algumas substâncias têm sido utilizadas com bastante êxito na indução de embriões somáticos. É o caso do carvão ativado. Seu uso no meio de cultivo deve-se principalmente às propriedades de adsorção. Ele adsorve inibidores de crescimento secretados por tecidos *in vitro*, como compostos fenólicos (George e Sherrington, 1984, citados por Sáenz *et al.* 2005) e etileno (Men Suali-Sodi *et al.*, 1993, citados por Sáenz *et al.* 2005). No entanto, pode também adsorver componentes do meio requeridos para respostas morfogênicas e desenvolvimento de tecidos, como vitaminas (Weatherhead; Burdon e Henshaw, 1979) e reguladores de crescimento, como as auxinas (Ebert e Taylor, 1990; Ebert; Taylor e Blake, 1993).

Estudos realizados por Villa *et al.* (2007) mostram que o carvão ativado inibiu a multiplicação de brotações de duas frutíferas de clima temperado (*Rubus* sp e *Vitis* sp). Além disso, maior peso da matéria fresca da parte aérea das duas

frutíferas estudadas foi obtido na ausência de carvão ativado, em presença de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

De acordo com Costa *et al.* (2006) a adição de carvão ativado ao meio de cultivo MS reduziu significativamente o nível de oxidação de explantes de bananeira. Contudo, a taxa de multiplicação também decresceu, embora brotações mais altas, vigorosas e com maior número de raízes foram obtidas em meio acrescido de carvão ativado. Concentrações de até 6 mg.L⁻¹ de BAP em meio de cultura com carvão ativado não exerceram nenhuma influência sobre comprimento, taxa de multiplicação, oxidação, vigor e número de raízes em bananeira. Tais resultados foram atribuídos à possibilidade de o carvão ativado ter adsorvido reguladores de crescimento e, desta forma, reduzido, ou mesmo neutralizado sua atividade, pois na ausência de carvão, em mesmo meio base, concentrações de BAP em torno de 4mg L⁻¹ favoreceram a taxa de multiplicação.

Sáenz *et al.* (2005) obtiveram calos de plúmula de coco (*Cocos nucifera*), em dois meses e calos embriogênicos em quatro meses utilizando meio Y3 (Eeuwens, 1976) com 1 µmol de 2,4-D, sem carvão ativado, enquanto que na presença deste foram necessários 100 µmol. De acordo com esses autores, a concentração ótima de 2,4-D para produção de calos em coco pode diferir entre protocolos devido à qualidade do carvão ativado utilizado no meio de cultivo.

Em protocolos de propagação de palmeiras através da embriogênese somática, a glutamina também tem sido bastante utilizada, com benefícios comprovados em tais aplicações. Saldanha (2007) obteve embriões somáticos de *Euterpe edulis* a partir de embriões zigóticos de frutos verdes, com endosperma semi-gelatinoso. Inicialmente, os explantes foram estabelecidos em meio MS com vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 3 mg.L⁻¹ de 2-isopenteniladenina (2ip) e 0,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. Como tratamentos foram

testadas concentrações de 2,4-D (0, 30, 35, 40 mg.L⁻¹) combinadas com glicose ou sacarose (30 g.L⁻¹). Aos 90 dias, verificou-se a formação de calos compactos amarelados e com formação de antocianinas, em meio com 40 mg.L⁻¹ de 2,4-D, tanto em presença de sacarose como em glicose, sem diferença significativa. Aos 240 dias, ocorreu a formação de estruturas globulares translúcidas. Estas foram transferidas para meio MS sem carvão e com 3 mg.L⁻¹ de 2ip. Quando os embriões progrediram para o estágio bipolar, após cerca de 30 dias, foram transferidos para MS a 50% da concentração, com 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, sem fitorreguladores. Após 10 dias verificou-se que embriões somáticos maduros emitiram radícula e parte aérea. Utilizando-se da mesma metodologia, porém com explantes iniciais formados por segmentos de bainha foliar de plântulas, as melhores respostas foram alcançadas com 66,3 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,17 g.L⁻¹ de glutamina, o que confirma a importância da glutamina como fonte de nitrogênio orgânico.

Em estudos com *Elaeis guineensis* em sistema de imersão temporária, verificou-se que o esgotamento de glutamina do meio de cultivo, como fonte de N orgânico, acontecia em até cinco dias após a incubação. Embora se saiba que a glutamina seja degradada rapidamente quando diluída no meio, principalmente após o sexto dia, o que sugere a absorção de grande parte dela pelas células naquele estudo. A glutamina pode ser a fonte preferencial de N pelas células (Gorret *et al.*, 2004).

Claumann *et al.* (2007) estabeleceram embriões zigóticos de *B. eriospatha* em meio MS com vitaminas de Morel, 0,5 mg.L⁻¹ de glutamina, 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e três diferentes auxinas: dicamba, picloram e 2,4-D. Após dois meses houve formação de calos primários amarelos e compactos, de onde surgiram estruturas globulares translúcidas. Foi apontado como melhor tratamento 150

μmol de dicamba. Com 300 μmol de picloran ou dicamba, surgiram calos primários e ocorreu oxidação da maior parte dos explantes. Em meio com 2,4-D, ocorreu a oxidação da maior parte dos embriões, além de germinação anormal.

Através da indução de calos em embriões segmentados de *Cocos nucifera*, Gomes *et al.* (2004) verificaram que partes apicais e basais do eixo são mais responsivas do que as intermediárias. Utilizando 2,4-D como indutor, verificaram que as concentrações que proporcionaram melhores respostas foram entre 20 e 30 mg.L^{-1} . O tempo de formação foi de 15 a 20 dias. O meio base utilizado foi o Y3 com 50g de sacarose e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado, com vitaminas de Morel e Wetmore (1951). O material permaneceu no escuro a 25 ± 2 °C.

Utilizando embriões zigóticos de *Acrocomia aculeata* como explante inicial, Moura *et al.* (2009) obtiveram calos em meio Y3 com 68,46 g.L^{-1} de sacarose, 1 g.L^{-1} de caseína hidrolisada, e, como fitorreguladores, foram utilizados picloram ou 2,4-D. Calos embriogênicos desenvolveram-se após permanência dos explantes por 60 dias no escuro a 25 °C. Quando utilizado picloram, 47% dos explantes formaram calos embriogênicos, enquanto que com 2,4-D, 36%. Por outro lado, quando utilizado 1 μmol de TDZ combinado a estes fitorreguladores, ocorreu 61,9% de formação de calos em meio com 2,4-D e 32% com picloram. A multiplicação dos calos foi satisfatória em meio com 2,4-D ou picloram, sem citocinina, e com 3 g.L^{-1} de carvão ativado. A germinação dos embriões iniciou em 15 dias após a transferência para o mesmo meio base com 3 g.L^{-1} de carvão ativado e sem fitorregulador. Concluiu-se que o TDZ associado ao 2,4-D teve efeito positivo na indução de embriogênese somática.

Estudando a origem do desenvolvimento de embriões somáticos em *Elaeis guineensis*, Kanchanapoom e Domyoas (1999) estabeleceram embriões zigóticos maduros em meio Y3 com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D. A formação de calos foi observada

em 29% dos explantes após oito semanas. Nesta etapa os calos foram transferidos para meio MS a 50% da concentração dos macronutrientes e do ferro, com adição de 170 mg.L^{-1} de fosfato de sódio, $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de piridoxina e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. A diferenciação dos embriões ocorreu em mesmo meio acrescido de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de carvão ativado.

Lédo *et al.* (2007) obtiveram germinação de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* em meio Y3 com 60 g.L^{-1} de sacarose. Em mesmo meio base, porém com 80 g.L^{-1} de sacarose, a qualidade dos embriões formados foi inferior. A formação de plântulas ocorreu em 83% dos embriões.

Visando ao cultivo de *B. odorata* em exploração hortícola, há necessidade do desenvolvimento de protocolos que possibilitem a obtenção de mudas a partir de tecidos de plantas em fase reprodutiva, ou seja, com potencial vegetativo e produtivo conhecidos.

Verdeil *et al.* (1993) obtiveram embriões somáticos de *Cocos nucifera* utilizando tecidos de plantas matrizes adultas. Tecidos da base dos folíolos, ainda não clorofilados e segmentos de ráquila de inflorescências jovens com 15 a 40 cm de comprimento foram cultivados em meio Y3 com vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), 4% de sacarose, 0,75% de ágar e concentrações de 30 a 80 mg.L^{-1} de 2,4-D e 2 a 3 g.L^{-1} de carvão ativado. Os primeiros calos surgiram aos quatro meses. Aos nove meses, 35 a 45% dos explantes de folhas e inflorescências apresentavam calos. Durante a multiplicação dos calos e formação dos embriões observou-se grande absorção de amônio, cálcio e magnésio do meio, mensurado pela avaliação da matéria seca dos tecidos. Esta demanda nutricional específica coincide com o incremento na síntese de proteínas nas células embriogênicas. Segundo os autores, estas informações são importantes para melhor controle do efeito do meio de cultivo e da frequência das

transferências. Estes dados também mostraram que a maior proporção de proteína na matéria seca dos tecidos foi verificada próximo ao 28º dia após a inoculação. Após a formação dos embriões, os mesmos foram isolados em meio sem fitorregulador e com carvão ativado, em presença de luz. Contudo, na maioria dos casos, o enraizamento dos embriões requereu tratamento com a auxina ANA (Verdeil *et al.* (1993).

Almeida e Almeida (2006) estabeleceram primórdios foliares de pupunheiras adultas em meio MS, inicialmente sem fitorregulador. A partir do segundo mês em cultivo, os explantes foram transferidos para MS com 7,1 µmol de BAP, após períodos de quatro semanas foram transferidos para meios com mesma concentração de BAP e, posteriormente, com 12,9 µmol de ANA + 3,55 µmol de BAP. Através de cortes histológicos verificou-se que no primeiro mês havia regiões do mesofilo metabolicamente ativas e em divisão. No terceiro mês (após o segundo subcultivo) foram verificadas regiões do mesofilo com formação de complexos pró-embriários ou meristemóides. No quarto mês, verificou-se presença de embriões somáticos polarizados.

Visando à clonagem *in vitro* de *Areca catechu*, Karun *et al.* (2004) estabeleceram inicialmente explantes foliares de *seedlings* sobre meio MS com 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado. Como fitorreguladores, foram utilizadas as auxinas: picloram (100 e 200 µmol), dicamba (25 e 50 µmol) e 2,4-D (68 µmol). Após o estabelecimento *in vitro* os explantes foram transferidos para meios com gradientes decrescentes da respectiva auxina após uma, três, seis e 16 semanas, sendo que na última transferência, todos os tratamentos tinham a mesma concentração da respectiva auxina (5 µmol). A oxidação dos explantes variou conforme a variedade e o tipo de auxina, sendo as máximas concentrações as que apresentaram os maiores índices. Contudo, os autores mencionaram que

a oxidação pode ser superada com o uso de carvão ativado no meio. A concentração inicial de picloran de 200 μmol favoreceu a maior formação de calos embriogênicos. O desenvolvimento dos embriões ocorreu após o isolamento das estruturas globulares e calos embriogênicos em meio MS sem fitorregulador e com 0,2% de carvão ativado. Logo após a transferência, verificou-se a rápida proliferação dos calos e também foi promovida a conversão e a maturação dos embriões somáticos globulares em estruturas alongadas. A germinação destes embriões ocorreu em meio MS suplementado com BAP. Este fitorregulador, na concentração de 20 μmol , estimulou a germinação de 74% dos embriões, contra 59% na concentração de 30 μmol . Na ausência desta citocinina a germinação foi de apenas 3,7%. Após seis semanas, embriões germinados foram transferidos para MS líquido com metade da concentração e 5 μmol de BAP. Após seis semanas, plantas com 2 a 4 folhas e sistema radicial bem formado foram submetidas à aclimatização. Num segundo estudo, estes autores utilizaram como explantes partes de inflorescências, porém, nesta fase, somente os tratamentos com picloram foram utilizados. Da mesma forma, foram obtidos embriões somáticos. Também para esses explantes, a concentração inicial de 200 μmol dessa auxina mostrou-se superior. Além disso, o BAP novamente se mostrou importante na germinação dos embriões. Diferenças foram verificadas nas respostas quando utilizados explantes de inflorescências coletadas em diferentes estádios de desenvolvimentos. De acordo com os autores, explantes de inflorescências coletadas com tamanho entre 8 e 12 cm resultaram na maior formação de calos.

Em algumas espécies perenes, como *Hevea brasiliensis* (Michaux-Ferrière; Grout e Carron, 1992), *Vitis rupestris* (Altamura et al. 1992) e *Manihot esculenta* (Woodward e Puonti-Kaerlas, 2001), a propagação *in vitro* foi viabilizada por

indução à embriogênese a partir de peças florais. Esta é uma alternativa promissora para a propagação clonal, pois empregaria um pequeno volume de material vegetal para atender, tanto ao objetivo de preservação da variabilidade genética dos exemplares nativos ameaçados, quanto ao de produção de clones em escala comercial (Fior *et al.*, 2007). Além disso, a embriogênese induzida *in vitro* tem grande potencial para disponibilizar variabilidade para o melhoramento genético das plantas cultivadas, permitindo a indução de mutações (De La Viña; Barceló-muñoz e Pliego-alfaro, 2001; Witjaksono e Litz, 2004), o cultivo de protoplastos isolados (Liendo; Villegas e Alvarez, 1997; Witjaksono; Litz e Grosser, 1998) e a transformação genética (Cruz-Hernandez *et al.* 1998; Gomez-Lim e Litz, 2004).

Dessa forma, é possível que a indução à embriogênese somática *in vitro* seja a melhor estratégia para micropropagação de *Butia*. Contudo, até o presente, as informações encontradas na literatura dão conta que apenas calos foram obtidos nas tentativas de regeneração de plantas por meio desse evento morfogênico para as espécies deste gênero.

2.5 Desenvolvimento inicial e adubação de mudas de palmeiras

O desenvolvimento inicial das palmeiras pode ser dividido em fases. Na primeira, o crescimento inicia na emissão da primeira folha (eófilo) e se estende até a emissão de folhas pinatissectas (ou pinadas), caracterizando o estágio juvenil (Bernacci *et al.*, 2008). De acordo com o desenvolvimento, a cada estágio subsequente, há necessidades progressivamente maiores de luz (Granville, 1978, citado por Kahn, 1986).

De acordo com Meerow e Broschat (2010), na produção de mudas de palmeiras, quando a germinação acontece em recipientes coletivos, o transplante

deve ser realizado quando as plântulas estiverem com uma ou duas folhas, o que provoca menor estresse, além de evitar o excessivo crescimento das raízes no ambiente de germinação. O transplante deve ser realizado nos meses mais quentes do ano, quando o crescimento das raízes é mais acelerado. Esse procedimento pode ainda ser conduzido de duas formas: transplantes sucessivos para recipientes maiores, conforme as mudas vão crescendo; ou um transplante apenas para recipiente grande o suficiente que comporte a muda até a instalação a campo, o que reduz custo, mas pode provocar aumento na perda, principalmente se a irrigação não for manejada adequadamente, pois em um volume maior de substrato a possibilidade de perda de plantas por encharcamento é superior.

No momento do transplante das mudas, não se recomenda a poda das raízes, pois normalmente resulta em retrocesso de crescimento ou mesmo a morte de algumas delas. Portanto, se o sistema radicular supera a altura do recipiente de transplante, pode-se curvÁ-lo para cima ou em torno do perímetro do interior do recipiente. Contudo, o mais adequado é usar recipientes que comportem todo o comprimento das raízes (Meerow e Broschat, 2010). Para Kämpf (2005), em comparação com o cultivo a campo, onde as raízes dispõem de volume ilimitado para o crescimento, no cultivo em recipientes esse volume é reduzido, podendo acarretar problemas quando se utiliza recipientes com dimensões inadequadas, principalmente se a irrigação não for manejada adequadamente.

Para Arruda; Pires e Sakai (2010) a irrigação de palmeiras a campo deve ser realizada quando o potencial hídrico do solo alcançar -60KPa. Para plantas a pleno sol, em dias mais quentes, deve-se antecipar a irrigação para potenciais hídricos em torno de -50KPa.

Em cultivos em recipientes a aplicação de água deve ser feita de maneira que toda ela se infiltre no substrato, sem transbordo. A perda por drenagem, após a irrigação, não deve exceder 5 a 10% do volume aplicado sobre o substrato (Arruda; Pires e Sakai, 2010).

De acordo com Meerow e Broschat (2010) a irrigação adequada é aquela em que o substrato permaneça constantemente úmido, mas nunca saturado.

A capacidade de retenção de água de um substrato divide-se entre água facilmente disponível (volume de água liberado entre tensões negativas de 10 a 50hPa), água tamponante (volume de água liberado entre tensões negativas de 50 a 100hPa) e água remanescente (volume de água que permanece no substrato depois de aplicada a negativa de 100hPa) (De Boodt e Verdonck, 1972). Avaliações da tensão da água durante cultivos em recipientes sugerem, no entanto, que esses valores são apenas referenciais. Conforme a espécie, o substrato e a situação de cultivo, os limites são variáveis (Gruszynski, 2002).

Segundo Kramer e Boyer (1995) em 1952 os pesquisadores Richards e Wadleigh concluíram que em um potencial da água no solo entre -1,5 e -2,0 MPa muitas espécies cultivadas atingiam a chamada murcha permanente. Por esse motivo, -1,5 MPa foi definido por conveniência como o ponto de murcha permanente (PMP). Para cultivos em recipientes, no entanto, esses índices são bem inferiores. Monitorando a umidade do substrato em recipientes Testezlaf *et al.* (1999) (citado por Gruszynski, 2002) verificaram que plantas de azaléia e crisântemo apresentavam início de murcha entre as tensões de -63 a -93hPa e -88 a -337 hPa, respectivamente.

Conforme Bataglia e Furlani (2010) para produção de palmeiras em recipientes, os principais materiais utilizados como substrato são a casca de pinus e a fibra de coco, os quais podem ainda serem misturados a outros componentes,

sendo o objetivo a obtenção de uma mistura com boa capacidade de aeração e retenção de água. No entanto, conforme esses autores, esses materiais têm pouca capacidade de retenção de nutrientes, por isso é preciso que sejam repostos regularmente na forma de soluções nutritivas ou fertilizantes.

De acordo com Kämpf (2005), a densidade é um importante fator a ser considerado, pois permite interpretar algumas propriedades físicas do substrato. Por exemplo, quanto mais alta a densidade de um substrato, mais difícil o seu uso em recipiente, quer pela limitação ao crescimento das plantas, quer pela dificuldade no transporte. Segundo a autora, a densidade do substrato deve ser diretamente proporcional à altura do recipiente de cultivo. Além disso, dentre os componentes do substrato não deve ser utilizado solo, a menos que os recipientes apresentem alturas iguais ou superiores a 20 cm, ainda assim, para essa altura, a proporção de solo não deve ser superior a 10% do volume total.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado as importantes propriedades da casca de pinus destacando-a como excelente material para uso como substrato para plantas, seja pura ou em misturas (Machado Neto *et al.* 2005; Martin *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2010).

De acordo com Machado Neto *et al.* (2005) a casca de pinus, por suas características físicas e biológicas, apresenta-se como uma matéria prima adequada para utilização como substrato, quer isoladamente ou em associações, sendo que quanto menor a granulometria maior será a capacidade de retenção de água da mesma. Estes autores testaram o efeito do extrato aquoso de casca de pinus compostada em diferentes granulometrias sobre a germinação de sementes de alface, rabanete, tomate e pepino. Foi constatado que mesmo utilizando granulometrias maiores (12 e 24 mm), o que sugere menor decomposição do material, não houve efeito fitotóxico.

A recomendação de nutrientes para plantas envasadas depende principalmente: da espécie cultivada, do tamanho do recipiente, do tipo de substrato e da intensidade luminosa do ambiente de crescimento. Plantas que crescem em pleno sol, por exemplo, requerem praticamente o dobro de fertilizantes quando comparadas a plantas em sombra (Bataglia e Furlani, 2010).

Uma opção para produção de plantas perenes envasadas, ou que precisem permanecer por longo período em viveiro, pode ser o uso de fertilizantes de liberação lenta. Trata-se de fertilizantes solúveis em água agrupados em grânulos recobertos por resina orgânica. A solubilização e liberação dos sais contidos nos grânulos depende da degradação da resina, do grau de umidade e da temperatura do substrato. Entre as principais vantagens do uso destes fertilizantes estão a diminuição da mão de obra na adubação, e o baixo nível de salinidade na solução do substrato (Kämpf, 2005).

A salinidade excessiva, e consequente diminuição do potencial osmótico, junto à solução do solo/substrato, na região das raízes, provoca uma diminuição do potencial da água. Esse efeito sobre as plantas é semelhante ao provocado por um estresse por falta de água, com a diferença que em situação de excesso de salinidade pode haver água disponível, porém difícil de ser absorvida (Taiz e Zeiger, 2004).

A medição da pressão osmótica sobre as raízes das plantas requer uso de equipamentos e metodologias de aplicação complexa. Por isso, a medida mais simples e prática de expressar a concentração das soluções é através da verificação da condutividade elétrica (CE) (Ballarin, 2004).

A CE é medida por um equipamento chamado condutivímetro e é o melhor indicativo imediato do nível de adubação, mas não demonstra quais os nutrientes disponíveis. Existem vários métodos para coleta de soluções para avaliação da

CE. Uma forma bastante prática é pelo método chamado *Pour through* (ou *pour thru*) (Gruszynski, 2001; Schafer e Souza, 2005). O método consiste em coletar o lixiviado através da aplicação de determinado volume de água sobre o substrato de cada vaso, uma hora após a irrigação até saturação. Imediatamente após a coleta, faz-se a leitura dos valores de pH e CE (Cavins *et al.*, 2000).

De acordo com Cavins *et al.* (2000) para CE determinados pelo método *pour thru*, a faixa de 1 a 2,6 dS.m⁻¹ é considerada baixa para a maioria das espécies, sendo utilizada para as mais sensíveis e na fase inicial do desenvolvimento de mudas. Índices acima de 6,5 dS.m⁻¹ são considerados muito altos e podem desencadear danos devido à dificuldade na absorção de água pelas plantas, assim como crescimento reduzido. Esses sintomas podem incluir queima das bordas das folhas e murcha.

Conforme Ballarin (2004), diversos trabalhos têm demonstrado que manter o pH do substrato junto às raízes das plantas entre 5 e 6 é de fundamental importância para a estabilidade das membranas das raízes da maioria das espécies, e conseqüentemente, o bom funcionamento da absorção mineral. Kämpf (2005) considera que a faixa de pH ideal varia muito de acordo com a espécie a ser cultivada, porém, em geral, para substrato com predominância de material orgânico, a faixa mais adequada é entre 5 e 5,8. Ainda, segundo o autor, o pH pode influenciar tanto na disponibilidade de nutrientes quanto na biologia dos microrganismos do substrato.

De acordo com Broschat (2000) em palmeiras mantidas em recipientes é mais comum a deficiência de nitrogênio causada simplesmente por insuficiente reposição. É tipicamente o mais limitante elemento na produção em recipientes, enquanto que K, Mg e Mn são muito mais limitantes em situações de cultivo a campo. Deficiência de potássio também pode ocorrer com certa frequência se

formulações com concentrações baixas desse nutriente forem usadas.

A deficiência de ferro é bastante comum em palmeiras mantidas em recipientes com substrato de pouca aeração. O plantio em profundidade inadequada também pode desencadear esse sintoma, uma vez que a deficiente aeração do sistema radicular provoca a indisponibilização do ferro. Pulverizações foliares com sulfato de ferro podem corrigir o problema temporariamente, mas a correção permanente só pode ser alcançada através do replantio em profundidade correta. Por isso, para manutenção de plantas em recipientes por longo período, recomenda-se a utilização de substrato com o mínimo de subsidência, a fim de evitar a compactação e diminuição da aeração, principalmente na parte inferior do recipiente (Broschat, 2000).

A deficiência de enxofre também ocorre ocasionalmente se não for suprido na adubação. Os sintomas são praticamente idênticos aos do Fe e só pode ser diagnosticado corretamente através de análise foliar de nutrientes. Deficiência de manganês é muito menos comum em palmeiras envasadas, principalmente se o substrato estiver com pH de neutro a ácido, quando aumenta a disponibilidade desse elemento (Broschat, 2000).

Para palmeiras em recipientes a relação de $N:P_2O_5:K_2O$ deve ser de 3:1:2. Quando a temperatura do solo/substrato cair abaixo de 18°C a quantidade de fertilizante pode ser reduzida (Broschat, 2000 e Meerow e Broschat, 2010).

Contudo, inúmeros aspectos da formação de mudas e nutrição das palmeiras ainda precisam ser elucidados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e análise inicial de sementes

Frutos maduros de *B. odorata* foram coletados em fevereiro de 2008 em uma população situada na localidade de Cerro Partido, município de Encruzilhada do Sul (Coordenadas geográficas: 30°27'03"S; 52°42'39"W). A região caracteriza-se por apresentar relevo ondulado a forte ondulado, solo Argissolo com substrato granito (Streck *et al.*, 2008). A altitude média é de 420m. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Cfb (Moreno, 1961), com precipitação anual de 1500 mm. A coleta foi realizada em dez indivíduos (matrizes) com altura entre dois e cinco metros. O critério utilizado para a escolha do ponto de maturação foi estabelecido, principalmente em função da cor do epicarpo, sendo rejeitadas infrutescências que não apresentassem, pelo menos, metade dos frutos com coloração amarela. Além disso, não foram utilizadas infrutescências onde já houvesse deiscência total dos frutos.

Logo após a coleta as infrutescências foram transportadas para laboratório em sacos de polietileno opacos. Em seguida foram classificadas em três grupos, quanto à média da maturação visual dos frutos (coloração): parcialmente verdes (com predominância da cor amarelo, laranja ou avermelhado); verde ausente (amarelos, laranjas ou avermelhados) e verde ausente com parte dos frutos já abscisados (Figura 2).

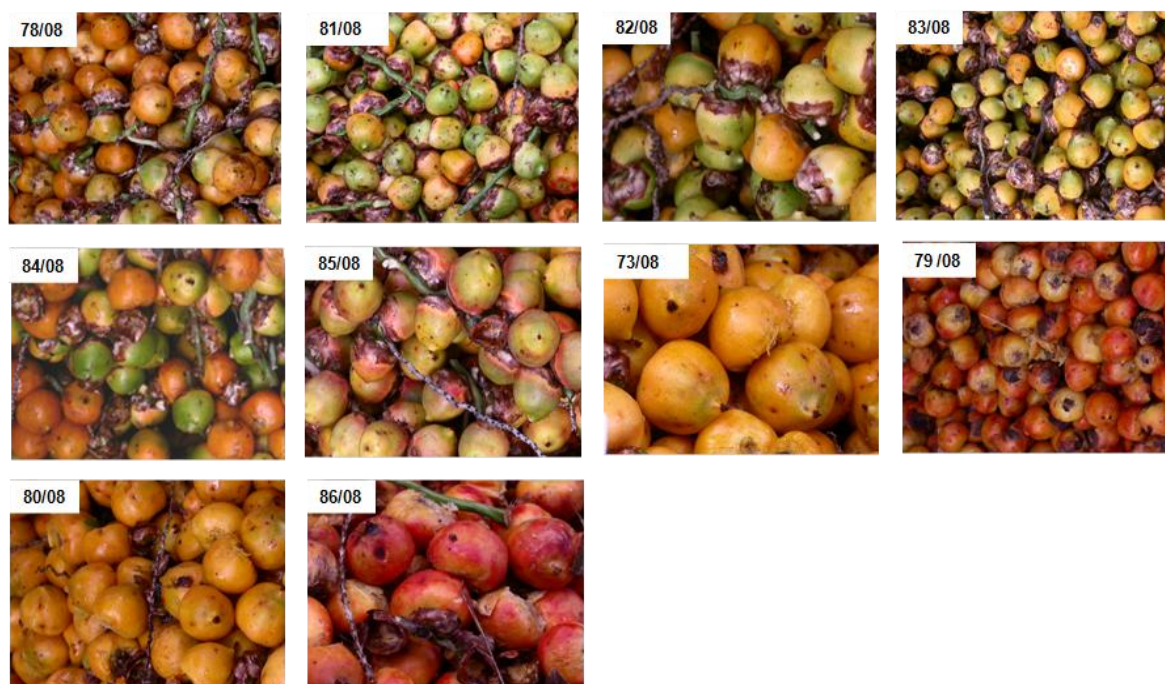


FIGURA 2. Frutos de *Butia odorata* de dez matrizes coletados em Encruzilhada do Sul em fevereiro de 2008. As numerações representam os números de campo registrados no Banco de Sementes do Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. (Classificação dos frutos quanto à coloração do epicarpo: matrizes 79, 81, 82, 83, 84 e 85/08: parcialmente verdes; 73 e 80/08: verde ausente; e 79 e 86/08: verde ausente e parte abscisados) FZB-RS, Porto Alegre, 2008.

Uma amostra de frutos tomados aleatoriamente de cada planta foi separada, despulpada manualmente com uma faca de uso doméstico, seguido de fricção em peneira metálica sob água corrente até a limpeza total dos resíduos do mesocarpo. Em seguida os diásporos foram secos com papel toalha e submetidos à determinação do teor de água através da diferença percentual da massa após secagem a 105 °C até massa constante (Brasil, 2009).

O restante dos frutos permaneceu nas ráquias em ambiente sombreado e ventilado, em caixas rasas de polietileno, até a queda natural dos mesmos. Após, os frutos foram imersos em água potável por dois dias, seguidos de despulpa através de fricção manual sobre peneira de metal (malha de 3 mm), sob água corrente. Para secagem, os diásporos foram depositados sobre papel filtro em

bancada de laboratório, sob temperatura que variou entre 24 e 30 °C e umidade relativa do ar entre 45 e 75%, onde permaneceram por oito dias. Após, os frutos de cada planta foram novamente submetido à determinação do teor de água, além da contagem e eliminação dos diásporos perfurados por insetos.

Cinco repetições de dez gramas de diásporos de cada amostra foram usados nos testes de determinação do teor de umidade. A pesagem foi realizada em uma balança de precisão com três casas decimais.

Posteriormente, a massa de mil diásporos foi determinada para cada matriz utilizando-se cinco repetições aleatórias de 40 diásporos. Em seguida as dez amostras foram agrupados em um lote homogêneo.

Os dados correspondentes às variáveis analisadas foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e ao de homocedasticidade de Levene. Quando algum destes dois requisitos não fora atendido, procedeu-se a transformação dos dados, conforme a variável, sendo então novamente submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade. No entanto, nos gráficos e tabelas apresentados os dados estão expressos em valores não transformados.

Em seguida procedeu-se a análise de variância paramétrica e comparação das médias pelo teste de Tukey (5%). As análises dos dados foram realizadas através dos *softwares* SigmaPlot e CoPlot.

3.1.1 Análise de viabilidade

A determinação de viabilidade foi realizada através da avaliação do desenvolvimento dos embriões após isolamento *in vitro*, como uma adaptação do “teste de embrião excisado” (Brasil, 2009). Para tanto, os diásporos foram abertos mediante pressão mecânica gradual em um torno de bancada e as sementes

íntegras, ou seja, sem dano mecânico ou contaminação aparente, foram isoladas e imediatamente submetidas à desinfestação com etanol 70% por 2 min, seguido de hipoclorito de sódio 1,5% de cloro ativo, com oito gotas de Tween 20 L⁻¹, por 15 min. Para a remoção dos resíduos dos agentes de desinfestação, as sementes foram enxaguadas três vezes com água deionizada autoclavada, sob fluxo de ar laminar estéril.

Com o auxílio de um estereomicroscópio (aumento de 16x), os embriões de uma amostra aleatória de sementes foram extraídos através de excisões com lâmina bisturi e imediatamente estabelecidos em meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962) com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 8 g.L⁻¹ de ágar (Agargel®). O pH do meio foi corrigido para 5,8 com KOH e/ou HCl, seguido de autoclavagem por 20 min a 121 °C. Como recipientes foram utilizados frascos de vidro com altura e diâmetro de 80 mm, contendo 30 mL de meio. Em cada frasco, foram estabelecidos doze embriões imediatamente após a retirada das sementes. Após o estabelecimento *in vitro* os embriões permaneceram sob temperatura de 25±3 °C e irradiância luminosa de 22 μmol.m⁻².s⁻¹, com fotoperíodo de 16h. Foi utilizado delineamento experimental completamente casualizado, com oito repetições, sendo uma repetição composta por um frasco com doze embriões.

As avaliações foram realizadas aos 10, 25, e 90 dias, quando foram contabilizados: embriões germinados, considerando-se, para tanto, o aumento do tamanho em, pelo menos, duas vezes o inicial; proporção de embriões com folha e radícula visíveis em relação aos embriões germinados, aos 25 dias; mensuração do comprimento da primeira folha (primeiro eófilo) e da radícula aos 25 dias; e percentual de plântulas normais aos 90 dias, considerando-se como plântula normal a presença visível de folha e raiz.

A mensuração do comprimento das estruturas foi realizada através da

parede do frasco, sem a abertura do mesmo, utilizando-se régua graduada em 0,1 cm.

Após as avaliações foram realizadas análises descritivas dos dados de cada variável, e elaborados gráficos tipo *boxplot* através do *software* CoPlot.

3.1.2 Teste de viabilidade de sementes de mesmos diásporos

Este estudo teve como principal objetivo testar a hipótese de que não há favorecimento de alguma semente em detrimento a outra (s), entre as três desenvolvidas em um mesmo diásporo, e que todas têm a mesma condição fisiológica de desenvolver uma planta normal.

Do material processado, conforme descrito no item 3.1, foi selecionada uma amostra de diásporos com três sementes cada. Estas foram isoladas e mantidas identificadas quanto a cada diásporo de origem. Em seguida procedeu-se a desinfestação, isolamento dos embriões e incubação em meio de cultivo, seguindo o procedimento descrito no item 3.1.1. Foram utilizados cinco frascos, com embriões de quatro diásporos em cada, posicionados e identificados de acordo com a origem, de forma a permitir o acompanhamento durante as avaliações e a comparação entre embriões de cada diásporo (Figura 3).

As avaliações foram realizadas aos 10, 25, e 90 dias, seguindo o mesmo procedimento descrito para o teste de viabilidade inicial.

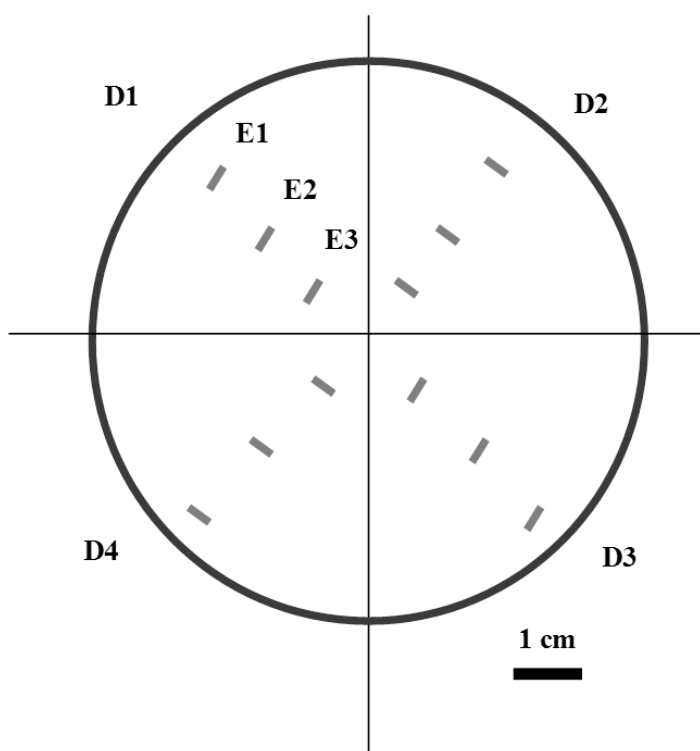


FIGURA 3. Ilustração da disposição dos embriões de *Butia odorata* em um frasco com meio de cultivo, a fim de testar a viabilidade de embriões de mesmos diásporos (D1, D2, D3 e D4: identificação dos embriões de quatro diásporos utilizados em cada frasco; E1, E2 e E3: identificação dos três embriões de cada diásporo). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Neste experimento não foi possível a realização da análise de variância (ANOVA), uma vez que não havia como diferenciar cada um dos três embriões de cada diásporo, de forma a categorizá-los como grupos. Neste caso, optou-se então por estimar uma possível variação de viabilidade através da comparação do desvio padrão médio entre os diásporos, em relação ao desvio padrão geral, em cada variável analisada. Optou-se por não considerar a variação significativa se a média dos desvios padrões de cada diásporo fosse igual ou inferior à média dos desvios padrões da variável testada. Além disso, foi realizada uma segunda análise, na qual foi estimada a similaridade de resposta no desenvolvimento dos embriões, pelo índice de Jaccard, considerando cada embrião como um indivíduo

a parte. As variáveis respostas foram: o desenvolvimento dos embriões aos 10, 25 e 45 dias; a presença e o tamanho da radícula e primeira folha aos 25 e 45 dias, além da formação de plântula completa aos 90 dias. As análises foram realizadas através dos *softwares* CoPlot e Past.

3.1.3 Análise de longevidade de sementes de diásporos armazenados em diferentes ambientes.

A fim de identificar uma condição de armazenamento de diásporos mais favorável à preservação da viabilidade das sementes, os diásporos das dez matrizes, depois de homogeneizados, foram separados em três amostras idênticas e armazenados nos seguintes ambientes:

- a. Câmara seca (CS): temperatura de 17 ± 2 °C e umidade relativa do ar de $45\pm 3\%$. Os diásporos foram acondicionados inteiros em sacos de papel semi-kraft fechado e depositados sobre prateleira metálica, na ausência de luz;
- b. Câmara-fria (CF): temperatura de 5 ± 2 °C e umidade relativa do ar de $80\pm 5\%$. Os diásporos foram acondicionados inteiros em sacos de polietileno com fecho hermético, sobre prateleira metálica, na ausência da luz;
- c. Ambiente de laboratório (AMB): sem controle de temperatura e umidade relativa do ar. Os diásporos foram acondicionados inteiros em sacos de papel semi-kraft e depositados sobre prateleira metálica, na ausência de luz.

A cada 90 dias, amostras de diásporos de cada ambiente foram submetidas a teste de teor de água e viabilidade, em condições e delineamento idênticos ao descrito no item 3.1.1.

Para análise estatística, todos os dados de cada variável analisada foram submetidos a teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade

de Levene. Quando necessários, os dados foram transformados de acordo com cada variável e novamente submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade. Nos casos em que, mesmo com as transformações, os dados não tenham se adequados a uma das duas condições, decidiu-se pela análise de variância não paramétrica. Quando a análise apontou variância significativa entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ou através de análise de regressão. Além disso, foi realizada uma análise de correlação entre a umidade dos diásporos no ponto de coleta e a massa de 1000 diásporos aos oito dias após serem despulpados. As análises foram realizadas através dos softwares CoPlot e SigmaPlot.

3.2 Superação de dormência em sementes de *Butia odorata* e *B. capitata*

Foram utilizados diásporos de cinco procedências (acessos), sendo quatro do Rio Grande do Sul e um de Minas Gerais (Tabela 2).

Frutos maduros foram coletados e imediatamente despulpados manualmente sobre peneira metálica (malha de 5 mm), sob água corrente. Em seguida os diásporos foram secos à sombra, em local arejado, por 48h. Após, foram acondicionados em embalagem de papel semi-craft com a borda dobrada e grampeada. Durante o armazenamento, os diásporos dos acessos SM, SV, CH e MG permaneceram sob condições ambientais de laboratório por até 30 dias. Já o acesso ES, permaneceu em câmara seca com temperatura e umidade relativa do ar constantes em 17 °C e 45%, por um ano.

TABELA 2. Informações sobre os acessos utilizados para os experimentos com superação de dormência de sementes de *Butia odorata* (ES, SM, SV, CH e IB) e *Butia capitata* (MG). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Acesso	Local de coleta	Número de matrizes coletadas	Teor de água dos diásporos no momento da semeadura (%)
ES	Encruzilhada do Sul, RS	10	8,9
SM	Santa Maria, RS	01	10,8
SV	Sta. Vitória do Palmar, RS	05	13,9
CH	Chuí, RS	05	14,4
MG	Lontra, MG	05	10,4

Quando utilizadas sementes isoladas (Figura 4), a separação das mesmas foi viabilizada após quebra do endocarpo através de pressão mecânica gradual em torno de bancada, de forma a romper o endocarpo mantendo as sementes íntegras. No momento da semeadura, procedeu-se a desinfestação dos diásporos ou das sementes isoladas por meio de imersão por 1 minuto em etanol 70%, seguida de 20 minutos em hipoclorito de sódio a 2% de i.a., seguido de tríplice lavagem por 15 segundos em água destilada esterilizada.



FIGURA 4. Aspectos morfológicos de diásporos e sementes de butiazeiro. **A:** Frutos e diásporos; **B:** Diásporos; **C:** Quebra do endocarpo em torno de bancada para extração das sementes; **D:** sementes removidas dos endocarpos (**end**=endocarpo, **se**= semente); **E:** sementes de quatro acessos (**op**= opérculo da semente); **F:** corte longitudinal de uma semente (**en**= endosperma, **ce**= cavidade embrionária, **em**= embrião, **or**= cavidade embrionária com opérculo removido). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

3.2.1 Germinação de sementes *in vitro*.

Sementes dos acessos ES e MG foram submetidas a três tratamentos de escarificação: sementes íntegras, sem escarificação (SE); sementes com corte no opérculo da cavidade embrionária, de forma a exibir parte do botão germinativo por uma abertura parcial (AP); e sementes com abertura total da cavidade embrionária de maneira a eliminar qualquer barreira mecânica ao desenvolvimento do embrião (AT). Após este procedimento, em ambiente de câmara de fluxo de ar laminar estéril, as sementes foram estabelecidas sobre meio de cultivo Murashige e Skoog (1962), 3% de sacarose (Reagen®), pH 5,8, gelificado com 0,8% de ágar (Agargel®), em frascos de volume 200 mL, contendo 30 mL de meio. Em seguida o material permaneceu em sala climatizada, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados: dois blocos (acessos) x três tratamentos, com quatro subamostras de dez sementes. Cada frasco foi considerado uma repetição. As avaliações ocorreram a cada três ou quatro dias, até o 90^o dia.

3.2.2 Germinação *in vivo* de sementes escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária.

Este experimento teve como objetivo testar o efeito da escarificação pela abertura total da cavidade embrionária das sementes sobre a germinação e formação de plântulas em ambiente *in vivo*. Os acessos utilizados para o teste foram SM, SV, CH e ES. Como unidades experimentais, foram utilizadas caixas de polietileno, tipo gerbox, preenchidas com 150 mL de areia média esterilizada, pré-umedecida com água destilada a 60% da capacidade de retenção de água da areia, previamente definida, conforme Brasil (2009). Em cada caixa, foram

estabelecidas 25 sementes sobre a areia, e avaliadas a cada três ou quatro dias. O ambiente utilizado foi um germinador tipo *mangelsdorf* com temperatura constante de 25°C, e intensidade luminosa de 2,8 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

As avaliações ocorreram a cada três ou quatro dias, até o 90^o dia, sendo considerados em cada avaliação o número de sementes germinadas, tendo como critério a protrusão de pelo menos 2 mm do pecíolo cotiledonar, além do número de plântulas normais. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro subamostras de 25 sementes por tratamento. Os dados correspondentes às variáveis analisadas foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e ao de homocedasticidade de Levene. Quando algum destes dois requisitos não fora atendido, efetuou-se a transformação dos dados, conforme a variável, sendo então novamente submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade. Em seguida procedeu-se análise de variância a nível de 5% de probabilidade de erro. Quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste DMS (Diferença mínima significativa ou *LSD - Fisher's Least Significant Difference Test*) a 5%.

3.2.3 Germinação *in vitro* de sementes escarificadas e embriões isolados.

Foi realizado um estudo com o objetivo de comparar os testes de viabilidade: isolamento de embrião *in vitro* e semeadura *in vitro* de sementes escarificadas pelo método da abertura total da cavidade embrionária.

Frutos maduros de *B. odorata* coletados no município de Ibirubá, RS (coordenadas geográficas: 28°48'24,6"S; 52°46'50,5"W) foram despulpadas manualmente, lavadas em água corrente e secos à sombra em temperatura ambiente (~25 °C) sobre papel filtro por dez dias em bancada de laboratório. Em

seguida foram acondicionados em embalagem de polietileno semipermeável e mantidos em ambiente de laboratório por 120 dias.

Após, determinou-se o teor de água dos diásporos, conforme descrito no item 3.1, com três repetições de 10 gramas de diásporos ou de sementes.

As sementes utilizadas no experimento foram isoladas do endocarpo através de pressão mecânica gradual em torno de bancada, desinfestada através da imersão em etanol 70% por 2min, seguido de hipoclorito de sódio 1,5% de cloro ativo, com oito gotas de Tween 20 L⁻¹, por 15min. Para a remoção dos resíduos dos agentes de desinfestação, as sementes foram enxaguadas três vezes com água deionizada autoclavada, sob fluxo de ar laminar estéril.

Para o tratamento com sementes escarificadas, procedeu-se a retirada do opérculo da semente com lâmina de bisturi, deixando exposto o botão germinativo do embrião, com a cavidade embrionária completamente aberta. Para o tratamento com embriões isolados, após o corte acima descrito, o embrião de cada semente foi removido, sendo eliminados aqueles que apresentaram sinais de lesão por manipulação. O estabelecimento *in vitro* foi realizado logo em seguida, utilizando-se sete repetições de oito sementes ou embriões cada. O meio de cultivo utilizado foi Murashige e Skoog (1962), com 3% de sacarose (Reagen®) e 0,8% de agar (Agargel®), pH 5,8, em frascos com capacidade para 200 mL, contendo 30 mL de meio cada, sendo considerado cada frasco uma repetição.

As avaliações da viabilidade foram realizadas aos 13, 23, 63, 90 e 120 dias após a semeadura e estabelecimento *in vitro*. Foram computados em cada avaliação: a germinação, utilizando-se como critério a protrusão do botão germinativo a, pelo menos, 2 mm externos à semente, ou o desenvolvimento do embrião, quando isolado da semente, em pelo menos duas vezes seu

comprimento; a formação de planta completa: quando visíveis a primeira folha e a radícula.

Os dados foram submetidos a teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade de Levene, seguidos de análise de variância a 5% de probabilidade de erro, através do *software* SigmaPlot.

3.2.4 Efeito de procedimentos de superação de dormência na emergência de plântulas em casa de vegetação.

Diásporos íntegros e sementes isoladas do acesso SM foram submetidos a quatro tratamentos de superação de dormência: **Sementes:** SE e AT, previamente descritos no item 3.2.1; **Diásporos:** D-18h – Imersão por 18h em água destilada, à temperatura ambiente entre 23 e 27°C; e D-40°C – Tratamento de pré-semeadura por três semanas, entre areia úmida, em caixas gerbox, sob temperatura constante de 40°C, em germinador tipo *mangelsdorf*, na ausência de luz. Logo após cada procedimento, sementes e diásporos foram estabelecidos em bandejas de polietileno preto, preenchidas com uma camada de 6 cm de substrato composto por duas partes de fibra de mesocarpo de coco (pó-de-coco) e uma parte de areia média lavada (proporções volumétricas). O material foi mantido por 17 meses sobre bancada de concreto de uma casa de vegetação coberta por telha de fibra de vidro, sombreada internamente por tela de polietileno preta, com total de redução da intensidade luminosa de 75%, verificada através de um luxímetro analógico.

Para equalizar as mensurações, utilizando-se a totalidade das sementes estabelecidas nos tratamentos, e não apenas o número de diásporos, quatro subamostras aleatórias de 40 caroços foram abertos sendo quantificado o número médio de sementes íntegras em cada um. Este valor médio serviu como base

para o cálculo do percentual de emergência na avaliação dos tratamentos com diásporos.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro subamostras de 25 sementes ou diásporos por tratamento.

Ao final das avaliações, em cada experimento foram calculados: percentual de emergência (%E), de plântulas formadas (%PI), tempo médio de emergência (TME), determinado segundo Silva e Nakagawa (1995), índice de velocidade de emergência (IVE) e formação de plântulas (IVP), através da fórmula proposta por Silva e Nakagawa (1995) modificada conforme sugestão de Santana e Ranal (2004), com base na soma do número de sementes germinadas, plântulas emergidas ou plântulas formadas em cada avaliação, dividido pelo respectivo tempo, dividindo-se o resultado final pelo número total de sementes germinadas, plântulas emergidas ou plântulas formadas em cada repetição.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e ao de homocedasticidade de Levene. Quando algum destes dois requisitos não fora atendido, efetuou-se a transformação dos dados, conforme a variável, sendo então novamente submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade. Em seguida procedeu-se a análise de variância paramétrica e comparação das médias pelo teste de DMS (5%). As análises dos dados foram realizadas através dos *softwares* SigmaPlot e CoPlot.

3.2.5 Temperatura e germinação associadas à superação de dormência pela abertura da cavidade embrionária

Este experimento teve por objetivo testar o efeito de dois regimes térmicos na germinação de sementes de *B. odorata* escarificadas através da abertura total da cavidade embrionária (AT). Para tanto, foram utilizadas sementes coletadas

em Santa Maria (acesso SM), previamente isoladas dos endocarpos, conforme descrito no item 3.1.

Os regimes térmicos foram 25°C constantes e 20-30°C alternados, (16-8h, respectivamente), em germinadores tipo *mangelsdorf*, com iluminação constante (2,8 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Como unidades experimentais foram utilizadas caixas de polietileno, tipo gerbox, preenchidas com 150 mL de areia média esterilizada, pré-umedecida com água destilada a 60% da capacidade de retenção de água. Em cada caixa foram estabelecidas 25 sementes, sobre a areia.

As avaliações ocorreram a cada três ou quatro dias, até o 90^o dia, sendo considerados em cada avaliação o número de sementes germinadas, tendo como critério a protrusão de pelo menos 2 mm do pecíolo cotiledonar, além do número de plântulas normais.

O delineamento utilizado foi completamente casualizado, com esquema experimental: dois tratamentos com quatro repetições, no total de 200 sementes.

3.3 Classificação das sementes de *Butia odorata* quanto ao comportamento fisiológico

Foi realizado o presente estudo com objetivo de identificar o comportamento fisiológico das sementes de *B. odorata*, para possível classificação.

3.3.1 Análise de viabilidade após dessecação e conservação em temperatura sub-zero

Sementes de frutos maduros coletados de uma matriz localizada no município de Ibirubá, RS, foram despulpadas manualmente sob água corrente. Os diásporos foram secos à sombra em temperatura ambiente (~25 °C) sobre papel

filtro por 24 horas. Uma amostra foi submetida à determinação do teor de água dos diásporos inteiros e das sementes isoladas. O método utilizado foi o mesmo descrito no item 3.1, utilizando-se três repetições de 10 gramas de diásporos ou de sementes. O restante dos diásporos foi mantido por dez dias sobre bancada de laboratório em embalagem aberta e novamente submetidos à determinação do teor de água. Posteriormente, os diásporos foram armazenados em embalagem de polietileno semipermeável, em ambiente de laboratório. Após cinco meses foi realizado novo teste de teor de água, e posterior separação dos diásporos em três subamostras, sendo cada uma submetida aos seguintes tratamentos:

1- Controle: teste de viabilidade através do método de semeadura *in vitro* de sementes escarificadas pela abertura total da cavidade embrionária, sendo utilizado meio de cultivo e condições ambientais idênticas ao teste do item 3.1.1;

2- Dessecação: secagem dos diásporos inteiros em uma estufa elétrica com circulação de ar forçada, sob temperatura constante de 30 °C por 24 horas. Ao final deste período foi realizado novo teste de determinação de umidade, além de teste de viabilidade seguindo metodologia descrita para o tratamento controle;

3 - Armazenamento por quatro meses em temperatura negativa, sendo a amostra de diásporos embalada em saco de polietileno semipermeável e armazenada por 60 dias sob temperatura constante de -20 °C, seguido de mais 60 dias sob temperatura de -6 °C. Posteriormente foi realizado teste de determinação do teor de umidade e de viabilidade seguindo metodologia dos tratamentos 1 e 2.

As avaliações da viabilidade foram realizadas aos 13, 23, 63, 90 e 120 dias após o estabelecimento *in vitro*. Foram computados em cada avaliação: a germinação, utilizando-se como critério a protrusão do botão germinativo a, pelo menos, 2 mm externos à semente; e a formação de planta completa: quando

visíveis a primeira folha e a radícula.

O delineamento foi completamente casualizado com quatro repetições de dez sementes. Os dados foram submetidos a teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade de Levene. Posteriormente foram submetidos à análise de variância (5%), complementada com teste de comparação de médias DMS.

3.4 Enraizamento *in vitro* de plântulas de *B. odorata*

Foram conduzidos três experimentos a fim de identificar condições favoráveis para o enraizamento *in vitro* de plântulas de *B. odorata*.

Mudas obtidas através do desenvolvimento de embriões zigóticos *in vitro* foram usadas como explantes. Os embriões foram extraídos de sementes do acesso ES. Durante a fase inicial *in vitro*, os embriões permaneceram em meio de cultivo Murashige e Skoog (1962) (MS), com 3% de sacarose, 0,8% de agar, pH 5,8, por períodos entre 90 e 360 dias, com transferência para meio fresco a cada 90 dias.

Como meio base para os três experimentos foi utilizado o meio de cultivo MS com 70% da concentração do nitrato de amônio e do nitrato de potássio, sacarose (Reagen®), 0,8% de agar (Agargel®), pH 5,8, seguido de autoclavagem por 15 min a 121 °C.

Como recipientes de cultivo foram utilizados frascos *snap cap* de 200 mL, com 33 mL de meio por frasco.

Durante a instalação do experimento as plântulas foram retiradas do meio onde se encontravam e homogeneizadas quanto ao comprimento da raiz emitida durante a germinação. Este procedimento foi realizado mediante o corte com

lâmina de bisturi a 5 mm abaixo da altura do colo. Em seguida as plântulas foram estabelecidas nos respectivos tratamentos, ficando imersas no meio de cultivo até cerca de 5 mm acima da altura do colo. Os frascos foram levados para sala climatizada, com temperatura de 25 ± 3 °C, com fotoperíodo de 16h com irradiância luminosa de $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

As avaliações foram realizadas aos 70 dias após o estabelecimento, quando foram contabilizadas as variáveis correspondentes ao desenvolvimento e enraizamento, emissão e crescimento de folhas e massa média das plântulas de cada frasco.

Os dados de cada variável foram analisados quanto à distribuição normal (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e igualdade das variâncias (Teste de Levene) e transformados quando necessário, conforme cada caso. Em seguida procedeu-se a análise de variância paramétrica ou não paramétrica. Quando a variância foi significativa, procedeu-se a análise de comparação de médias pelo teste de DMS e regressão polinomial das variáveis em relação à concentração de ANA ou de sacarose meio de cultivo.

3.4.1 Concentrações de ANA no meio de cultivo

Os tratamentos consistiram de concentrações da auxina ácido naftalenoacético (ANA) acrescentado ao meio base antes da correção do pH: Tratamento **1**: Controle (sem fitorregulador); **2**: $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$; **3**: $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$; **4**: $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$; e **5**: $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. A concentração de sacarose utilizada foi de 2%.

Para cada parcela foram utilizados cinco frascos com cinco plântulas cada (total de 500 plantas). O delineamento experimental foi completamente casualizado em esquema fatorial, considerando-se como fator A a concentração de ANA e o fator B o tempo decorrido entre a germinação até a instalação do

experimento (idade das plântulas em dias) B1: plântulas com 370 dias, B2: plântulas com 280 dias, B3: plântulas com 190 dias e B4: plântulas com 100 dias.

3.4.2 Concentrações de sacarose no meio de cultivo

Testou-se a resposta de enraizamento e desenvolvimento das plantas em relação a variações na concentração de sacarose no meio de cultivo. Ao meio base foi acrescentado $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. As concentrações de sacarose testadas foram 1,5; 3 e 4,5%.

Todas as plântulas utilizadas foram originadas por desenvolvimento de embriões *in vitro*, com 190 dias desde a germinação.

O delineamento experimental foi completamente casualizado com nove frascos de cinco plantas por parcela (total de 135 plantas).

3.4.3 Ajuste da concentração de ANA

Um terceiro experimento foi realizado a fim de ajustar a concentração de ANA, tomando por base os resultados do primeiro e do segundo experimento.

Ao meio base foram acrescentados 4,5% de sacarose e três concentrações de ANA: 0,3; 0,6 e $0,9 \text{ mg.L}^{-1}$, constituindo os três tratamentos.

O delineamento foi em blocos casualizados, tomando como fator de bloqueamento a idade das plântulas, desde a germinação dos embriões:

Bloco 1: Plântulas com 280 dias;

Bloco 2: Plântulas com 190 dias;

Bloco 3: Plântulas com 100 dias;

Foram utilizados cinco frascos com cinco plântulas por parcela (total de 150 plântulas).

3.5 Testes preliminares visando à embriogênese somática em *Butia odorata*

Esse estudo teve por objetivo avaliar a resposta de explantes de *B. odorata* à indução à embriogênese somática.

3.5.1 Calogênese em embriões zigóticos

Foram executados experimentos com embriões de frutos maduros (início da queda natural) de *B. odorata*, coletados em Novo Hamburgo (Teste I) e Porto Alegre, RS (Teste II). Após a coleta, os frutos foram imediatamente despulpados, lavados, secos à sombra, e suas sementes foram isoladas dos endocarpos, conforme descrito no item 3.1. Em seguida foram desinfestadas em etanol 70% por 1 min e NaOCl 1% i.a. por 10 min e enxaguadas três vezes com água deionizada autoclavada sob fluxo de ar laminar estéril. Com o auxílio de pinça e bisturi, procedeu-se a retirada dos embriões das sementes sob um estereomicroscópio (aumento de até 32x) e imediato estabelecimento dos mesmos sobre meio de cultivo em câmara de fluxo de ar laminar estéril. Foram testados os seguintes tratamentos: Teste I - meio Murashige e Skoog (1962) (MS) + 2 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) + 10, 20, 40 e 80 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D); Teste II - MS + 2 g.L⁻¹ de carvão ativado + 0; 10; 50; 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Em todos os tratamentos o meio de cultivo recebeu 3% de sacarose (Reagen®), 8 g.L⁻¹ de ágar (Agargel®), e o pH foi corrigido para 5,8, antes da autoclavagem. Como recipientes foram utilizados tubos de ensaio (25 x150 mm) com 8 mL de meio. O delineamento foi completamente casualizado com três repetições de seis tubos, um embrião por tubo. Aos 15 e 40 dias após a instalação procedeu-se a avaliação dos percentuais: de contaminados, de desenvolvidos, de explantes com calo, além do diâmetro dos calos, determinado com auxílio de um paquímetro, sendo a verificação realizada sem a retirada dos

calos dos frascos. Após confirmação de distribuição normal dos dados (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Levene), os dados foram submetidos à análise de variância paramétrica a 5% de probabilidade de erro. Quando a variância apresentou significância estatística, procedeu-se a análise de regressão.

3.5.2 Tecidos da inflorescência como explantes iniciais para embriogênese somática

Para este estudo foi coletada uma inflorescência de um exemplar de *B. odorata* do parque do Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, no mês de novembro de 2010. No momento da coleta a espata encontrava-se fechada e media 50 cm desde a inserção na estipe até o ápice.

Em laboratório a espata foi aberta, e posteriormente procedeu-se a separação de algumas ráquulas da ráquis antes da desinfestação. Esta foi realizada através da imersão em álcool 70% por um minuto, seguida de hipoclorito de sódio a 1,5% de cloro ativo, por 15 min. Para a remoção dos resíduos dos desinfestantes realizou-se um triplo enxágue com água deionizada autoclavada, em câmara de fluxo de ar laminar estéril.

Foram utilizados explantes de duas regiões da inflorescência: da parte intermediária da ráquis, os quais consistiram de fatias com diâmetro aproximado de 0,8 cm, e 1 a 2 mm de espessura; das ráquulas foram retirados segmentos com 3 mm de comprimento, da região de inserção do pedicelo. Além destes, utilizaram-se também explantes oriundos de flores, como pétalas e sépalas.

Como meio de cultivo base foi utilizado o Y3 (Eeuwens, 1976) com vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), suplementado com 0,8 g.L⁻¹ de glutamina, 2 mg.L⁻¹ de BAP, 2 g.L⁻¹ de carvão ativado e 3% de sacarose. A esse,

foram acrescentadas concentrações de 2,4-D, às quais compuseram tratamentos com 0, 10, 20 e 40 mg.L⁻¹.

Como recipientes, foram utilizados tubos de ensaio de 25x150 mm, com 10 mL e um explante cada.

O delineamento foi em blocos casualizados, tendo como fator de bloqueamento a origem do explante (ráquis, ráquila, sépala e pétala). Foram utilizadas 15 repetições por parcela, totalizando 240 unidades experimentais.

Após a inoculação, todo o material permaneceu em ausência de luz, sob temperatura constante de 25±2 °C. Depois de quatro e oito semanas procedeu-se as avaliações, sendo computados o número de explantes contaminados, oxidados.

3.6 Desenvolvimento inicial de mudas de *Butia odorata*

Foi desenvolvido um experimento a fim de otimizar o desenvolvimento de mudas de *B. odorata*, como etapa seguinte à germinação. As sementes que deram origem às mudas foram coletadas de dez matrizes de uma população localizada no município de Encruzilhada do Sul, RS. Plântulas germinadas em areia e desenvolvidas em casa de vegetação por cerca de 60 dias foram utilizadas, inicialmente para uma etapa onde foram testadas densidades de substrato, através da combinação de dois componentes de origem orgânica, e uma seguinte etapa, testou-se uma possível alteração no desenvolvimento de mudas em função de níveis de pH, nas mesmas combinações de substratos.

O substrato utilizado consistiu de combinações de proporções volumétricas dos componentes casca de arroz carbonizada (CAC) e casca de pinus composta estabilizada (CPC), conforme apresentado na Tabela 3. A casca de arroz carbonizada foi preparada na Estação Experimental Agronômica da Faculdade de

Agronomia da UFRGS. Após carbonizada, no próprio local a casca foi embalada em sacos de ráfia, onde permaneceu até a utilização no experimento. A casca de pinus é um produto comercial da empresa Vida, chamado Substrato Casca de Pinus TB®. Após a aquisição, o produto foi armazenado sob lona plástica em local sombreado por três meses até a utilização no experimento.

O experimento ocorreu nos meses de novembro de 2009 a julho de 2010, em ambiente de casa de vegetação, sem controle automático de temperatura.

TABELA 3. Composição dos substratos utilizados no experimento com desenvolvimento inicial de mudas de *Butia odorata*. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2010.

Tratamento	Composição*
1	Casca de arroz carbonizada (CAC)
2	CAC + Casca de pinus compostada (CPC) (2:1)
3	CAC + CPC (1:1)
4	CAC + CPC (1:2)
5	CPC

* Proporções volumétricas.

Antes da mistura, a CPC foi peneirada em malha de 5 mm, desprezando-se as partículas que não passaram pela peneira. Em todos os tratamentos foi acrescentado fertilizante de liberação lenta Osmocote® (NPK 19-6-10, sem micronutrientes) tempo de liberação de três a quatro meses, conforme informações do fabricante, na dosagem de três gramas por litro de substrato. O fertilizante foi incorporado antes do preenchimento dos recipientes de cultivo, os quais constituíram-se de sacos de polietileno preto (1150 mL) perfurados nas laterais e na base, completamente preenchidos com substrato. Em cada recipiente foi estabelecida uma muda.

Antes da mistura do fertilizante, separou-se uma amostra de cada

tratamento para análise em laboratório de análise de substrato, onde foram priorizadas as características físicas das misturas, e uma amostra do CPC para análise em laboratório de solos, visando determinar as características químicas.

Como uma primeira etapa do experimento, utilizou-se delineamento em blocos casualizados, considerando como fator de bloqueamento a altura e o número de folhas das mudas no momento da instalação do experimento:

Bloco 1: Altura média de 14,8 cm e número médio de folhas de 1,11;

Bloco 2: Altura média de 24,3 cm e número médio de folhas de 1,68;

O diâmetro médio do caule (à altura do colo) das mudas foi de 0,5 cm. Foram estabelecidas 15 plantas por parcela. Logo após o estabelecimento, as mudas foram irrigadas e depositadas sobre grade de polietileno rígido, sobre bancada de concreto em ambiente de casa de vegetação coberta por telha transparente de fibra de vidro, com tela de sombreamento interna, totalizando 70% de interceptação luminosa.

A irrigação foi realizada diariamente, em quantidade próxima à capacidade de vaso do substrato. Eventualmente percebe-se drenagem de 10 a 20% do conteúdo de cada irrigação.

Aos 90 dias procedeu-se a leitura da CE e do pH do substrato de cinco recipientes de cada parcela, tomadas aleatoriamente. O método utilizado foi o *pour thru* (Cavins, 2000; Schafer e Souza, 2005), com base na leitura direta de pH e CE do lixiviado dos recipientes após uma hora da saturação com água de irrigação (Tabela 4). Em seguida foram avaliados: a altura das plantas, verificada com régua milimetrada, considerando-se a medida desde a altura do colo até a ponta da maior folha; o número de folhas por planta; e o diâmetro do caule (altura do colo) de cada planta, através de um paquímetro.

Após a avaliação, foram selecionadas 64 plantas (16 de cada tratamento)

que compunham o bloco I e submetidas a uma segunda etapa, onde as plantas foram distribuídas igualmente em quatro bandejas de polietileno. Em cada bandeja foi mantida uma lâmina de água de dois a três centímetros de altura, onde foram adicionadas quantidades de hidróxido de sódio a 0,66M (NaOH) suficientes para que o pH da solução, em equilíbrio com o substrato, alcançasse os níveis 4; 4,9; 5,7 e 6,9; um nível em cada bandeja, com monitoramento diário do pH da água de cada bandeja com as plantas. As bandejas foram estabelecidas sobre piso com brita média, em casa de vegetação coberta por fibra de vidro transparente, com 50% da interceptação da intensidade luminosa (calculada a partir de medições com luxímetro analógico feitas em diferentes horários do dia) . Este procedimento teve como objetivo isolar o efeito do pH e fertilidade nos diferentes tratamentos com substrato.

A determinação da quantidade da base para cada nível de pH foi realizada através da titulação com NaOH, de uma amostra de proporções médias dos substratos (uma parte de cada combinação dos cinco tratamentos), a partir da qual calculou-se os volumes necessários de NaOH, para cada índice de pH pretendido. Assim, chegou-se às quantidades: 0 mL de NaOH por litro de substrato para **pH 4**; 2,5 mL.L⁻¹ para **pH 4,7**; 6,5 mL.L⁻¹ para **pH 5,8**; e 10,5 mL.L⁻¹ para **pH 6,7**.

As plantas foram mantidas desta forma por oito dias, sendo então retiradas das bandejas e mantidas na mesma ordem sobre piso com brita média. A partir desta etapa as plantas foram adubadas por cobertura com solução nutritiva composta por cloreto de potássio, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, fosfato monoamônio (MAP) e ureia, em quantidades para a seguinte proporção de nutrientes: N: 10,5; P₂O₅: 6; K₂O:10,7; S: 4,6; Ca: 3,8; e Mg: 3,2 (adaptado de Broschat, 2000). A concentração total de sais por litro de solução foi de 2 g

(Tabela 4), sendo aplicados 100 mL de solução por planta. As aplicações foram realizadas semanalmente durante os meses de outono e a cada 21 dias nos meses de inverno. A cada duas aplicações da solução nutritiva mencionada, foram acrescentados os micronutrientes do meio de cultivo Murashige e Skoog (1962), considerando-se 100 mL da formulação por planta.

A solução nutritiva aplicada às plantas de cada um dos quatro níveis de pH, foram também corrigidas antes da aplicação, através da adição de NaOH ou HCl, até o índice de pH correspondente ao do grupo de plantas a ser adubada, conforme determinado no início do experimento.

A fim de isolar o efeito ambiental para as mudas nas diferentes posições, foi mantida uma linha externa de plantas como bordadura.

TABELA 4. Características químicas da solução nutritiva, da água de irrigação e da água destilada utilizadas nos experimentos. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009.

	pH	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
Água de irrigação	5,5	176,7
Água destilada	6,4	4,8
Solução de adubação	*	1780

* Variável de acordo com o tratamento.

Para esta etapa, considerou-se como delineamento experimental em blocos casualizados, tendo como fator de bloqueamento os níveis de pH (quatro blocos) e os tratamentos compostos pelas cinco proporções de CAC e CPC, nas mesmas embalagens e substratos da primeira etapa do experimento.

Aos 160 dias procedeu-se a leitura da CE e do pH do substrato de cinco recipientes de cada parcela, tomadas aleatoriamente, pelo método utilizado foi

pour thru. Em seguida foram avaliados: a altura das plantas, verificada com régua milimetrada, considerando-se a medida desde a altura do colo até a ponta da maior folha; o número de folhas por planta; e o diâmetro do caule (altura do colo) de cada planta, através de um paquímetro.

Os dados das variáveis de ambas as etapas foram analisados quanto à distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) e igualdade das variâncias (teste de Levene). Em seguida procedeu-se a análise de variância, análise de covariância da altura das plantas na primeira etapa, tomando como covariável a respectiva altura no início do experimento. Quando os dados não apresentaram distribuição normal ou desigualdade de variâncias, executou-se a análise não-paramétrica (teste de Friedman). Quando a variância foi significativa os dados foram submetidos à análise de comparação de médias pelo teste de DMS (5%).

3.7 Adubação e desenvolvimento de mudas

A fim de testar doses de adubação e tolerância das plantas a níveis de salinidade no substrato, foram testadas concentrações de uma solução nutritiva em plantas estabelecidas em recipientes composto por substrato de origem orgânica.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com telhado de fibra transparente, com 50% de interceptação luminosa, pé-direito de 3,5m, sem paredes nas laterais leste e norte. A época correspondente ao período do experimento foi agosto de 2010 a setembro de 2011.

3.7.1 Obtenção das mudas utilizadas no experimento

As mudas foram obtidas de sementes de duas procedências: coletas em Encruzilhada do Sul (de dez matrizes) e em Santa Vitória do Palmar (de cinco

matrizes). Após a germinação as plântulas permaneceram em casa de vegetação (70% de interceptação luminosa) por 50 dias no ambiente de semeadura (bandeja coletiva com substrato a base de areia média e fibra de coco (1:2, volume), quando foram transferidas para embalagens individuais de polietileno preto, contendo 1,15 L de substrato formado por casca de arroz carbonizada (CAC) e casca de pínus compostada (CPC), em proporções volumétricas de 1:1, tendo como fertilizante adubo de liberação lenta Osmocote® (NPK 19-6-10, sem micronutrientes) tempo de liberação de três a quatro meses, na dosagem de três gramas por litro de substrato. Após 90 dias as plantas foram transferidas para casa de vegetação com maior iluminação (50% de interceptação luminosa), e cada 15 dias foram adubadas com uma solução nutritiva na fórmula: N: 10,5; P₂O₅: 6; K₂O:10,7; S: 4,6; Ca: 3,8; e Mg: 3,2; com relação Ca:Mg de 1,2 e NH₄:NO₃ de 2,6. A concentração total de sais por litro de solução foi de 2 g.L⁻¹, sendo 100 mL de solução aplicados em cada planta. Após 160 dias, as plantas foram retiradas do substrato e mensuradas quanto: à altura, ao diâmetro do caule (altura do colo); e ao número de folhas.

3.7.2 Instalação do experimento

Após a tomada das medidas das plantas, cada uma delas foi estabelecida em uma embalagem de polietileno “tipo vaso maleável” com capacidade para oito litros, com altura aproximada de 23 cm e diâmetro de 22 cm, preenchida com substrato formado por casca de pínus compostada peneirada em malha de 10 mm (CPC), e posteriormente distribuídas uniformemente em cinco grupos, os quais compuseram os tratamentos:

- 1- Tratamento controle (sem adubação);
- 2- Adubação com 0,6 g de sais por litro de substrato;

- 3- Adubação com 1,2 g de sais por litro de substrato;
- 4- Adubação com 2,4 g de sais por litro de substrato;
- 5- Adubação com 3,6 g de sais por litro de substrato.

Para todos os tratamentos, a relação dos elementos da adubação, foi a seguinte (adaptado de Broschat, 2000): N: 3; P₂O₅: 1; K₂O: 2; S: 2,7; Ca: 2; e Mg: 1; com relação NH₄:NO₃ : 1:1. A formulação da adubação foi constituída com os sais: cloreto de potássio, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, fosfato monoamônico, sulfato de amônio e ureia.

A aplicação foi realizada em cobertura, ou seja, os sais foram distribuídos sobre o substrato de cada recipiente, seguido de leve revolvimento de forma a homogeneizar o fertilizante com os primeiros dois a três centímetros de substrato, seguido de irrigação manual por aspersão, em quantidade de 150 a 200 mL por recipiente. A primeira adubação foi realizada 25 dias após a instalação do experimento e as subsequentes ocorreram a cada 30 dias nos meses com temperatura média ambiente acima de 18 °C, e a cada 60 dias quando em temperatura igual ou inferior a 18 °C (Broschat, 2000).

A necessidade de irrigação das plantas foi verificada através de tensiômetros constituídos por uma cápsula porosa de cerâmica interligada a um vacuômetro analógico graduado. A cápsula porosa foi inserida no substrato ao lado da muda em profundidade de 15 a 20 cm. As irrigações foram realizadas sempre que a pressão negativa nos tensiômetros apontava, em média, de 90 a 120 hPa. Foram utilizados cinco tensiômetros, um por tratamento. A aplicação da irrigação foi realizada manualmente através de mangueira de jardim com dispersor de gotas, sendo aspergidos de 150 a 200 mL de água por planta.

Os vasos com as plantas permaneceram em espaçamento de 10 cm (32 cm entre plantas) nos primeiros cinco meses. Após, o espaçamento foi

aumentado para 25 cm entre vasos (47 cm entre plantas). A fim de evitar o contato direto da base dos vasos com o piso da casa de vegetação, cada vaso foi apoiado sobre um tijolo de construção (18 x 13 x 9 cm) (Figura 5).



FIGURA 5. Tensiômetro usado para verificação de necessidade de irrigação durante a condução do experimento de adubação e desenvolvimento de mudas de *Butia odorata* em casa de vegetação. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2010.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, tendo como fator de bloqueamento a origem das mudas. Cada parcela foi constituída de dez plantas, sendo o bloco 1 de plantas oriundas de sementes coletadas em Santa Vitória do Palmar e o bloco 2 de sementes coletadas em Encruzilhada do Sul, totalizando 100 plantas.

Durante a condução do experimento foram avaliados a cada 30 dias a CE e o pH do substrato; e o desenvolvimento das plantas, pela medida do diâmetro do caule, o número de folhas e o número de folhas pinadas. A análise do substrato foi realizada tomando-se dois recipientes aleatoriamente de cada tratamento e submetendo-os ao método *pour thru* (Cavins, 2000; Schafer e Souza, 2005), com base na leitura direta de pH e CE do lixiviado dos recipientes após saturação com água. Além disso, foi realizado um monitoramento do pH e

da CE do substrato, também pelo método *pour thru*, um, dez, 20 e 30 dias após a sexta avaliação.

A avaliação dos sintomas de distúrbio nutricional foi realizada através da atribuição de número crescente, proporcionalmente à intensidade dos sintomas, através de uma escala de zero a cinco, sendo atribuído zero à planta com ausência de sintomas e cinco à maior intensidade, em cada avaliação.

Os dados correspondentes às variáveis analisadas foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e ao de homocedasticidade de Levene. Quando algum destes dois requisitos não fora atendido, executou-se a transformação dos dados, conforme a variável, sendo posteriormente novamente submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade.

3.7.3 Monitoramento da ocorrência de pragas

Durante o desenvolvimento das mudas foram monitorados os sintomas de pragas além da coleta e identificação pragas observadas.

A coleta foi realizada através da retirada da praga ou parte da planta atacada. As amostras foram examinadas no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS e na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária.

Após a coleta de amostras foram aplicados defensivos para combater as pragas. As aplicações foram realizadas somente com fins curativos, sendo necessárias em torno de uma aplicação a cada 30 dias de óleo mineral a 1,5% e *Bacillus thuringiensis* (marca comercial Dipel®, 3 g.L⁻¹), durante os meses de primavera e verão; e duas aplicações de acefato a 1 g.L⁻¹ (Orthene® 750 BR), no mês de janeiro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta e análise inicial de sementes

A abscisão total dos frutos que permaneceram aderidos às ráquias após a coleta ocorreu em até três dias, o que aconteceu acompanhado da mudança de coloração, extinguindo-se a coloração verde. A temperatura média do ambiente no período variou entre 19 e 32 °C.

A umidade dos diásporos das diferentes matrizes no ponto de coleta apresentou variação significativa pelo teste F. Diásporos de frutos parcialmente verdes apresentaram maior umidade (19,20%) do que os outros dois grupos, os quais não diferiram entre si (Tabela 5). Apesar da aparente condição de imaturidade dos frutos, estes teores de água assemelham-se muito aos valores encontrados por Neves *et al.* (2010) para a espécie *Butia capitata*, em frutos visualmente maduros. Conforme esses autores, o percentual de umidade das sementes e do endocarpo foi de 20,9 e 17,8%, respectivamente, o que, na média, resulta em um valor muito próximo ao encontrado no presente trabalho, onde se determinou a umidade das sementes e endocarpo sem separá-los.

Entre o período da coleta, despolpa e a permanência por uma semana sob bancada de laboratório, constatou-se que o teor de água reduziu-se para 11,06%, em média, sem diferença significativa entre as amostras (Tabela 6). Esta redução de umidade pode se dever, em parte, à complementação do processo de maturação, quando a diminuição do teor de água do diásporo é esperada em

função de processos fisiológicos que naturalmente ocorrem na ocasião que antecede a dispersão das sementes (Ferreira e Borghetti, 2004). Este fator pode ter sido beneficiado pelo fato de os frutos terem permanecido nas ráquulas até a abscisão, para então serem despulpados.

TABELA 5. Teor de água de diásporos de *Butia odorata* de dez matrizes coletados de uma população em Encruzilhada do Sul, RS, analisados de maneira agrupada, de acordo com a condição visual de maturação. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.

Condição dos frutos na coleta	Teor de água no ponto de coleta (%)	Teor de água oito dias após a coleta (%)
Parcialmente verde	19,20 b	11,22
Verde ausente	17,35 a	11,26
Verde ausente e parte abscisada	18,02 a	10,73
Valor P	<0,001	0,154
CV (%)	3,65	5,67

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (1%).

A massa de 1000 diásporos também apresentou diferença significativa entre as amostras das matrizes, sendo o valor médio de 1,89 Kg, com amplitude de 1,17Kg (Tabela 7). No entanto, esta variável não apresentou correlação significativa com o teor de água na coleta ($P= 0,06$), o que significa que os valores encontrados para a massa de 1000 diásporos não dependeram da condição de maturação, e que esta amplitude também é uma característica de variabilidade intrínseca da espécie.

Para a espécie *Butia capitata* a massa de 1000 diásporos verificada por Lopes *et al.* (2007) e Lopes *et al.* (2011) foi de 1,245 e 1,222Kg, respectivamente. Estes valores são cerca de 30% inferiores ao encontrado no presente trabalho para *B. odorata*, o que sugere menor tamanho dos diásporos de *B. capitata*.

TABELA 6. Teor de água de diásporos de *Butia odorata* de dez matrizes coletados de uma população em Encruzilhada do Sul, RS, utilizados para os experimentos de superação de dormência das sementes e teste de longevidade. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.

Matriz	Teor de água no ponto de coleta		Teor de água oito dias após a despolpa
81/08	16,75	a	10,99
86/08	17,27	ab	10,87
73/08	17,95	ab	10,28
80/08	18,09	bcd	10,74
85/08	18,56	cde	11,12
84/08	18,69	cdef	11,05
78/08	18,75	cdef	11,65
83/08	19,19	def	11,78
82/08	19,71	ef	11,15
79/08	19,80	f	11,05
Média Geral	18,45		11,06
Valor P	<0,001		0,234
CV (%)	2,23		5,55

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (1%).

A maioria dos diásporos apresentava excelente condição visual, sem sinais de injúrias ou ataque de pragas, no entanto cerca de 37% dos caroços estavam perfurados por insetos, muito provavelmente o *Butiobruchus sp* (Bruchidae) (Link e Naibo, 1995). A ovoposição deste inseto ocorre quando o fruto está verde, antes do endurecimento do caroço, cerca de 70 a 95 dias antes da maturação dos frutos. Em um estudo realizado durante três anos na cidade de Santa Maria, RS, constatou-se que a maior ocorrência de insetos adultos de *Butiobruchus* ocorreu nos meses de outubro a fevereiro. No entanto, foi verificada a emergência de insetos também entre os meses de maio a setembro, durante os dias de temperatura mais elevada após um período de temperatura inferior a 15 °C (Link e Naibo, 1995). De acordo com Espinosa (2001), em estudo realizado em Castillos, Uruguai, verificou-se que em frutos produzidos por plantas com menor densidade

a incidência de insetos é cinco vezes maior. Esse autor refere que foram verificadas pelo menos duas espécies de insetos predando sementes de *B. odorata* nas populações estudadas. No presente trabalho, foram verificados em alguns endocarpos, larvas de formato e tamanho diferentes da maioria, indicando a possibilidade de tratar-se de uma segunda espécie, no entanto, não foi possível a identificação.

TABELA 7. Massa de 1000 diásporos de *Butia odorata* de dez matrizes de uma população em Encruzilhada do Sul, RS. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.

Matriz	Massa de 1000 diásporos (Kg)
84/08	1,13 a
83/08	1,75 b
78/08	1,80 bc
80/08	1,90 cd
73/08	1,93 cd
85/08	1,96 de
79/08	2,02 de
82/08	2,02 de
81/08	2,07 e
86/08	2,30 f
Média Geral	1,89
Valor P	<0,001
CV(%)	3,31

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (1%).

A maioria dos diásporos com insetos apresentava apenas uma semente danificada. De acordo com Link e Naibo (1995) na maioria dos diásporos, a incidência de insetos ocorre em apenas uma semente, eventualmente duas, e raramente há ataque nas três sementes do mesmo diásporo.

Em um levantamento etnobotânico realizado no sul do Rio Grande do Sul por Büttow *et al.* (2009), um entrevistado salientou que de acordo com as observações locais, “o melhor fruto” de *B. odorata*, por ser mais doce e estar livre dos insetos é o do último cacho produzido no ciclo, o qual geralmente amadurece no mês de abril. Este é um mês com temperaturas locais mais amenas, o que desfavorece a proliferação dos insetos.

Tendo em conta que não houve diferença no teor de água dos diásporos uma semana após a coleta, e pela necessidade de um volume maior de propágulos que representasse a população na realização de testes de viabilidade e longevidade, optou-se por reunir as amostras das dez matrizes em um único lote, o qual foi considerado o acesso representativo da população.

4.1.1 Análise de viabilidade

Durante o processo de isolamento dos embriões, não foram visualizados embriões em 2% das sementes, independentemente da origem das sementes. Ao invés da cavidade embrionária e embrião, estas sementes apresentavam endosperma denso e homogêneo, sem vestígio de embrião, ao menos no que foi possível visualizar ao estereomicroscópio com aumento de 32 vezes (Figura 6). Esta observação também foi constatada em sementes de *B. capitata* coletadas em Lontra (MG) e *Butiagrus nabonnandii* coletadas em Pelotas, RS, em trabalhos desenvolvidos paralelamente ao presente estudo. Porém, para *B. nabonnandii* o percentual de sementes sem embrião foi superior, 18%.

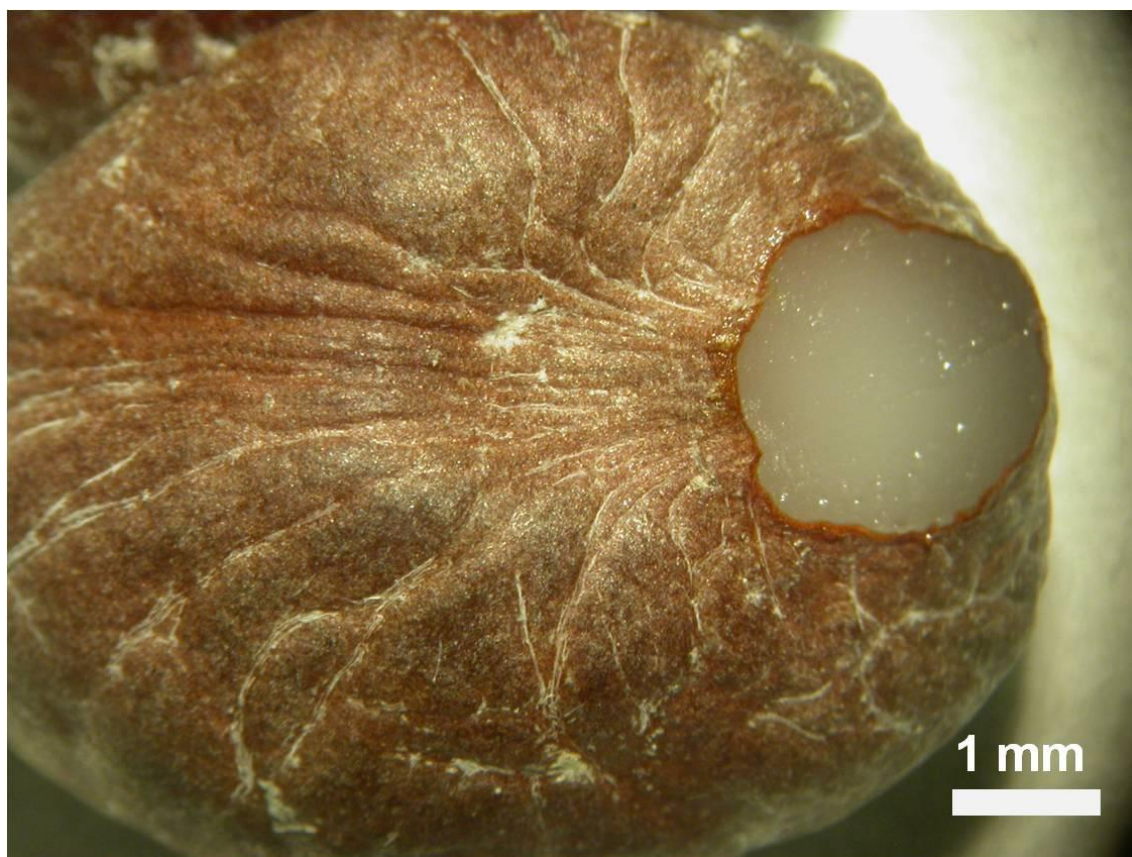


FIGURA 6. Semente de *Butia odorata* sem embrião. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

Ao longo da evolução, barreiras pré e pós-zigóticas à embriogênese vegetal auxiliaram na manutenção das espécies como entidades biológicas. Barreiras pós-zigóticas incluem inúmeros eventos associados à incompatibilidade genética que inviabilizam a formação de embriões híbridos e, quando não ocorrem, permitem a formação de indivíduos altamente segregantes. No caso da formação de sementes de *Butia* spp e *Butiagrus nabonnandii*, não há eventos que inviabilizem a dupla fecundação, de modo que o xenófito (endosperma) e o zigoto formam-se. Porém, as falhas ocorrem em um dos inúmeros eventos posteriores requeridos para a embriogênese, seja na formação do xenófito (endosperma) ou do embrião da futura planta (esporófito) ou em ambos (Niklas, 1997). Assim, é possível que o embrião esporofítico se inviabilize mesmo com a continuidade do desenvolvimento do endosperma, sendo esta uma hipótese para o registro feito

neste trabalho. Possivelmente esta ocorrência esteja ligada a aspectos relacionados a incompatibilidades pós-zigóticas na fecundação, impedindo o desenvolvimento do zigoto, mas sem afetar a formação do endosperma. É importante salientar que a espécie aparentada *Syagrus romanzoffiana* ocorre na maior parte das formações florestais do Rio Grande do Sul, excetuando-se a Floresta com Araucária (Sobral *et al.*, 2006), e a polinização de uma espécie sobre a outra pode estar contribuindo para este evento observado.

Nos testes de viabilidade, verificou-se início do desenvolvimento do pecíolo cotiledonar a partir do segundo dia *in vitro*, iniciando pelo intumescimento e posteriormente a alongação. A partir do quarto dia *in vitro*, percebeu-se espiralização do pecíolo cotiledonar, sendo que alguns formaram semicírculos e outros espirais com tamanhos variados, tendo em uma das extremidades a região do haustório e na outra o botão germinativo (Figura 8). Esta conformação espiralizada parece estar relacionada ao efeito do geotropismo positivo, o qual age sobre a região de crescimento do pecíolo cotiledonar de forma a imergir a região do botão germinativo no substrato. No caso específico da germinação *in vitro*, a impedância mecânica do meio de cultivo provocada pela sua consistência de gel evita a penetração, mas não impede a continuidade do desenvolvimento, o que provoca a curvatura e elevação da sua porção mediana. Devido a essa elevação, há o tombamento, o que provoca alteração de posição sobre o meio e, conseqüentemente, da direção do crescimento, estimulado pelo efeito do geotropismo. Este ciclo repetitivo tem como consequência a espiralização.

Ao décimo dia, cerca de 90% dos embriões já apresentavam algum tipo de crescimento, sendo, portanto, considerados como germinados. A emissão da primeira folha, visualizada a partir de uma fenda longitudinal no pecíolo cotiledonar, na região oposta ao haustório, ocorreu a partir do 14^o dia *in vitro*,

sendo que aos 25 dias verificou-se o crescimento em mais de 80% dos embriões germinados (Figura 8). O mesmo ocorreu com o desenvolvimento da raiz. Ao 45º dia *in vitro* a grande maioria dos embriões germinados apresentava raiz e folha visíveis, com média de 2,3 e 2,8 mm, respectivamente (Figura 9), e ao 90º dia uma média de 83% dos embriões inoculados haviam formado plântulas completas.

Soares *et al.* (2011) obtiveram 60% de germinação *in vitro* de embriões de *Acrocomia aculeata* em 60 dias de avaliação, e 96% em 90 dias. Estes autores consideraram germinados apenas os embriões com parte aérea e raiz visíveis, diferentemente do presente trabalho. Ainda, segundo esses autores, os maiores índices de velocidade de geminação ocorreram em meio de cultivo MS com 50% da concentração dos sais, em comparação ao MS 100%. Contudo, comparando-se ambos os trabalhos, constata-se maior percentual de formação de plântulas de *A. aculeata*.

De acordo com Magalhães (2011), embriões de *B. capitata* cultivados *in vitro* a 25 °C, porém na ausência de luz, iniciaram a expansão da primeira folha entre o 12º e o 16º dia. Esses resultados corroboram os encontrados no presente estudo, mesmo se tratando de espécies diferentes e com ocorrência em ecossistemas distintos.

No final do período de acompanhamento, aos 90 dias, verificou-se alta germinação de embriões, além de formação de plântulas completas acima de 80% (Figuras 7, 8 e 9).

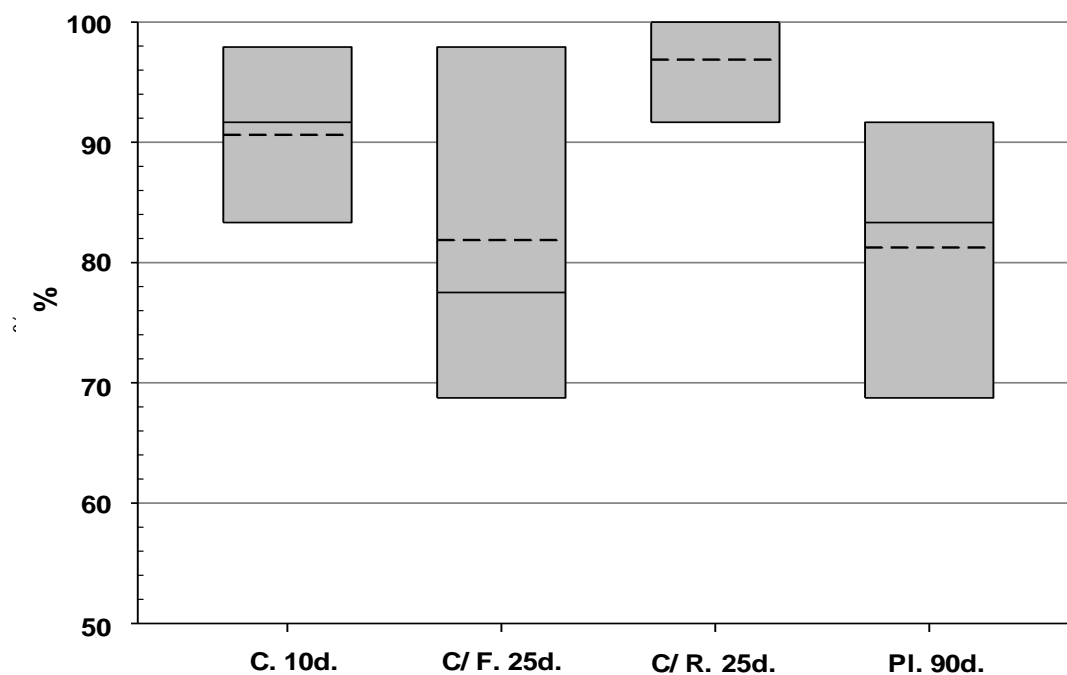


FIGURA 7. Viabilidade das sementes de *Butia odorata* no ponto de coleta, oriundas de uma população em Encruzilhada do Sul. (**C.10d.**= embriões crescidos aos 10 dias após sementeira; **C/F. 25d.**= Percentual de embriões com folha visível em relação aos crescidos aos 25 dias após sementeira; **C/R. 25d.** = Percentual de embriões com raiz visível em relação aos crescidos aos 25 dias após sementeira; **PI. 90d.**= Plântulas completas aos 90 dias após a sementeira; linha tracejada no interior da caixa=média). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

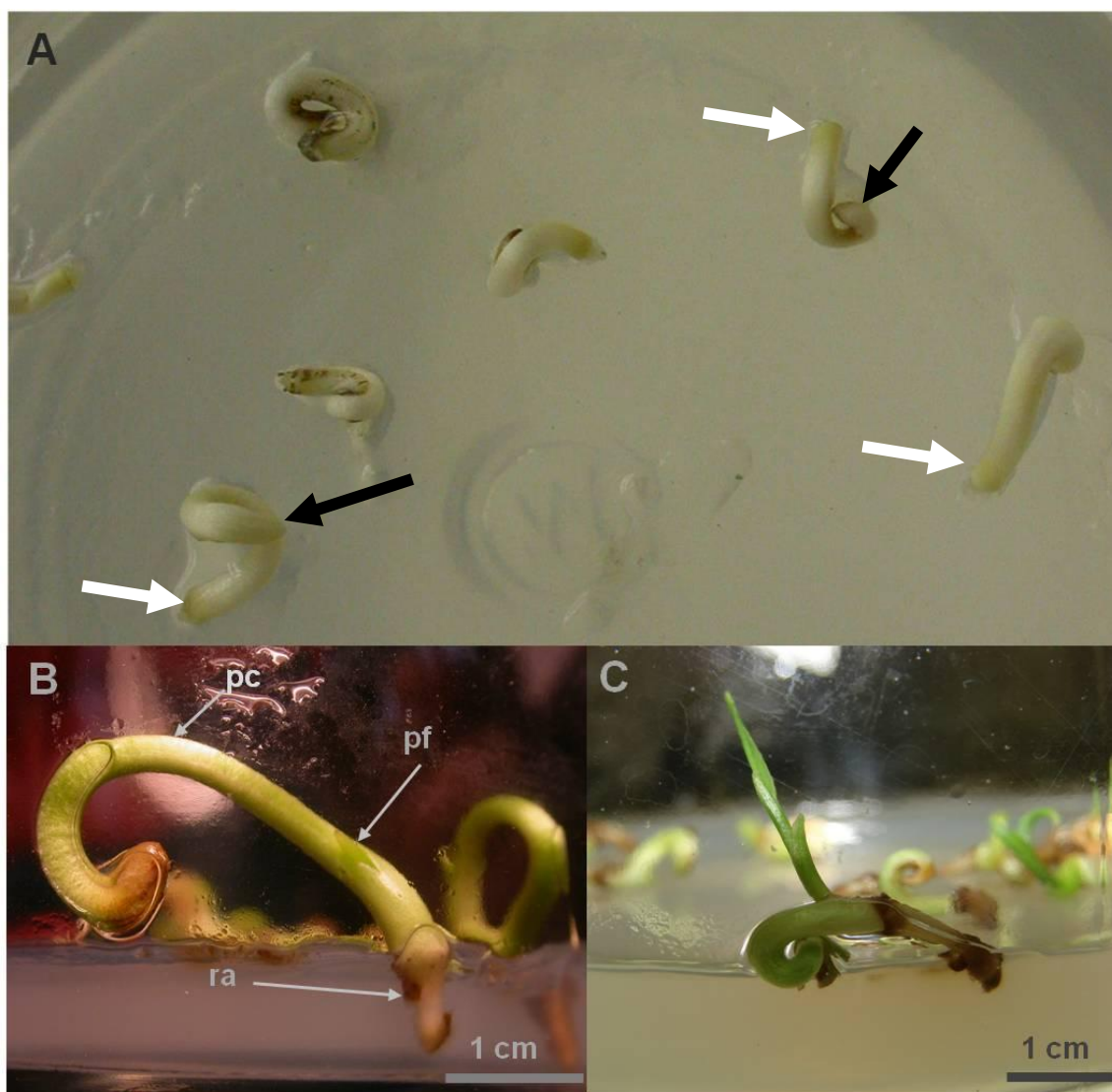


FIGURA 8. Germinação e desenvolvimento de plântulas de *Butia odorata* *in vitro*. **A**: embriões com pecíolo cotiledonar espiralizados ao décimo dia *in vitro* – setas brancas: região do botão germinativo; setas pretas: região do haustório; **B**: Início da emissão da primeira folha, ao 15º dia *in vitro* – **pc**: pecíolo cotiledonar; **pf**: primeira folha sendo emitida; **ra**: raiz. **C**: planta completa ao 30º dia após o estabelecimento *in vitro*.

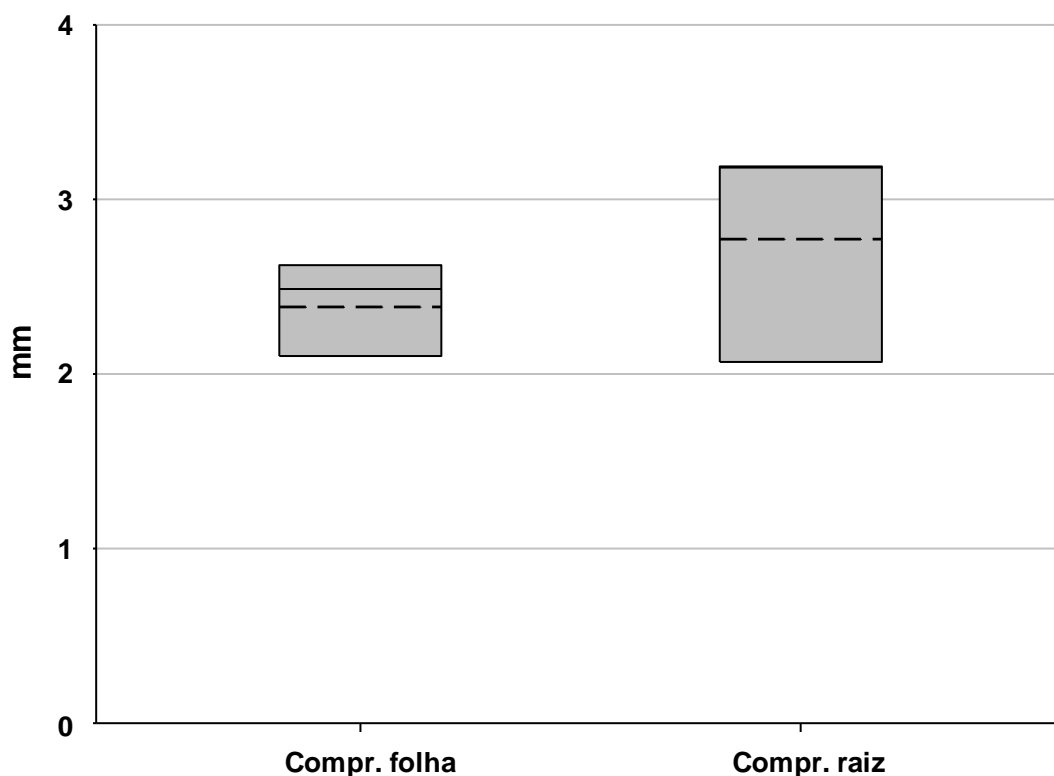


FIGURA 9. Viabilidade das sementes de *Butia odorata* no ponto de coleta, oriundas de uma população em Encruzilhada do Sul. (**Compr. Folha**= Comprimento da primeira folha aos 25 dias após a semeadura; **Compr. Raiz**= Comprimento da raiz aos 25 dias após a semeadura; linha tracejada no interior da caixa=média), UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

4.1.2 Teste de viabilidade de sementes de mesmo diásporo

A média do desenvolvimento dos embriões foi bastante similar, não tendo sido evidenciada diferença na germinação e desenvolvimento de algum dos embriões, em relação aos demais do mesmo diásporo. O desvio padrão sobre a média dos embriões de todos os diásporos testados foi bem superior ao encontrado para a média dos desvios de cada diásporo (Tabela 8). Esses resultados sugerem que a variação da capacidade de germinar e do vigor dos embriões pode ser aleatória entre as sementes de um mesmo diásporo, ou de diásporos diferentes.

TABELA 8. Análise do desenvolvimento de embriões de *Butia odorata* semeados *in vitro*: Média aritmética, desvio padrão médio dos três embriões de cada diásporo e desvio padrão da média de todos os embriões. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.

	Média	Desvio padrão da média dos diásporos	Desvio padrão da média geral
Crescimento aos 10 dias*	0,93	0,12	0,25
Comprimento de folhas aos 25 dias (mm)	2,47	2,50	3,03
Comprimento de raízes aos 25 dias (mm)	3,68	1,77	2,76
Folhas visíveis sobre o total de germinadas aos 25 dias*	0,83	0,24	0,38
Raízes visíveis sobre o total de germinadas aos 25 dias*	0,97	0,06	0,18
Plântulas completas aos 90 dias*	0,86	0,20	0,35

*Escala: binária.

A análise pelo índice de Jaccard também indicou que 88,3% do total de embriões analisados apresentaram respostas de, pelo menos, 80% de similaridade, e não é possível agrupar embrião de diásporos diferentes que tenham se destacado nas variáveis analisadas, o que indica a relativa homogeneidade nas respostas, indiferentemente da origem do embrião, se de mesmo ou diferente diásporo (Figura 10).

Desta forma, pode-se inferir que não há prevalência na formação e desenvolvimento de alguma das sementes formadas em um mesmo diásporo, em detrimento à outra. É possível, portanto, um mesmo diásporo de *B. odorata* originar de uma a três plântulas.

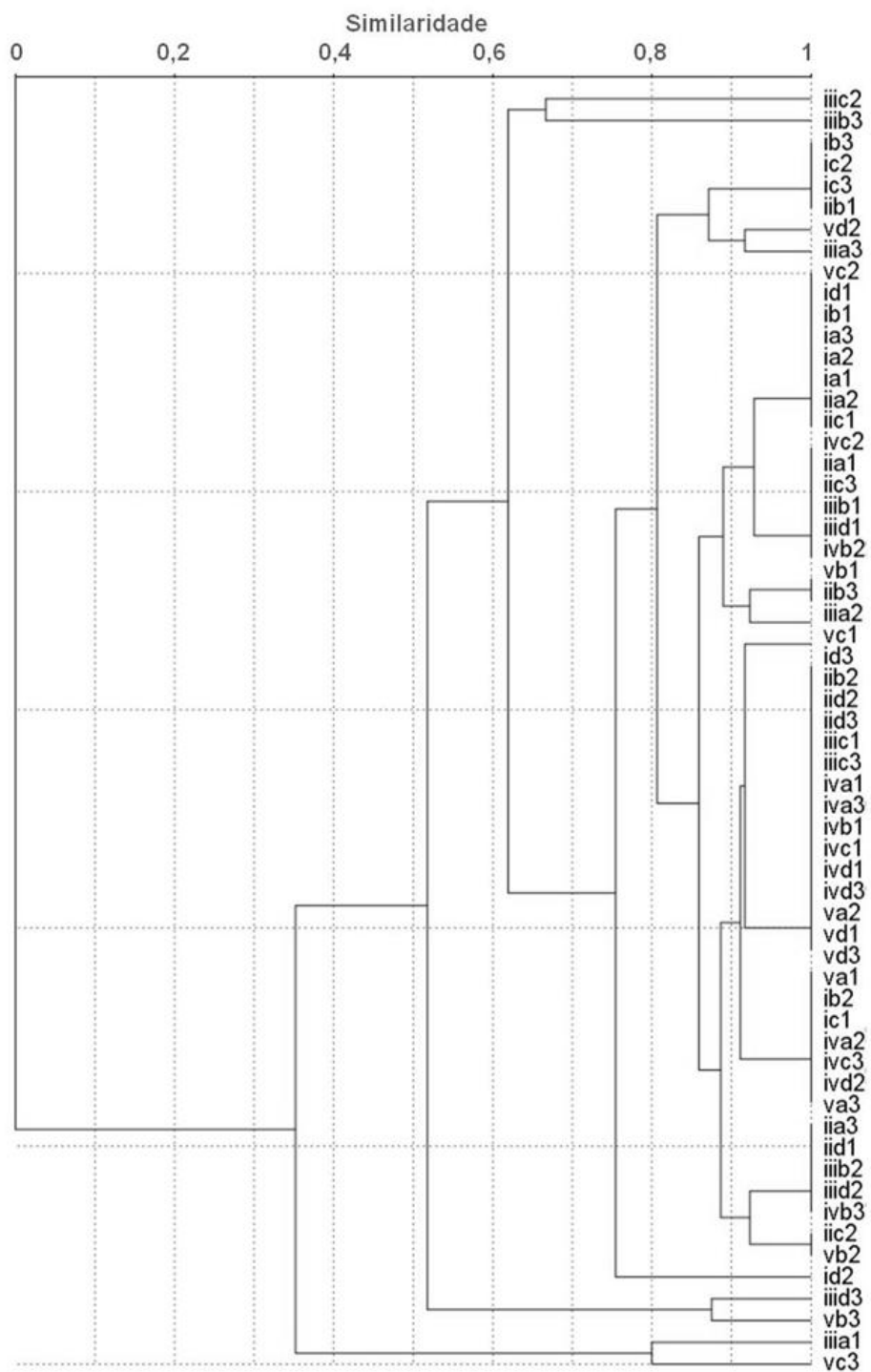


FIGURA 10. Análise de similaridade de Jaccard da germinação e desenvolvimento de embriões de *Butia odorata* oriundos de sementes de mesmos diásporos e diásporos distintos (de i a v: as cinco repetição; de a a d: os quatro diásporos em cada repetição; de 1 a 3 os três embriões de cada diásporo). FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2008.

Apesar de o experimento ter sido realizado em condições atípicas, com o isolamento dos embriões em meio de cultivo, pode-se inferir que esta possa ser uma propriedade natural da espécie. Esses resultados são corroborados por Schlindwein *et al.* (2007), em experimentos com semeadura de diásporos de *B. odorata*, no qual foram obtidos, em média, mais de uma plântula emergida por diásporo semeado.

4.1.3 Análise de longevidade de sementes de diásporos armazenados em diferentes ambientes.

4.1.3.1 Teor de água

Na avaliação dos primeiros 90 dias foi possível verificar uma relação direta do teor de água do diásporo com a umidade do ambiente de armazenamento, o que sugere o equilíbrio da umidade entre a capacidade de retenção pelo potencial hídrico dos tecidos do diásporo e a flutuação média da umidade ambiental (Figura 11).

Essa tendência permaneceu até o final do acompanhamento, sendo que os diásporos armazenados em câmara fria apresentaram os teores de água mais elevados, variando de 11,2% a 12,1%, enquanto que, em câmara seca, os mais reduzidos, de 8,25% a 9,7%. Em condições de ambiente de laboratório, pela ausência de controle de umidade, ocorreu maior amplitude do percentual de umidade, o qual variou de 9,9% a 11,1%. Esta maior amplitude certamente está relacionada à variação natural provocada pelas condições climáticas de cada período (Figura 12).

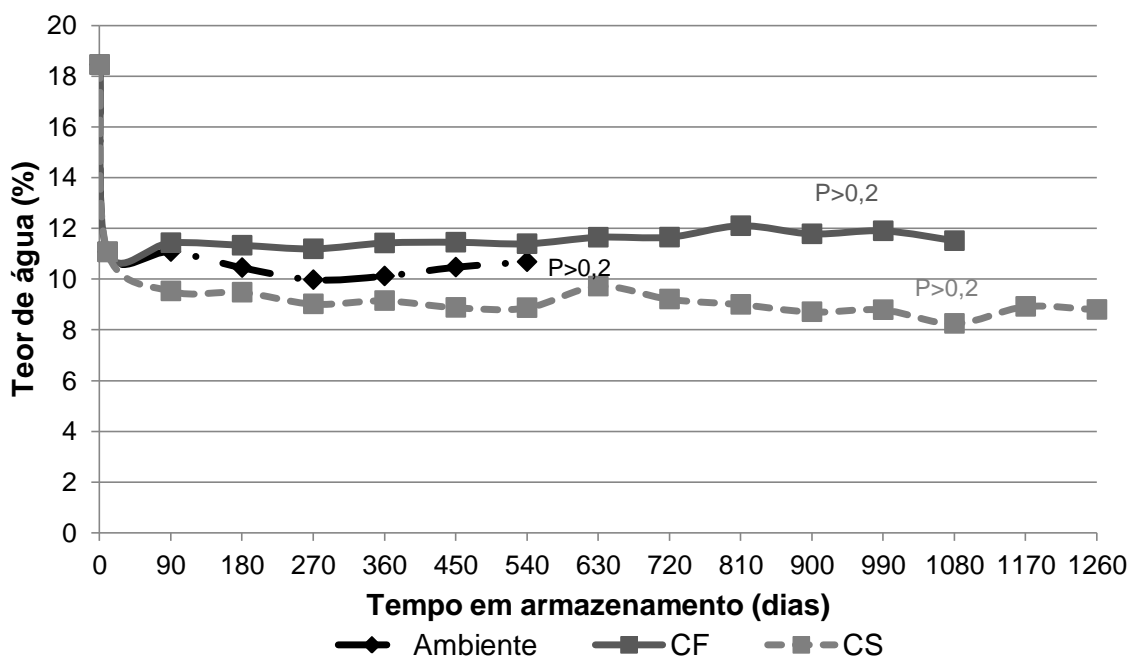


FIGURA 11. Teor de água dos diásporos de *Butia odorata* ao longo do período de armazenamento em ambiente de laboratório (Ambiente), câmara fria (5 °C e 80% de umidade relativa do ar (CF) e câmara seca (17 °C e 45% de umidade relativa do ar) (CS). FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2011.

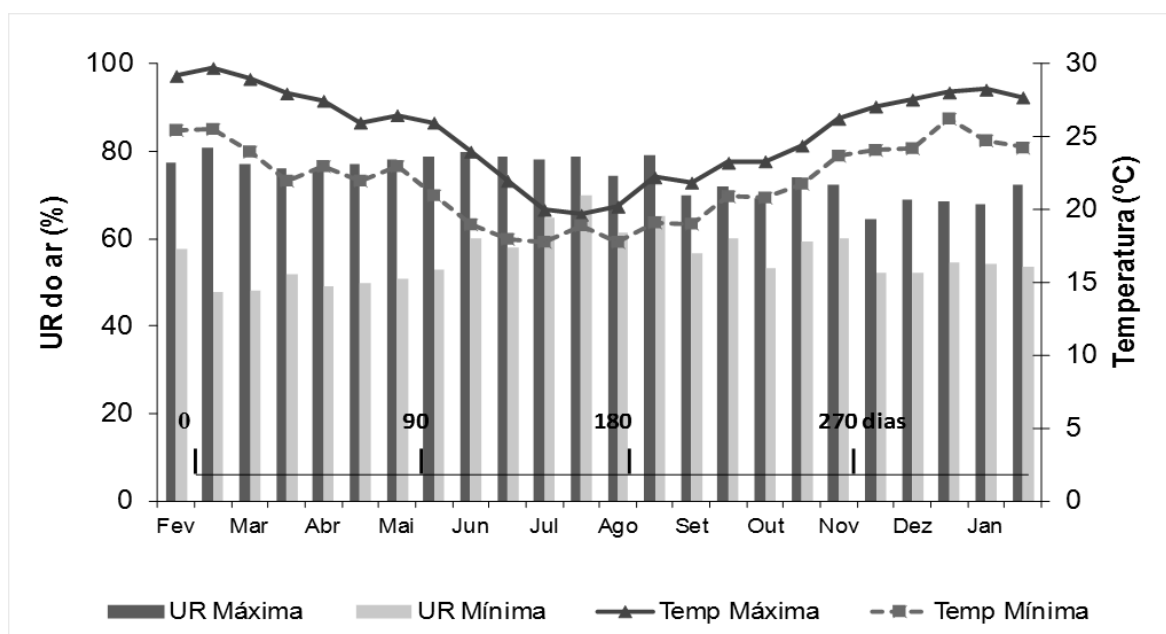


FIGURA 12. Temperatura e umidade relativa do ar, máximas e mínimas no local de armazenamento dos diásporos de *Butia odorata* em condições de laboratório. Linha em preto no interior do gráfico: tempo de armazenamento no período correspondente. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2010.

Ferreira e Gentil (2006) obtiveram 23% de umidade em sementes de *Astrocaryum aculeatum* logo após a coleta de frutos visualmente maduros. Após 30 dias de secagem dos diásporos em condições de ambiente sombreado a umidade das sementes foi reduzida para 14%. Estes valores são semelhantes aos encontrados para *B. odorata* no presente trabalho, e refletem a queda na umidade dos diásporos no período subsequente à coleta e beneficiamento.

A viabilidade ao longo do período de armazenamento foi influenciada pelo ambiente. A partir dos 180 dias, os três lotes passaram a apresentar diferenças, tanto em relação ao percentual de embriões desenvolvidos aos 10 dias (germinação), quanto a plântulas formadas aos 90 dias (Figuras 13 e 14). Houve tendência quadrática decrescente com significância superior a 99% para as análises dos três ambientes, para ambas as variáveis.

O ambiente de laboratório foi o menos favorável para a manutenção da viabilidade dos diásporos, chegando a 10% de germinação aos 450 dias. Resultado semelhante foi constatado para a variável plântulas completas na avaliação 90 dias *in vitro*, cujo percentual foi nulo aos 450 dias.

A diminuição da viabilidade das sementes armazenadas em ambiente de laboratório ocorreu de forma mais intensa entre os 270 e 360 dias em armazenamento. Somente nesse período, a queda na germinação e na formação de plântulas completas foi de 46 e 47 pontos percentuais, respectivamente. Este período coincidiu com a gradual elevação da temperatura ambiente, em função do final da primavera e início do verão. Esta condição ambiental de maior temperatura pode ter aumentado a taxa respiratória dos embriões, favorecendo maior consumo de energia, além de induzir, mesmo que parcialmente, o início do processo de germinação, e por não ter havido suprimento das demais condições

ambientais para a germinação, ocorreria a inviabilização de elevada taxa de embriões.

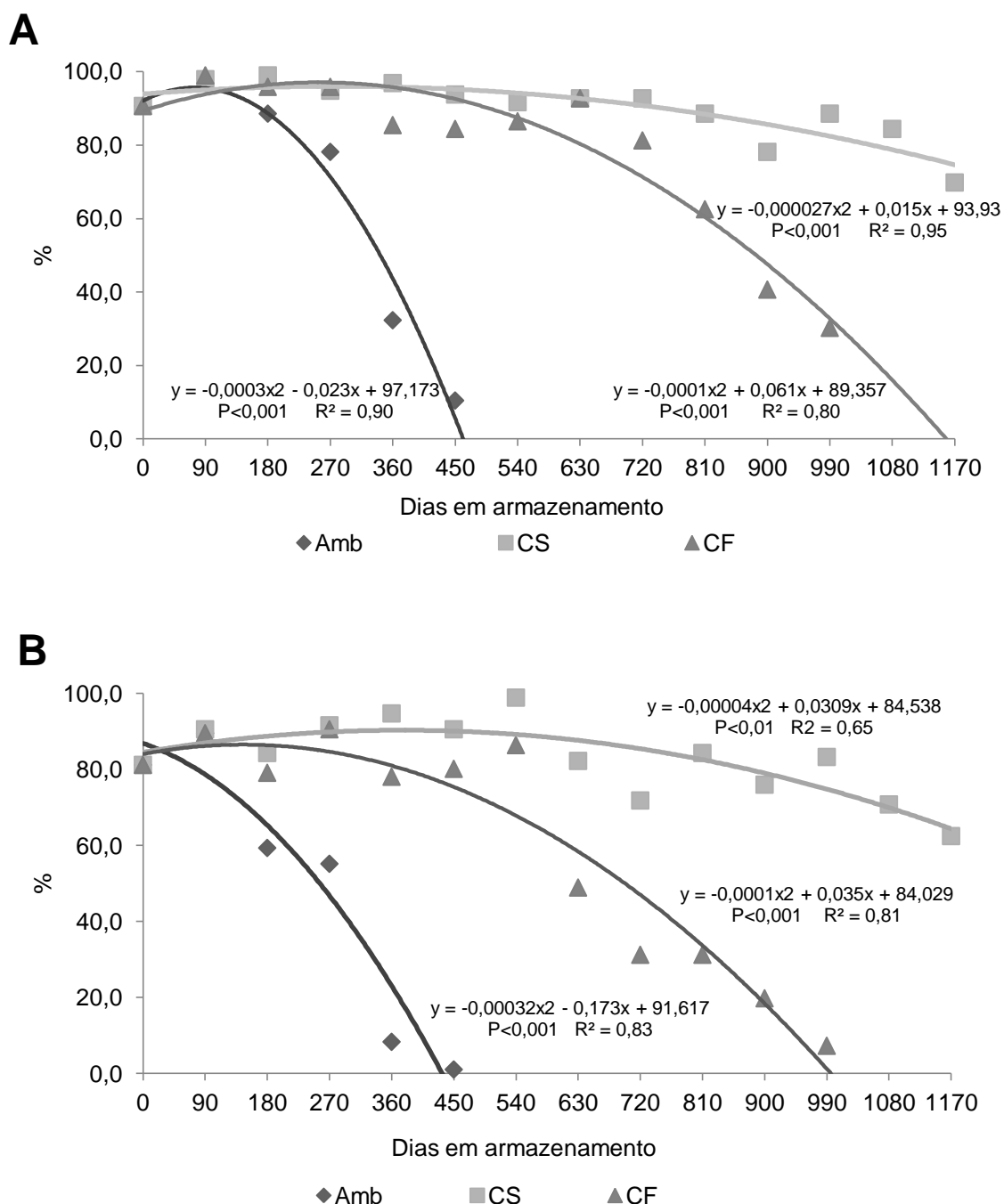


FIGURA 13. Viabilidade de sementes de *Butia odorata* ao longo do período de armazenamento em ambiente de laboratório (Ambiente), câmara fria (5 °C e 80% de umidade relativa do ar) (CF) e câmara seca (17 °C e 45% de umidade relativa do ar) (CS), testado através do desenvolvimento de embriões *in vitro* (A = embriões crescidos aos 10 dias e B= plântulas completas formadas aos 90 dias após o estabelecimento). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.



FIGURA 14. Viabilidade de sementes de *Butia odorata*: frascos com plântulas em desenvolvimento, aos 90 dias após a semeadura. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.

O armazenamento em câmara fria prolongou a viabilidade das sementes quando comparado ao ambiente de laboratório, pois aos 820 dias, a germinação ainda mantinha-se em percentuais próximos a 80% e a formação de plantas completas em cerca de 30%. Contudo, aos 990 dias, a formação de plântulas completas reduziu para 7%.

Neves *et al.* (2008a) testaram a conservação de sementes de *B. capitata* em três condições: sob ambiente sombreado, entre areia úmida e em refrigerador a 10 °C. Avaliações aos 30, 60 e 90 dias através do estabelecimento dos embriões em meio MS, indicaram diminuição da viabilidade dos embriões ao longo dos 90 dias, independente do ambiente de armazenamento. Contudo, a conservação de viabilidade foi maior nas sementes armazenadas em ambiente

sombreado.

Luz e Pivetta (2010) armazenaram sementes de *Archontophoenix cunninghamii* em câmara fria (temperatura de 10 °C e umidade relativa de 62 a 65 %) por 11 meses. O percentual de germinação reduziu de 90 para 44%, mesmo sem alteração significativa no teor de água das sementes (35%).

Dentre os ambientes testados, a câmara seca foi a que proporcionou maior longevidade às sementes, mantendo um percentual de germinação e formação de plântulas normais de 70% e 63% por mais de três anos (1170 dias). Esta informação é muito importante para trabalhos de conservação de germoplasma, uma vez que a longevidade dos propágulos pode ser estendida mediante o armazenamento em ambiente adequado.

Estes resultados apontam para um comportamento diferenciado das sementes de *B. odorata* dentre a maioria das espécie de arecáceas. Informações disponíveis na literatura indicam que sementes desta família apresentam elevado teor de água e sua viabilidade não se mantêm por muito tempo, mesmo em condições favoráveis de armazenamento (Robinson, 2002). Este é um comportamento típico de sementes de espécies recalcitrantes, que além de curta longevidade, não toleram dessecação, devendo o teor de água ser mantido a níveis muito próximos aos da coleta (Hong e Ellis, 1996). Em função disso, os dados do presente estudo apontam para a necessidade de avaliações mais aprofundadas a fim de permitir a classificação das sementes de *B. odorata*, quanto ao comportamento fisiológico em condições de redução de umidade (dessecação) a níveis próximos a 5% e teste de viabilidade após armazenamento em condições de temperatura sub-zero.

Durante as análises, ao longo do período de armazenamento, percebeu-se variação na taxa de desenvolvimento das plântulas recém germinadas, indicando

diferença de vigor em relação ao tempo de armazenamento. Tanto para sementes armazenadas em câmara seca quanto em câmara fria, o percentual de folhas visíveis em relação ao percentual de germinação aos 25 dias decresceu desde o teste realizado logo após a coleta até cerca de dois anos de armazenamento, seguido de elevação de forma semelhante em ambos os ambientes. Em condições de laboratório estas variáveis apresentaram queda constante até a perda da viabilidade das sementes, o que aconteceu pouco depois do final do primeiro ano de armazenamento. Contudo, o comprimento da primeira folha na avaliação do 25º dia apresentou tendência quadrática crescente em câmara seca, sendo indiferente estatisticamente nos demais (Figura 15). Resultados semelhantes foram encontrados para as variáveis percentual de raízes visíveis e comprimento das raízes aos 25 dias (Figura 16).

Os resultados apontam que para a conservação da viabilidade de diásporos de *B. odorata* o ambiente de armazenamento deve ter temperatura amena e baixa umidade relativa do ar. Esta é uma informação importante não apenas pela aplicação técnica em trabalhos de conservação de sementes, como também por indicar um possível comportamento de semente ortodoxa para a espécie.

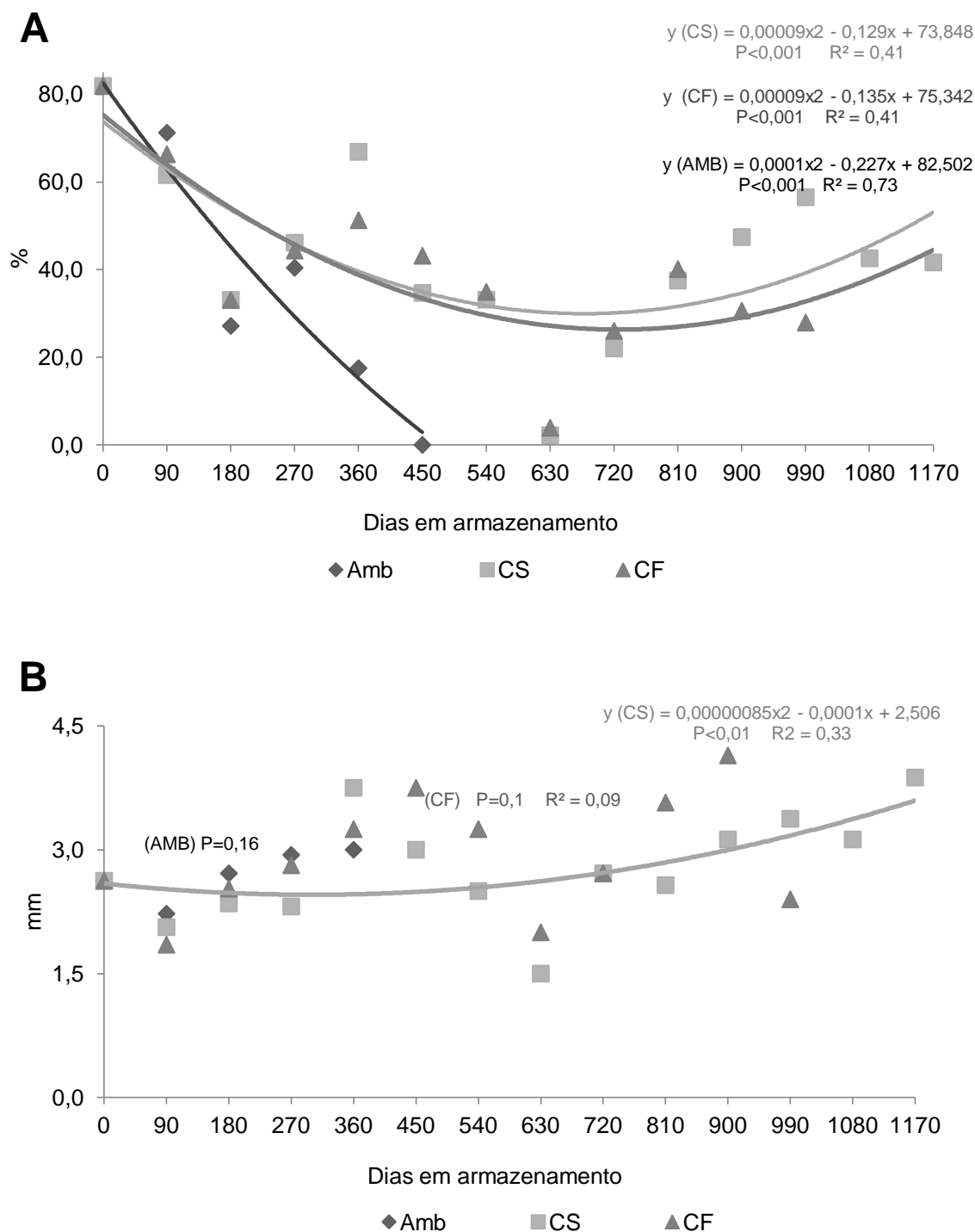


FIGURA 15. Viabilidade de sementes de *Butia odorata* ao longo do período de armazenamento em ambiente de laboratório (Ambiente), câmara fria (5 °C e 80% de umidade relativa do ar) (CF) e câmara seca (17 °C e 45% de umidade relativa do ar) (CS), testado através do desenvolvimento de embriões *in vitro* (**A** = Percentual de folhas visíveis em relação ao percentual de embriões desenvolvidos aos 25 dias após estabelecimento e **B** = Comprimento da folha aos 25 dias após estabelecimento). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.

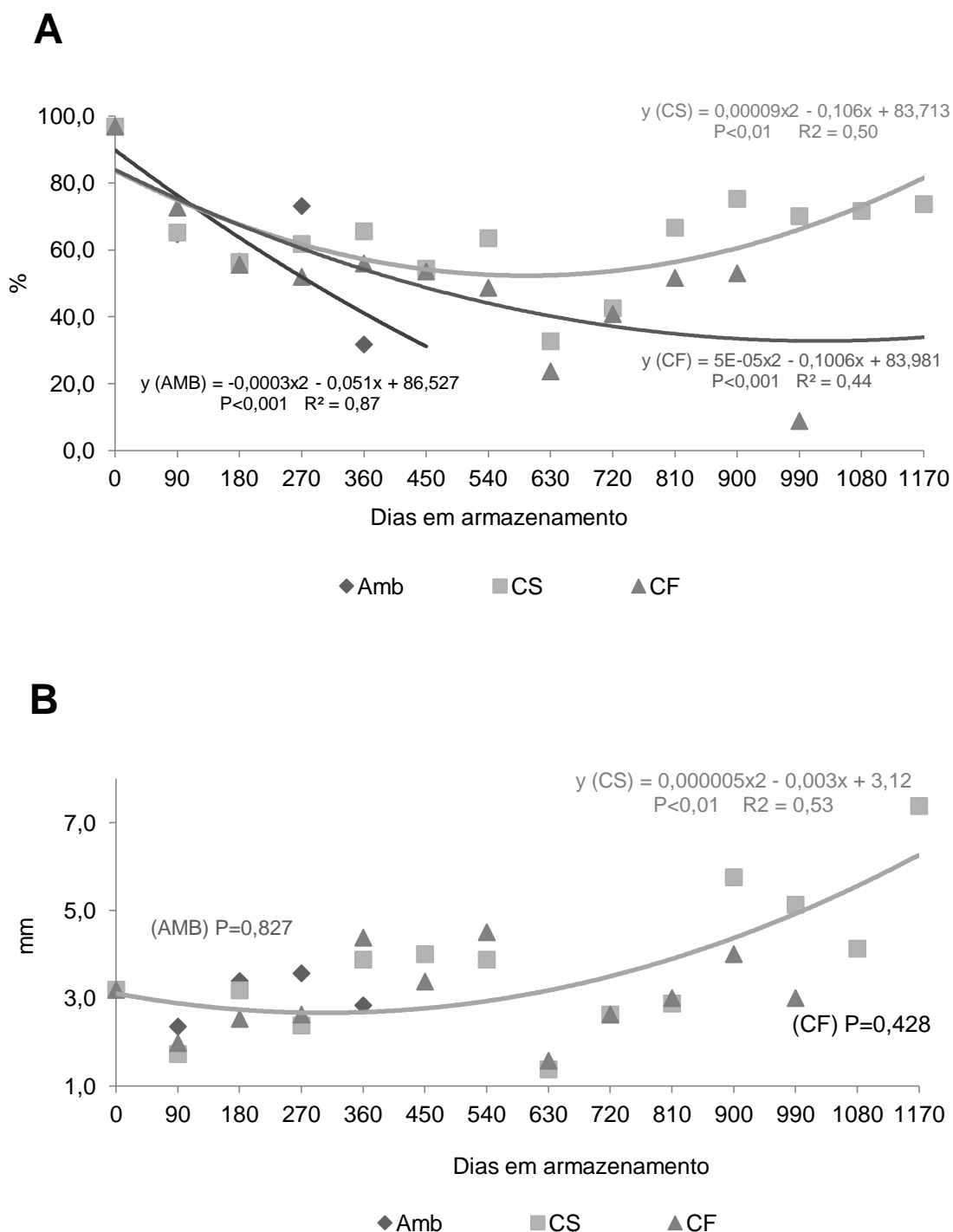


FIGURA 16. Viabilidade de sementes de *Butia odorata* ao longo do período de armazenamento em ambiente de laboratório (Amb), câmara fria (5 °C e 80% de umidade relativa do ar) (CF) e câmara seca (17 °C e 45% de umidade relativa do ar) (CS), testado através do desenvolvimento de embriões *in vitro* (A = Percentual de raízes visíveis em relação ao percentual de embriões desenvolvidos aos 25 dias após estabelecimento e B= Comprimento da raiz aos 25 dias após estabelecimento). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.

4.2 Superação de dormência em sementes de *Butia odorata* e *B. capitata*

Embora com diferentes tempos e condições de armazenamento, optou-se pela utilização dos cinco acessos a fim de testar a eficiência do método de superação de dormência, mesmo com materiais heterogêneos.

4.2.1 Germinação de sementes *in vitro*.

A abertura da cavidade embrionária facilitou significativamente a germinação, tanto quando testada a abertura parcial (AP), quanto total (AT) da cavidade embrionária. No tratamento com AT, observou-se germinação a partir do segundo dia após o estabelecimento. As sementes não escarificadas apresentaram índices de germinação muito baixos, independente da espécie. Contudo, a AP não foi suficiente para a máxima germinação, pois a AT permitiu índices acima de 90% em um tempo médio de 10 dias (Figura 17).

Também com AT, a grande maioria das sementes germinadas (93%) formou plântulas, com tempo médio de 29 dias (Tabela 9).

Os resultados foram muito semelhantes entre *B. capitata* e *B. odorata*. Houve diferença apenas no tempo médio de germinação e no índice de velocidade de formação das plântulas. Além de se tratar de espécies distintas, outro fator que pode ter influenciado é a diferença entre os tempos e ambientes de armazenamento dos diásporos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Fior; Lattuada e Schwarz, (2008) com germinação *in vitro* de embriões de *B. odorata* e *B. eriospatha*. Estes autores obtiveram 87 e 80% de germinação, respectivamente, indicando que estas duas espécies apresentam respostas muito semelhantes quanto ao desenvolvimento de embriões.

O meio de cultivo rico em umidade, nutrientes e temperatura constante não foram suficientes para que houvesse elevado percentual de germinação das sementes que não foram escarificadas, evidenciando a necessidade de tratamento de superação de dormência.

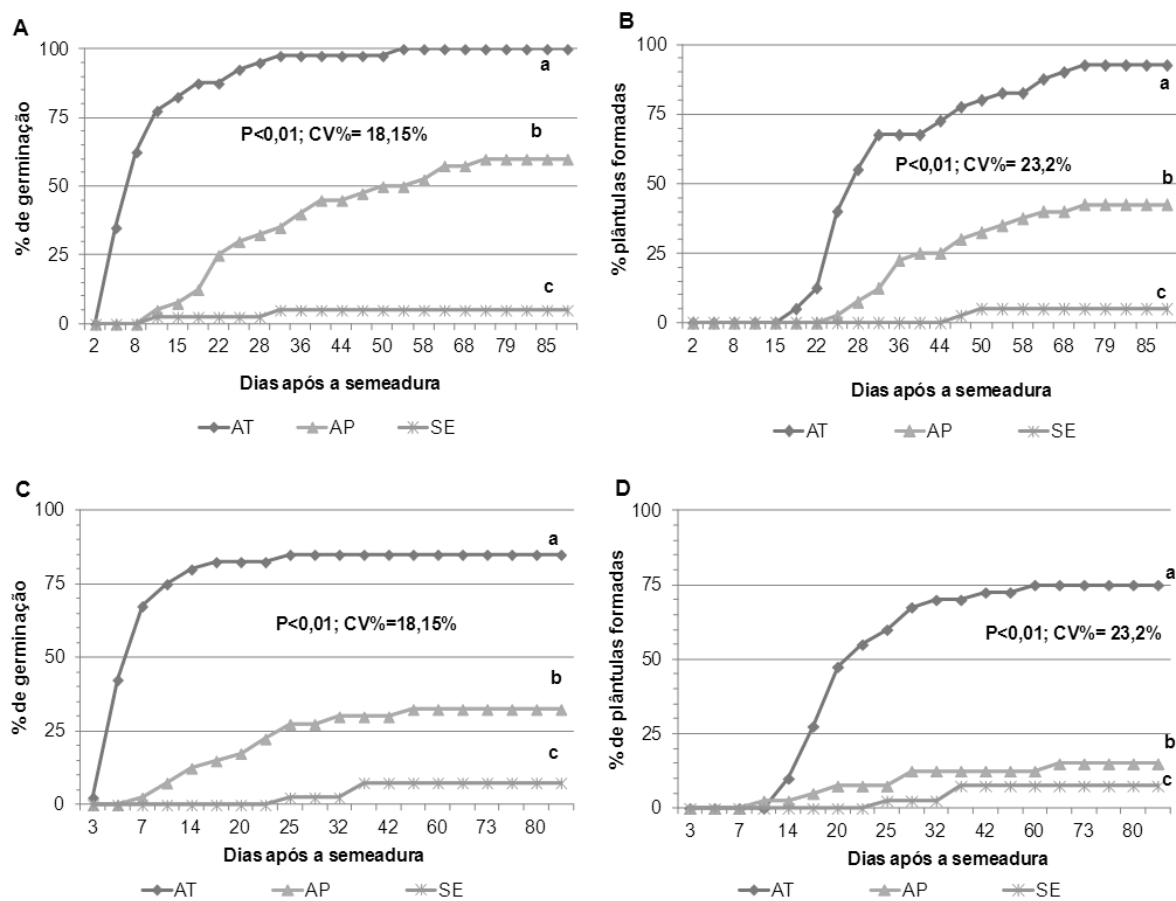


FIGURA 17. Germinação e formação de plântulas *in vitro* de *Butia odorata* coletados em Encruzilhada do Sul, RS (A e B) e *Butia capitata* coletados em Lontra, MG (C e D), cujas sementes foram submetidas aos tratamentos de escarificação. **SE**: sementes íntegras; **AP**: abertura parcial da cavidade embrionária através de corte do opérculo; e **AT**: abertura total da cavidade embrionária pela retirada total do opérculo. (Letras minúsculas diferentes acompanhando as linhas indicam diferença estatística significativa pelo teste de comparação de médias DMS a 5%). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.

Apesar do aumento relativo da germinação no tratamento AP, o fator principal relacionado à dormência das sementes não parece estar ligado à

impermeabilidade à água, e sim ao impedimento mecânico ao crescimento do embrião. A cavidade embrionária totalmente aberta possibilitou o desenvolvimento livre do embrião, resultando em maior percentual de germinação e menor tempo médio para a germinação.

TABELA 9. Formação de plântulas (%PI/G), tempo médio de germinação (TMG), tempo médio de formação de plântulas (TMP), índice de velocidade de germinação (IVG) e índice de formação de plântulas (IVP) de sementes de *Butia odorata* coletadas em Encruzilhada do Sul, RS (BO) e *B. capitata* em Lontra, MG (BC), submetidos a três tratamentos de escarificação das sementes, após 90 dias *in vitro*.

Espécie	Tratamento	%PI/G	TMG	IVG	TMP	IVP
BC	AT	91 a*	7,4 a	0,1615 a	23,5 a	0,0493 A
	AP	46 b	21,3 b	0,0610 b	29,0 a	0,0423 Ab
	SE	78 ab	32,4 b	0,0343 b	34,3 a	0,0307 B
BO	AT	93 a	11,6 a	0,1270 a	34,5 b	0,0333 A
	AP	75 b	31,4 b	0,0405 b	41,3 b	0,0265 Ab
	SE	100 ab	22,5 b	0,0570 b	48,5 b	0,0210 B
CV(%)		14,49	17,03	0,96	12,42	0,41
Valor	Espécie	0,090	0,146	0,066	<0,01	<0,01
P**	Tratamento	0,021	<0,01	<0,01	0,095	0,014

SE: sementes íntegras; AP: abertura parcial da cavidade embrionária através de corte do opérculo; e AT: abertura total da cavidade embrionária pela retirada total do opérculo.

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste DMS (5%).

** Graus de liberdade= Acesso: 1; Tratamento: 2; Erro: 20; Total: 23.

4.2.2 Germinação *in vivo* de sementes escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária.

Não houve diferença no percentual de germinação, bem como do número de plântulas formadas em relação às sementes germinadas, para os acessos das diferentes procedências (Tabela 10). O percentual de germinação médio dos acessos foi de 90%. Este percentual é muito semelhante ao resultado da germinação *in vitro*, confirmando que a AT também é eficiente em ambiente *in vivo*.

TABELA 10. Percentual de germinação (%G), tempo médio de germinação (TMG) e de formação das plântulas (TMP), índice de velocidade de germinação (IVG) e de formação das plântulas (IVP), percentual de plântulas formadas (%PI) e percentual de plântulas formadas em relação ao número de germinadas (PI%/G), de quatro acessos de *Butia odorata*, cujas sementes foram submetidas à abertura total da cavidade embrionária pela retirada do opérculo, e imediatamente estabelecidas em areia, e mantidas a 25°C constantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.

Acesso	% G	TMG	IVG	%PI	TMP	IVP	%PI/G
SM ¹	89,0	23,8	b ² 0,073 c	51,0 b	32,2	0,041 a	57,5
SV	93,8	9,5	a 0,133 ab	69,6 a	27,2	0,041 a	74,5
CH	94,0	9,2	a 0,146 a	73,0 a	29,3	0,041 a	77,3
ES	83,0	9,3	a 0,118 b	48,0 b	31,1	0,033 b	57,4
Valor P ³	0,1365	<0,01	<0,01	0,024	0,098	<0,01	0,066
CV(%)	7,7	22,01	10,02	19,79	9,1	6,55	18,18

¹Acessos: SM: Santa Maria, SV: Santa Vitória do Palmar, CH: Chuí e ES: Encruzilhada do Sul.

²Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5%.

³Graus de liberdade= Acesso: 3; Erro: 12; Total: 15

Houve diferença significativa entre acessos quanto aos tempos médios e índices de velocidade de germinação, bem como do número de plântulas formadas. Estas variáveis estão relacionadas ao vigor das sementes, sugerindo, portanto, maior vigor nas sementes dos acessos SV e CH, o que pode também indicar efeito da variabilidade característica da espécie.

Trabalhando com a espécie *B. capitata*, Lopes *et al.* (2011) semearam diásporos inteiros, sementes isoladas e diásporos inteiros com escarificação mecânica do poro maior, por onde, supostamente, iniciaria a germinação. Ao 51º dia após a semeadura, ocorreu início de germinação no tratamento em que o poro foi incisado, contudo, o percentual máximo de germinação foi de 11,25%, sendo que algumas sementes levaram mais de um ano para germinar. A imersão dos propágulos em solução de ácido giberélico 1000 ppm não teve efeito sobre a germinação. Comparando esses resultados aos do presente trabalho, uma vez

que a germinação *in vitro* evidenciou semelhança entre estas espécies, pode-se inferir que a escarificação utilizada por aqueles autores fora insuficiente para abertura da cavidade embrionária, no entanto, é possível que para algumas sementes, a escarificação realizada tenha permitido abertura suficiente para a maior permeabilidade, resultando em aumento moderado no percentual de germinação, semelhante ao resultado obtido para o tratamento com abertura parcial da cavidade embrionária no presente trabalho.

Pela classificação de Meerow (1991), a germinação de *B. odorata* pode ser classificada como do tipo remota, pois na germinação foi observado um distanciamento da plântula em relação à semente, em função do alongamento do pecíolo cotiledonar (Figura 18). Esta, possivelmente seja uma informação importante para melhor entendimento da dinâmica populacional e evolução da espécie. De acordo com Bernacci *et al.* (2008) a germinação remota observada em *S. romanzoffiana*, pode ajudar a explicar a ampla área de ocorrência da espécie, já que possibilita a penetração da plântula no solo, inclusive a sua gema apical, fornecendo resistência à desidratação. A germinação remota pode ter significado adaptativo para palmeiras com distribuição em áreas sujeitas à seca, ou em áreas afetadas por fogo ou outros distúrbios, pois o estabelecimento da plântula em maior profundidade a torna menos suscetível a estas adversidades (Tomlinson 1960 e Henderson *et al.* 1995, citados por Bernacci, 2008).

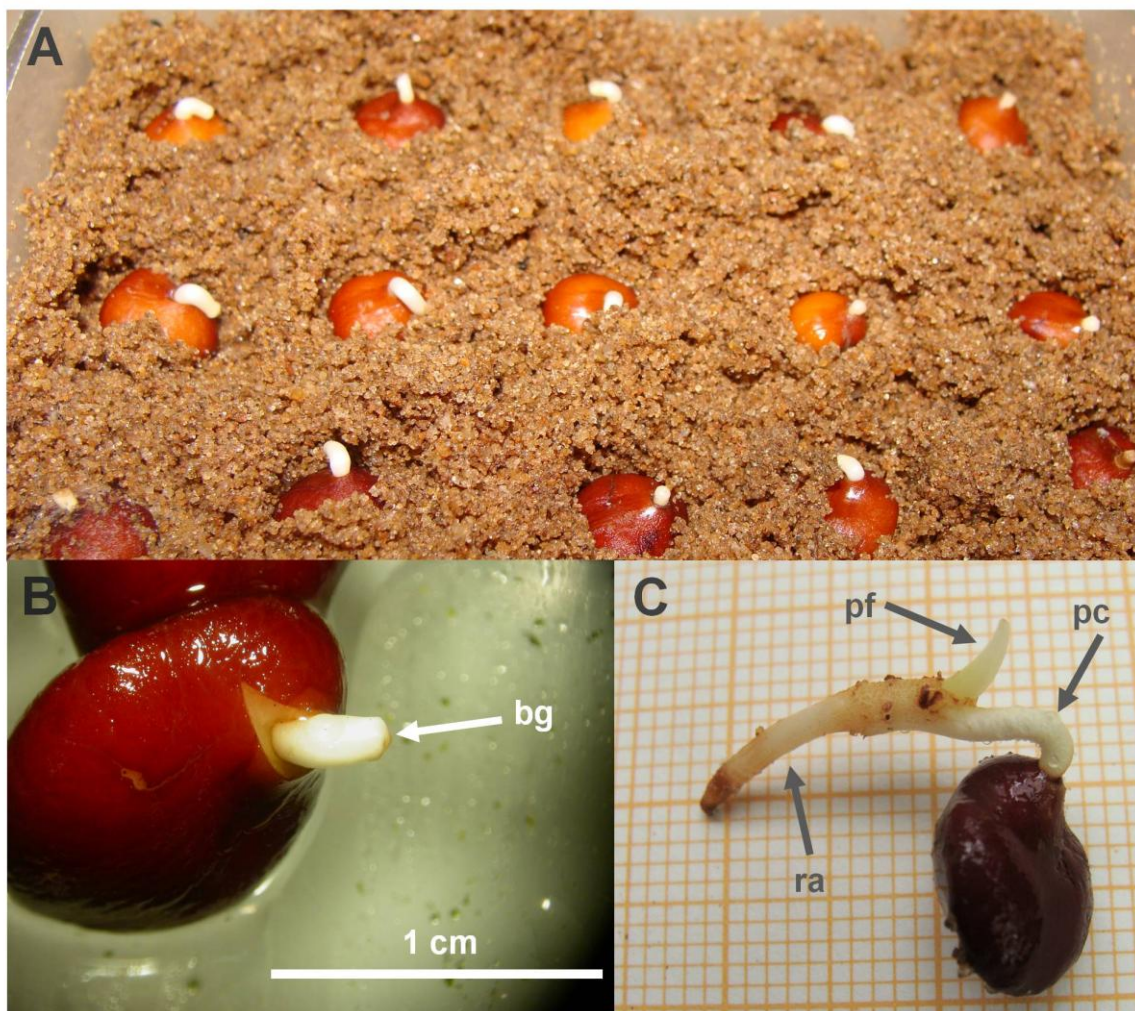


FIGURA 18. Aspectos da germinação e formação de plântula de *Butia odorata* a partir de sementes escarificadas pela abertura total da cavidade embrionária. **A**: Germinação em areia; **B**: Detalhe do alongamento do pecíolo cotiledonar aos oito dias após a semeadura (**bg**: botão germinativo); **C**: Plântula completa aos 32 dias após a semeadura (**pf**: primeira folha; **pc**: pecíolo cotiledonar; **ra**: radícula). FZB-RS, Porto Alegre, 2010.

4.2.3 Germinação *in vitro* de sementes escarificadas e embriões isolados.

Na ocasião da primeira avaliação, aos 13 dias, mais de 80% dos embriões e das sementes encontravam-se germinados. No entanto, as primeiras plântulas completas foram percebidas apenas entre os 23 e 60 dias após a semeadura. Ao final das avaliações, o percentual de germinação foi de 93,5%, em média, para ambos os tratamentos, sem diferença estatística entre eles. Resultado

semelhante foi encontrado para a variável formação de plântulas completas, com média de 68% para ambos os tratamentos (Figura 19).

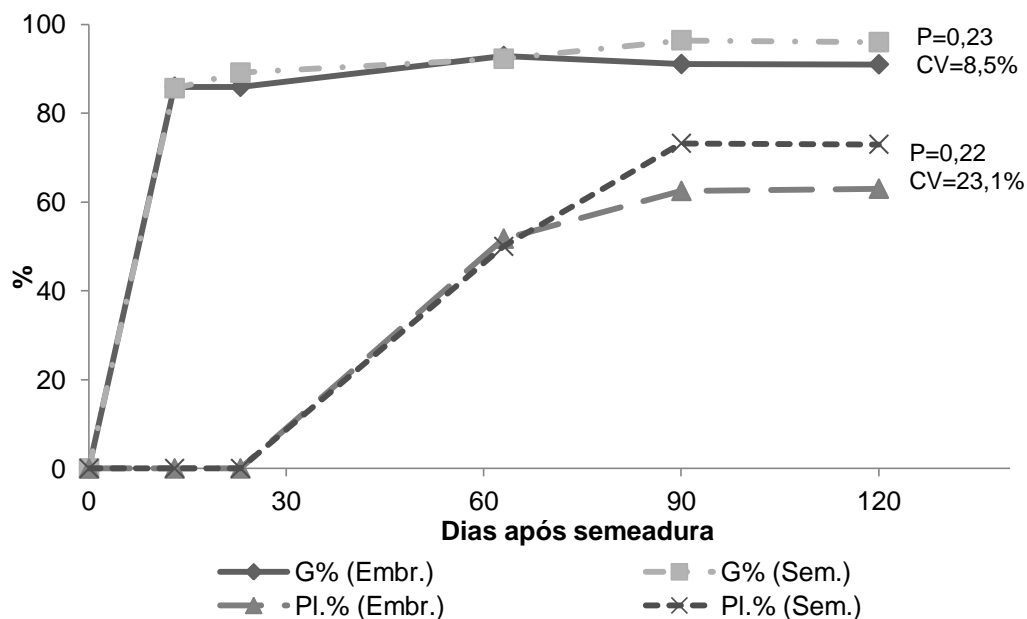


FIGURA 19. Percentual de germinação (G%) e formação de plântulas (PI%) de *Butia odorata* estabelecido *in vitro* a partir dos explantes: sementes escarificadas através da abertura total da cavidade embrionária (Sem) e embriões isolados (Embr.). Os valores P e CV ao lado das barras representam o resultado da ANOVA na comparação entre os explantes iniciais. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

Apesar da análise estatística não ter apontado diferença significativa para as variáveis analisadas, percebeu-se visualmente que as plântulas formadas no tratamento com sementes escarificadas apresentavam melhor aspecto, tanto pela expansão quanto pela coloração das folhas. Esta informação sugere que a composição do meio de cultivo utilizado para os testes não atendeu totalmente as demandas das plântulas, desfavorecendo as que nutriram-se exclusivamente do meio, ao contrário daquelas que permaneceram ligadas à semente, nutrindo-se, também, do endosperma. Apesar disso, evidenciou a possibilidade da utilização

do teste de isolamento de embrião para avaliar a viabilidade das sementes da espécie.

Em estudos posteriores, sugere-se que as avaliações sejam realizadas com intervalos de tempo mais reduzidos, a fim de permitir a comparação do vigor das plântulas, pois esta variável poderia confirmar as diferenças no aspecto visual observado entre os tratamentos deste estudo.

4.2.4 Efeito de procedimentos de superação de dormência na emergência de plântulas em casa de vegetação.

Com a abertura total da cavidade embrionária, a emergência das plântulas iniciou aos 24 dias após a semeadura, sendo que a emergência total foi de 72%, com tempo médio de 56 dias (Tabela 11 e Figura 20). No tratamento D-18h, o percentual de emergência foi igualmente alto, no entanto, o tempo médio foi bem maior. Já no tratamento D-40°C, houve resposta intermediária no percentual de emergência e tempo médio, quando comparado ao tratamento AT e aos demais. No tratamento SE, o percentual de emergência foi semelhante ao tratamento D-40°C, porém com tempo médio bem maior, semelhante ao tempo médio do tratamento D-18h.

A temperatura no interior da casa de vegetação manteve-se entre 10 °C a 24 °C nos meses de inverno e de 18°C a 42,6°C no verão, variando pouco em relação à temperatura do ambiente externo (Figura 21). Comparando-se os dados de emergência dos tratamentos SE, D-18h e D-40 °C com as temperaturas ambientais do período percebe-se que a maior emergência ocorreu após a elevação das temperaturas máximas, o que sugere que a elevação da temperatura teve efeito semelhante ao proporcionado pelo tratamento AT para a elevação do percentual de emergência, mas não para o tempo médio.

TABELA 11. Emergência de *Butia odorata* em casa de vegetação, a partir de diásporos coletados em Santa Maria, RS, submetidos a tratamentos de quebra de dormência: **SE**: sementes isoladas dos endocarpos, sem tratamento de escarificação; **AT**: sementes isoladas dos endocarpos, escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária; **D-18h**: diásporos inteiros, íntegros, mantidos submersos por 18 horas em água destilada antes da semeadura; e **D-40°C**: diásporos inteiros, com tratamento pré-semeadura de 3 semanas a 40°C. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.

Tratamento	Percentual de emergência	Tempo médio de emergência (dias)	Índice de velocidade de emergência
SE	38 b*	319,3 c	0,0040 c
AT	72 a	55,7 a	0,0233 a
D-18H	67 a	323,0 c	0,0031 c
D-40 °C	45 b	206,0 b	0,0069 b
CV(%)	20,56	5,73	10,39
Valor P	<0,01	<0,01	<0,01

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5%.

Em estudo realizado com *Pritchardia remota*, palmeira endêmica do Hawaii, a remoção do opérculo da semente reduziu pela metade o tempo médio de germinação. A associação da remoção do opérculo com imersão em ácido giberélico reduziu ainda mais o tempo de germinação dessa espécie (Pérez e Criley, 2008). Os autores consideram que há necessidade de condição favorável de umidade a fim de hidratar o embrião adequadamente para que seja possível o deslocamento natural do opérculo, o que explicaria o período de dormência relatado para a espécie, atribuindo, neste caso, dormência fisiológica às suas sementes. Este não parece ser o caso da espécie *B. odorata*, pois diante dos resultados do presente trabalho, verificou-se que mesmo hidratando os diásporos antes da semeadura e mantendo a umidade do substrato na sementeira, pode demorar muito para ocorrer a germinação, ou até mesmo não acontecer.

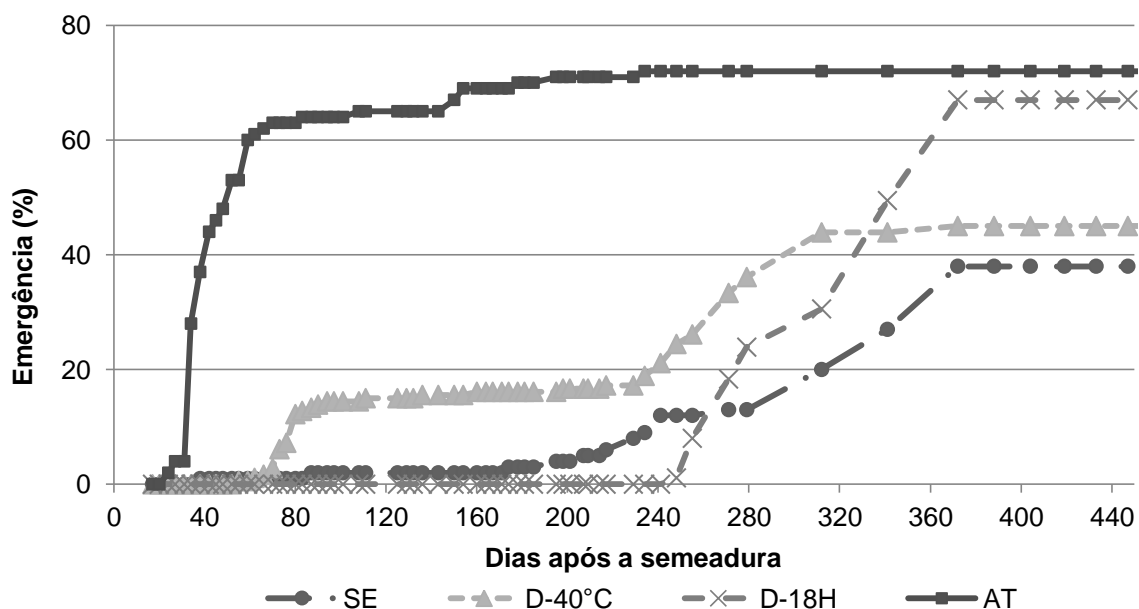


FIGURA 20. Emergência de plântulas de *Butia odorata* em casa de vegetação, a partir de diásporos coletados em Santa Maria, RS, submetidos aos tratamentos de superação de dormência: **SE**: sementes isoladas dos endocarpos, sem escarificação; **AT**: sementes isoladas dos endocarpos e escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária; **D-18h**: diásporos inteiros imersos por 18 horas em água destilada; e **D-40°C**: diásporos inteiros mantidos por três semanas a 40°C, seguidos de 25 °C constantes. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009.

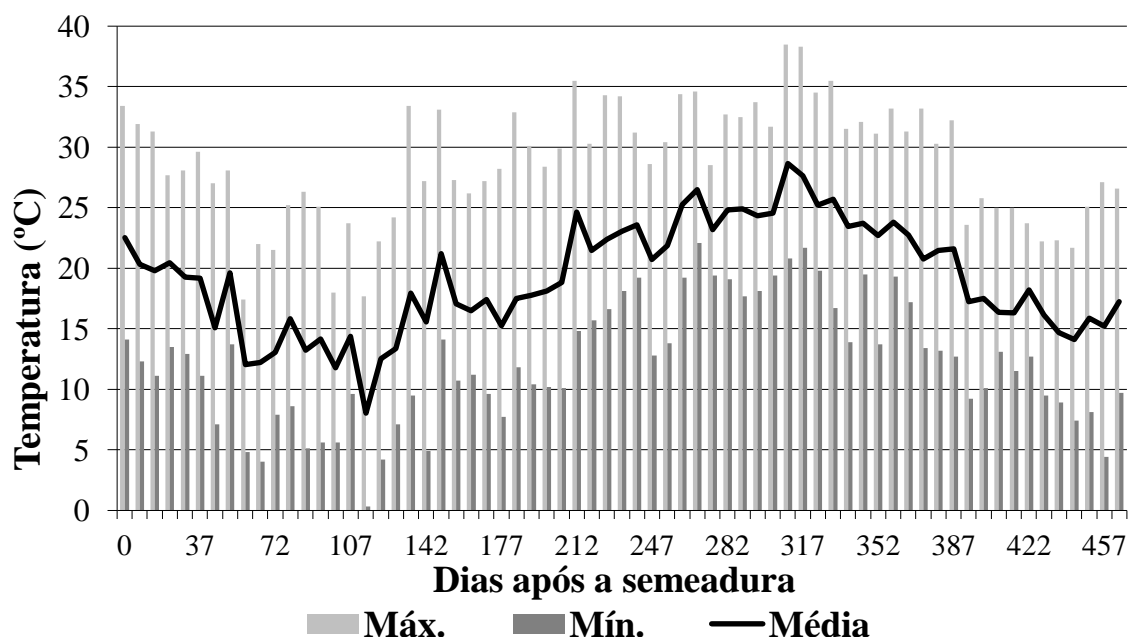


FIGURA 21. Temperaturas máximas e mínimas absolutas e médias semanais do ambiente junto à casa de vegetação onde foi conduzido o experimento de sementeira de *Butia odorata* (Dados obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (8º Distrito de Meteorologia - Porto Alegre, 2009).

4.2.5 Temperatura e germinação associadas à superação de dormência pela abertura da cavidade embrionária

De acordo com a análise dos resultados, as diferenças entre os tratamentos ocorreram apenas no tempo médio e no índice de velocidade de formação das plântulas, apresentando melhor resultado o regime térmico com temperatura alternada 20-30°C (Tabela 12).

TABELA 12. Germinação de *Butia odorata* em ambiente de germinador, com temperatura constante de 25 °C e alternada de 20-30 °C (16-8h, respectivamente), a partir de sementes escarificadas através da abertura mecânica da cavidade embrionária. %G: percentual de germinação; TMG: tempo médio de germinação (em dias); %PI: percentual de plântulas formadas; TMP: Tempo médio para formação de plântulas (em dias); IVGM: índice de velocidade de germinação; IVPM: índice de velocidade de formação de plântulas; e %PI/G: percentual de plântulas formadas sobre o total de sementes germinadas. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.

Temperatura	% G	TMG	IVGM	%PI	TMP	IVPM	%PI/G
25 °C	89,0	23,8	0,0729	51,0	32,2 b*	0,0408 b	57,5
20-30 °C	84,0	17,5	0,0928	47,0	21,6 a	0,0504 a	57,2
Valor P	0,586	0,063	0,06	0,618	<0,01	<0,01	0,98
CV(%)	14,22	18,94	17,67	21,98	10,26	7,41	24,47

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste DMS (5%).

Apesar do percentual de germinação ter sido elevado e o tempo médio relativamente curto (média de 86,5% e 20 dias, respectivamente), muitos embriões não sobreviveram até a fase de plântula, possivelmente devido à presença de fungos que se desenvolveram sobre as sementes na fase posterior à germinação. A visualização das colônias de fungos foi possível a partir dos doze dias após a semeadura. Sua ocorrência pode estar relacionada à desinfestação ineficiente das sementes e/ou do substrato. Contudo, este efeito foi semelhante em ambos os regimes térmicos, sem diferença estatística entre eles (média de

57,3% de plântulas sobre o número de sementes germinadas).

A retirada do opérculo da cavidade embrionária mostrou-se eficiente como tratamento de superação de dormência em sementes de *B. odorata* e *B. capitata*. Em todos os testes, os percentuais de germinação foram, em média, superiores a 84%.

Os resultados sugerem que as sementes dessa espécie não apresentam dormência relacionada ao embrião. Ao que tudo indica, a dormência está relacionada à barreira física imposta pelos tecidos da semente, o que dificulta o desenvolvimento do embrião na fase de germinação.

Comparando emergência em casa de vegetação sem controle de temperatura (variação entre 23 a 38 °C), Broschat (1998) verificou que sementes de *B. capitata* removidas do endocarpo apresentam resultados muito superiores, quando comparados com a semeadura de endocarpos inteiros, mesmo após o armazenamento destes por 150 dias a 23 °C. Neste sentido, Lopes *et al.* (2007) mencionaram que o endocarpo limita a absorção de água pelas sementes, sugerindo tratar-se de uma forma de dormência exógena, e que a remoção do endocarpo favorece a absorção de água. No entanto, quando Broschat (1998) comparou a emergência em condições controladas, sob 34 °C constantes, os percentuais de germinação foram igualmente baixos para sementes isoladas ou com endocarpos inteiros semeados logo após a coleta ou depois de 150 dias de armazenamento a 23 °C. Estes dados corroboram o presente trabalho, uma vez que a germinação de sementes isoladas dos endocarpos, porém sem escarificação, resultaram em percentuais de germinação muito baixos.

Carpenter (1988) e Schlindwein *et al.* (2007) demonstraram o efeito positivo da exposição de sementes de *B. capitata* e *B. odorata*, respectivamente, a temperaturas altas (próximas a 40 °C) em tratamento pré-semeadura, obtendo

elevados percentuais de germinação *in vivo*. Entretanto, Carpenter (1988) e Fior; Lattuada e Schwarz (2008) obtiveram entre 74 e 100% de germinação de embriões de *Butia* spp *in vitro*, em meio de cultivo sem fitorreguladores, sob temperatura de 25 °C. Estes resultados sugerem que a temperatura elevada não é determinante para o desenvolvimento do embrião, durante a germinação. Esta hipótese também foi levantada por Ribeiro *et al.* (2011) a partir de testes realizados com desenvolvimento *in vitro* de embriões de *B. capitata*. Estes autores concluíram que a dormência na espécie está relacionada com fatores externos ao embrião.

Da mesma forma, os resultados do presente estudo apontam para esta hipótese, pois os embriões das sementes recém colhidas mostraram-se aptos a germinar após a remoção do opérculo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sem que fosse necessário tratamento para superação de uma possível dormência do embrião.

Em função disso, pode-se inferir que a dormência das sementes de *B. odorata* classifica-se como exógena mecânica, conforme classificação de Baskin e Baskin (1998).

Relacionando estes resultados aos da literatura, pode-se estabelecer uma primeira hipótese quanto ao mecanismo de superação da dormência: períodos de temperaturas próximas a 40 °C, combinados com umidade na fase pré-semeadura, ou ao longo do período pós-semeadura, favorecem a degradação dos tecidos que compõem o opérculo, resultando na abertura da cavidade embrionária da semente e poro germinativo do caroço, o que permite o desenvolvimento do embrião.

Contudo, a partir de observações dos cortes longitudinais das sementes realizados logo após a coleta e depois de determinado tempo em armazenamento, pode ser considerada outra hipótese quanto ao mecanismo de

superação da dormência. Verificou-se que, com o passar do tempo há formação de uma câmara de ar (espaço vazio) na porção central do endosperma, a qual possui ligação com a cavidade embrionária. A formação desta “câmara” também foi observada em sementes recém coletadas submetidas a dessecação (dados não apresentados). Associando essa observação com as informações relacionadas ao efeito positivo de um curto período de armazenamento e a secagem das sementes sobre a germinação e emergência de *Butia spp* (Carpenter, 1988 e Schlindwein *et al.*, 2007, respectivamente), chega-se à seguinte hipótese: em ambiente com elevação acentuada de temperatura ao longo do dia, que no Rio Grande do Sul ocorre em maior intensidade a partir do final da primavera, há ciclos diários bem acentuados de variação térmica devido a diferença de temperatura entre o dia e a noite. Esta variação repetitiva pode influenciar diretamente a pressão no interior da semente, principalmente devido à presença da referida câmara de ar. Essa pressão, associada a determinado grau de umidade da semente, pode provocar o deslocamento do opérculo, abrindo a cavidade embrionária e favorecendo o livre crescimento do embrião. Sugere-se, portanto, que esta hipótese seja testada através de equipamentos que permitam variação de pressão sobre as sementes no ambiente da sementeira, sem alteração da temperatura.

Apesar de eficiente na superação da dormência de *B. odorata*, o método de abertura mecânica da cavidade embrionária é um processo trabalhoso e oneroso para um sistema de produção comercial de mudas. Como alternativa, devem ser testadas substâncias, como enzimas, por exemplo, que degradem as camadas de tecidos envolvidas na constituição do opérculo, mesmo sem isolamento das sementes dos endocarpos, o que facilitaria o processo e dispensaria várias etapas, desonerando a produção de mudas. Salienta-se,

portanto, a necessidade de estudos histológicos que permitam identificar a composição dos tecidos celulares que compõe o opérculo, distinguindo-o do embrião, para então definir possíveis substâncias a serem utilizadas para sua degradação, mantendo-se íntegros os tecidos essenciais para a germinação e desenvolvimento da plântula.

4.3 Classificação das sementes de *Butia odorata* quanto ao comportamento fisiológico

4.3.1 Análise de viabilidade após dessecação e conservação em temperatura sub-zero

A umidade dos diásporos logo após a coleta foi de 19%, enquanto que das sementes isoladas foi 10%, evidenciando maior concentração de umidade nos tecidos do endocarpo, quando comparado com os tecidos da semente. Após dez dias expostos ao ambiente, a umidade dos diásporos reduziu em cerca de oito pontos percentuais, enquanto que das sementes a redução foi inferior a três pontos, sendo que ambos diferiram estatisticamente da umidade no ponto de coleta. Estes índices não diferiram dos obtidos após quatro meses de armazenamento em condições não controladas, provavelmente pela relação de equilíbrio entre o potencial hídrico do diásporo e o do ambiente alcançado já nos primeiros dez dias em que foram expostos. Este equilíbrio mantém o teor de umidade em níveis relativamente estáveis, com exceção de pequenas variações provocadas pela diferença de umidade do próprio ambiente (Figura 22).

O armazenamento em temperatura negativa provocou a redução do teor de água dos tecidos do endocarpo, mas não da semente. Possivelmente isso se deveu ao baixo potencial hídrico que ocorre em ambiente de temperatura

negativa, provocando a desidratação dos tecidos do endocarpo.

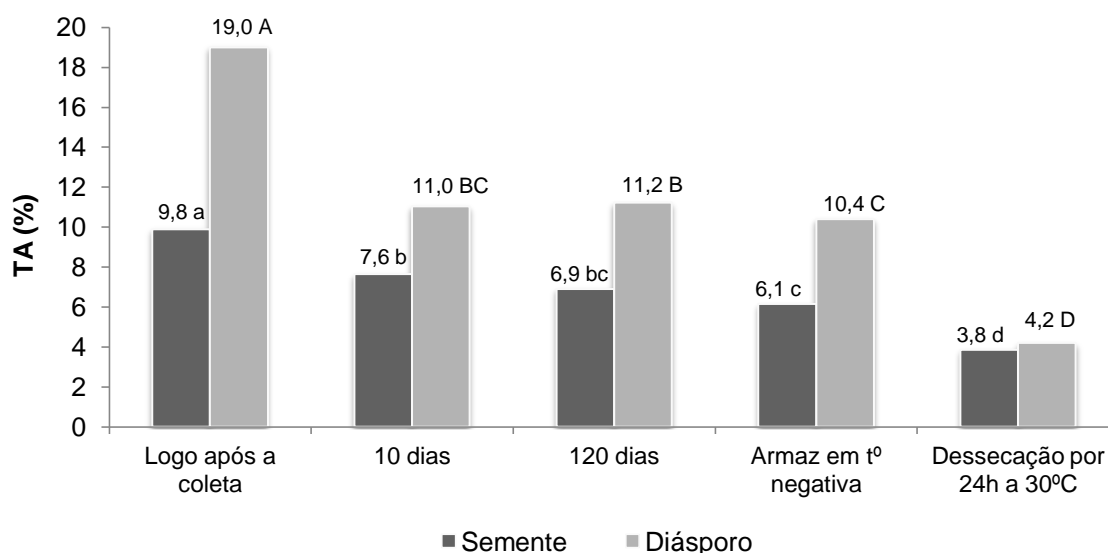


FIGURA 22. Teor de água de diásporos inteiros e de sementes isoladas de *Butia odorata* logo após a coleta; após dez dias em ambiente de laboratório; após 120 dias em ambiente de laboratório; após 120 dias em ambiente de laboratório seguido de 120 dias sob temperatura negativa; e após 120 dias em ambiente de laboratório seguido de 24h em estufa com circulação de ar forçada a 30 °C constantes. Médias seguidas de letras minúsculas para sementes e maiúsculas para diásporos, não diferem estatisticamente pelo teste DMS (5%). FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2011.

A temperatura de 30 °C por 24 horas sob ventilação forçada provocou a redução do teor de água a níveis bastante baixos. Semelhante aos demais tratamentos, a redução da umidade da semente foi proporcionalmente inferior à do endocarpo, o que pode ocorrer devido à barreira física imposta pelos tecidos dessa parte do fruto em relação à semente, ou ainda ao maior percentual de lipídios nos tecidos do endosperma, se comparado aos do endocarpo, o que dificultaria a desidratação.

A germinação das sementes do tratamento controle e das armazenadas em temperatura negativa foram elevadas, sem diferença estatística entre elas. O mesmo aconteceu com o percentual de plântulas completas formadas, sendo, em

média, de 95% de germinação e 68% de formação de plântulas (Figura 23).

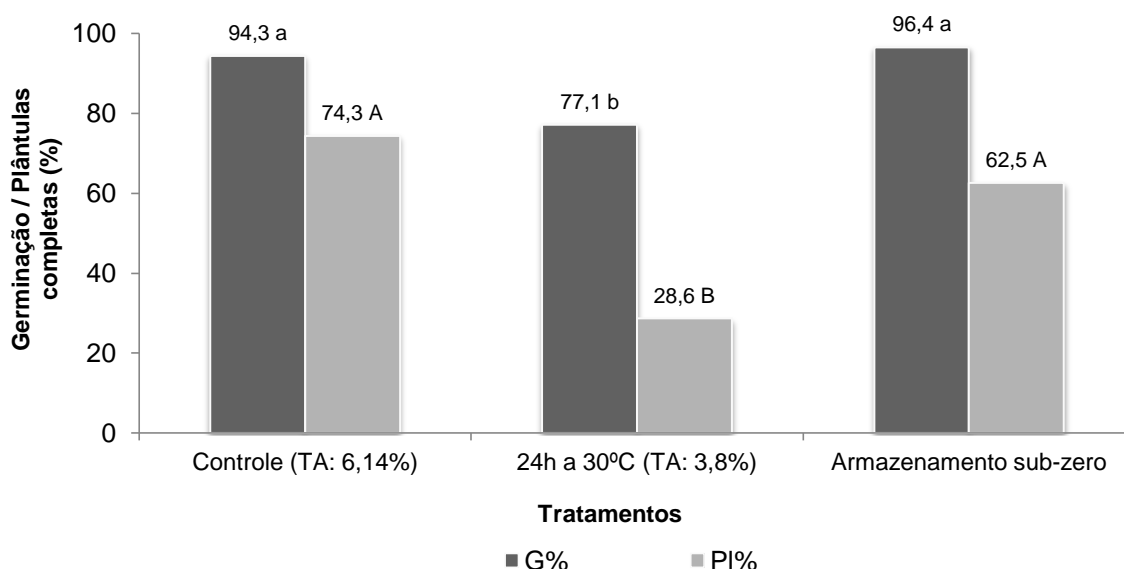


FIGURA 23. Germinação (G%) e formação de plântulas completas (PI%) a partir de sementes de *Butia odorata* escarificadas pelo método de abertura total da cavidade embrionária, após armazenadas em ambiente de laboratório por 120 dias (teor de água de **6,14%**)(controle); após armazenadas em ambiente de laboratório por 120 dias seguido de 24h em estufa com circulação de ar forçada a 30 °C constantes (teor de água de **3,8%**); e seguido de 120 dias sob temperatura negativa (**sub-zero**). Médias seguidas de letras minúsculas para G% e maiúsculas para PI% não diferem estatisticamente pelo teste DMS (5%). FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2011.

A dessecação das sementes provocou redução significativa da viabilidade para ambas as variáveis analisadas. Ainda assim, o percentual de germinação foi relativamente elevado. Contudo, a dessecação parece ter afetado regiões específicas do embrião, inviabilizando a formação de plântulas completas, cujo percentual foi inferior a 29%. Assim, pode-se inferir que a faixa de umidade crítica para sementes de *B. odorata* situa-se entre 3,8 e 6%.

A título de comparação entre areáceas, a espécie *Euterpe oleracea*, cujas sementes apresentam comportamento típico recalcitrante, apresentou faixa de umidade considerada letal em torno de 20% (Martins *et al.* 1999).

Os resultados do presente trabalho, comparados à bibliografia disponível sobre classificação do comportamento fisiológico de sementes, indicam que *Butia odorata* pode ter suas sementes classificadas como intermediárias. Porém, os resultados do presente trabalho não descartam a possibilidade de classificação como ortodoxa, pois a umidade das sementes do tratamento controle (6,1%), no qual ocorreu germinação de 95%, está muito próxima à sugerida por Hong e Ellis (1996) que é de 5%, o que poderia distinguir sementes ortodoxas de intermediárias, desde que, nessa condição, não fosse prejudicada a germinação.

Ainda como exemplo, em trabalhos com *Bactris gasipaes*, palmeira com sementes consideradas recalcitrantes, a germinação inicial foi superior a 60%, com umidade das sementes entre 38 e 47%. Quando as sementes tiveram sua umidade reduzida para índices entre 23 a 28% houve redução significativa na germinação e vigor, tendo sido classificada esta faixa de umidade como crítica para a espécie. Quando a umidade foi reduzida para a faixa entre 12 e 14% não houve germinação, sendo esta a faixa tida como letal. Estes autores verificaram que entre os lotes trabalhados houve diferença em relação à germinação e ao vigor das sementes, e em relação à sensibilidade à desidratação, indicando que essas características são influenciadas pela colheita e manuseio das sementes, pelas condições climáticas de cultivo e, possivelmente, por componente genético (Bovi; Martins e Spiering, 2004).

Martins *et al.*, (2009) coletaram três lotes de frutos de *Euterpe edulis* em diferentes épocas do ano, tendo o teor de água das sementes variado de 46 a 49%. Após secagem destas sementes até 48, 43 e 39% (três sublotes) foram armazenadas no escuro a 10°C e submetidas a testes periódicos de viabilidade. Os autores concluíram que a germinação e o vigor das sementes são prejudicados pela secagem parcial e pelo aumento do tempo de armazenamento,

de forma diferenciada entre as épocas de produção. Este fator, segundo os autores, depende diretamente da condição climática do período que compreende o desenvolvimento e maturação dos frutos. De acordo com os resultados, sementes coletadas de frutos que desenvolveram-se em período com temperaturas mais amenas e/ou déficit hídrico apresentam menor longevidade, mesmo que o percentual de germinação seja igualmente alto no ponto de coleta.

Carpenter e Ostmark (1994) testaram intensidades de dessecação e temperaturas de armazenamento de quatro espécies de *Chamaedorea*. A umidade inicial das sementes foi de 20, 36, 15 e 25% para *Chamaedorea elegans*, *C. microspadix*, *C. radicalis* e *C. seifrizii*, respectivamente. Após a dessecação, a redução do percentual de germinação em relação ao conteúdo de água das sementes foi bastante variável entre as espécies, inclusive para a faixa de umidade considerada letal. *Chamaedorea elegans* não germinou quando a umidade foi reduzida a menos de 13%, enquanto que *Chamaedorea microspadix*, embora tenha apresentado o maior conteúdo inicial de água, permaneceu com 59% de germinação quando a umidade das sementes foi reduzida para 8,6%. Variações semelhantes foram observadas sob armazenamento por 10 dias a temperaturas sub-zero. Enquanto que *Chamaedorea radicalis* apresentou cerca de 30% de germinação após armazenamento a -20 °C, *Chamaedorea seifrizii* não germinou com qualquer temperatura abaixo de zero.

Apesar de preliminares, os resultados do presente estudo sugerem que sementes de *B. odorata* apresentam comportamento ortodoxo. O fato de o armazenamento em temperatura negativa por quatro meses não ter afetado significativamente a viabilidade das sementes caracterizam este tipo de comportamento. A dessecação das sementes sem a perda da viabilidade confirmaria a possibilidade desta classificação, no entanto, a redução do

percentual de umidade a 3,8% pode ter sido excessiva e inviabilizado parte dos embriões. Em estudos posteriores, sugere-se que a redução da umidade pela dessecação não reduza o teor de água a menos de 5%. Ou ainda, que a dessecação seja feita através de metodologia que permita a diminuição gradual em período prolongado, o que pode evitar o dano fisiológico provocado pela desidratação acelerada. Desta forma, é possível que a perda de viabilidade não ocorra como no presente trabalho.

4.4 Enraizamento *in vitro* de plântulas de *B. odorata*

4.4.1 Concentrações de ANA no meio de cultivo

As plântulas de *B. odorata* germinadas a partir de embriões zigóticos isolados, mantidas *in vitro* até o crescimento da parte aérea em tamanho adequado para a aclimatização, apresentam um sistema radicular formado por raízes pouco numerosas, mas com comprimento bastante variável, muitas delas com 6 e 8 cm. A aclimatização de plântulas com essa conformação é bastante dificultada, a menos que as raízes sejam cortadas, o que, segundo Meerow e Broschat (2010), não é indicado para palmeiras. Além disso, de acordo com Asemota; Eke e Odewale (2007), o estabelecimento de um sistema radicular efetivo para plantas produzidas *in vitro* é essencial para o sucesso posterior durante aclimatização de mudas às condições autotróficas.

No presente estudo, a sobrevivência das plantas ao final do período da execução do experimento foi bastante elevada, variando de 97 a 100% de sobrevivência, com média geral de 98,8% (Tabela 13).

TABELA 13. Enraizamento *in vitro* de plântulas de *Butia odorata* submetidas a meio de cultivo com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

	Vivas (%)	Com formação de calo (%)	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento de raízes (mm)	Comprimento de folhas (mm)	Massa Fresca (mg)
Transformação	*	Raiz (x+100)	Asen (Raiz (x/100))	Raiz (x+1)	Raiz (x)	-	-
Valor P (Concentrações)	>0,2	<0,001	<0,001	<0,001	0,466	0,028	<0,001
Valor P (Idade das plânt.)	1	0,122	<0,001	0,415	0,044	0,001	0,042
Interação	-	0,711	0,071	0,051	0,06	0,140	0,395
Média Geral	98,8	8,6	72	2,08	1,16	7,01	830
GL do Erro	-	92	92	92	87	92	92
CV (%)	-	4,44	27,52	16,94	22,55	17,77	23,31

* Análise não-paramétrica (teste de Friedman)

Sem a presença de ANA no meio (tratamento controle) o percentual de plântulas enraizadas foi de 43%, com média geral de 1,36 raiz por plântula. Resultados semelhantes foram obtidos por Nizam e Te-Chato (2009) em um experimento com enraizamento *in vitro* de *Elaeis guineensis*. Conforme esses autores, em meios sem fitorregulador, formou-se apenas uma raiz pequena em cada muda.

A adição de ANA independente da concentração apresentou resposta positiva em relação ao percentual de plântulas enraizadas, número de raízes formadas, comprimento das folhas e massa fresca das plântulas, o que indica que esse fitorregulador estimula a morfogênese em *B. odorata*.

Nos tratamentos com auxina foi verificada a formação de calos na base das plântulas. O percentual de plântulas com calo foi proporcional à concentração de auxina no meio, tendo superado 20% das plântulas no tratamento com $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Em todas as plantas com calo, havia também raízes bem desenvolvidas e em número significativamente superior ao tratamento testemunha.

As concentrações de auxina testadas estimularam a formação de raízes nas plântulas. A média de plântulas enraizadas nos meios com ANA foi de 79%. De acordo com a análise de regressão, o percentual de enraizamento apresentou uma tendência quadrática significativa em resposta à concentração de ANA no meio, tendo como tratamento de maior média a concentração de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$. No entanto, pela equação da regressão, o ponto de maior resposta para essa variável foi $0,82 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. (Figuras 24).

Resultados semelhantes foram obtidos por Badawy *et al.* (2005) em trabalhos com enraizamento *in vitro* de *Phoenix dactylifera*. Contudo, para essa espécie a concentração que apresentou respostas superiores foi $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Os autores sugerem que essa concentração pode ter sido a mais vantajosa

para a formação de raízes para a espécie por promover a divisão celular do câmbio vascular de maneira mais efetiva e, conseqüentemente, viabilizar a formação das raízes.

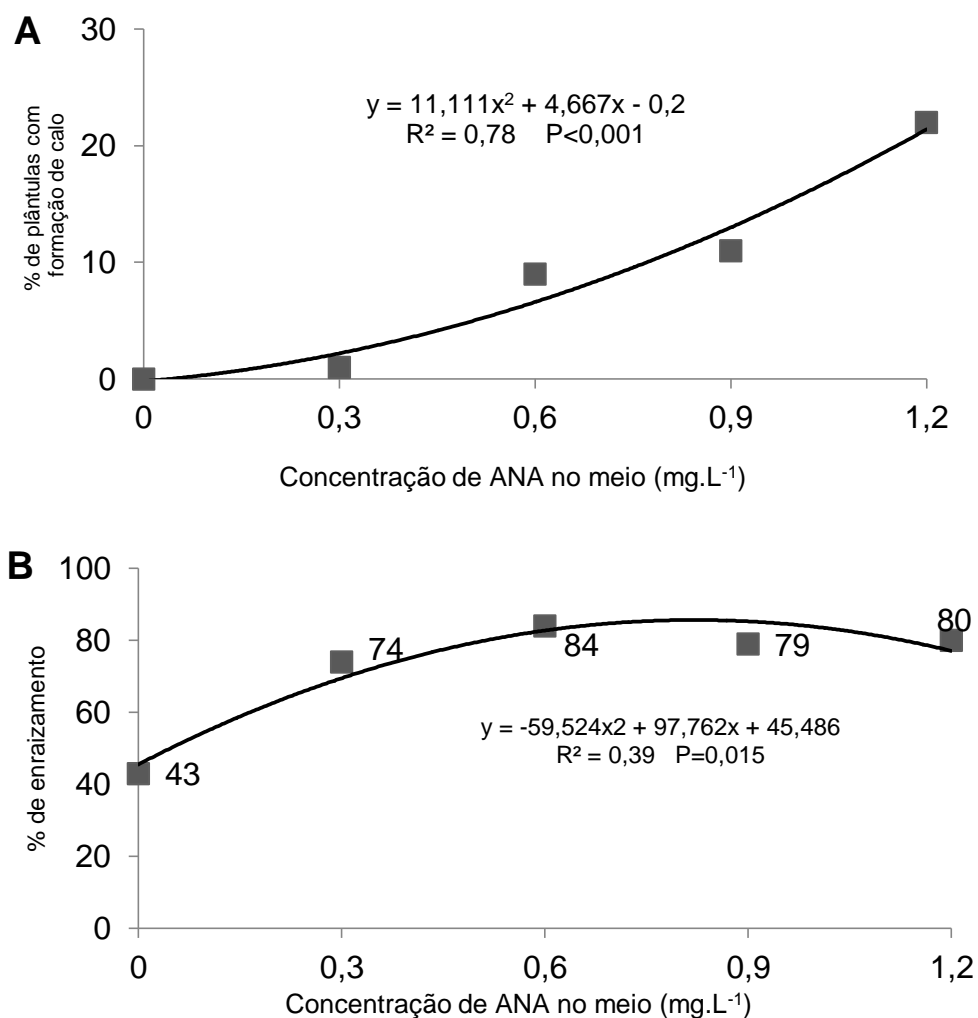


FIGURA 24. Enraizamento *in vitro* de plântulas de *Butia odorata* submetidas a meios de cultivo com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (A: percentual de plântulas com formação de calo e B: percentual de plântulas enraizadas). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Para algumas variáveis houve diferença significativa entre as idades das plantas no momento da instalação do experimento. Plântulas com idade de 180 e 360 dias *in vitro* apresentaram maior percentual de enraizamento. O maior comprimento médio foi obtido em plântulas com idade de 90 dias e a massa

fresca foi superior nas plântulas com 180 dias. Ainda assim, salienta-se a necessidade de novas investigações sobre estas variáveis apontadas.

Não houve interação significativa entre a idade das plântulas e a concentração de auxina no meio.

Apesar de a análise da variância ter apontado diferença significativa entre as concentrações de ANA para as variáveis número de raízes por planta e comprimento das folhas, a análise de regressão não teve significância estatística, tanto linear como quadrática. Interpreta-se, portanto, que para estas variáveis a presença de ANA foi favorável, mas sem variação significativa entre as concentrações testadas.

Através da análise de correlação verificou-se significância positiva entre a variável massa fresca das plântulas com: o comprimento das folhas, o número de raízes, o percentual de plântulas enraizadas e o percentual de plântulas com calo (Tabela 14). Esta relação é esperada, uma vez que a maior expressão das estruturas desenvolvidas pelas plântulas acarreta em maior massa das mesmas (Figura 26).

Também foi constatada correlação positiva entre o comprimento de folhas e o número de raízes, o que indica que as plântulas com maior formação de raízes também apresentaram crescimento maior da parte aérea. Esta informação é importante, uma vez que para a aclimatização, há necessidade de que as mudas apresentem desenvolvimento satisfatório também da parte aérea.

Conforme constatado (Tabela 13), o comprimento das raízes não teve incremento em função da presença de ANA no meio. Este resultado pode ser favorável sob o ponto de vista da preparação da muda para aclimatização, pois mudas com parte aérea bem desenvolvida e raízes numerosas e curtas podem ser mais vantajosas por facilitar o estabelecimento no substrato de aclimatização

(Figura 25). Contudo, há necessidade de mais informações a respeito, principalmente em relação à resposta ao ambiente de aclimatização e, conseqüentemente, sobrevivência.

TABELA 14. Análise de correlação das variáveis respostas no experimento de enraizamento *in vitro* de plântulas de *Butia odorata*, em meio de cultivo com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.

	Comprimento das folhas	Comprimento das raízes	Nº de raízes	Enraizamento (%)	Plantas com calo (%)
Massa Fresca	0,64**	0,14ns	0,75**	0,49*	0,75**
Compr. Folhas		0,07ns	0,52*	0,39ns	0,34ns
Compr. Raízes			0,25ns	-0,25ns	-0,014ns
Nº de Raízes				0,27ns	0,33ns
Enraizam. (%)					0,32ns

* Significativo a 5% de probabilidade de erro; **Significativo a 1%.

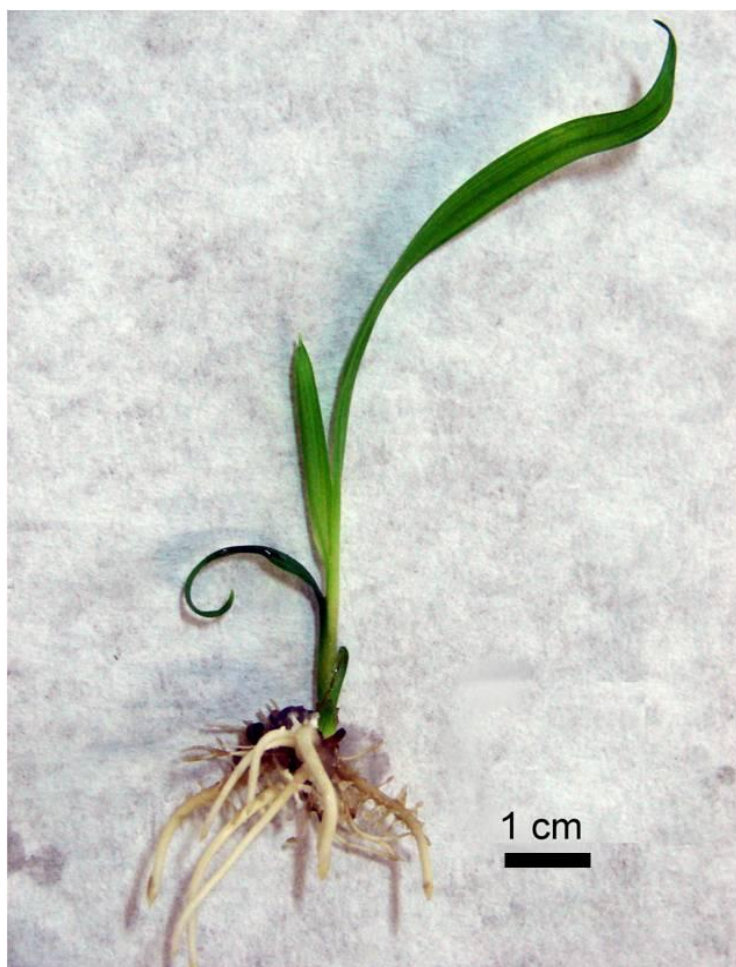


FIGURA 25. Plântula de *Butia odorata* enraizada *in vitro* em meio de cultivo com $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

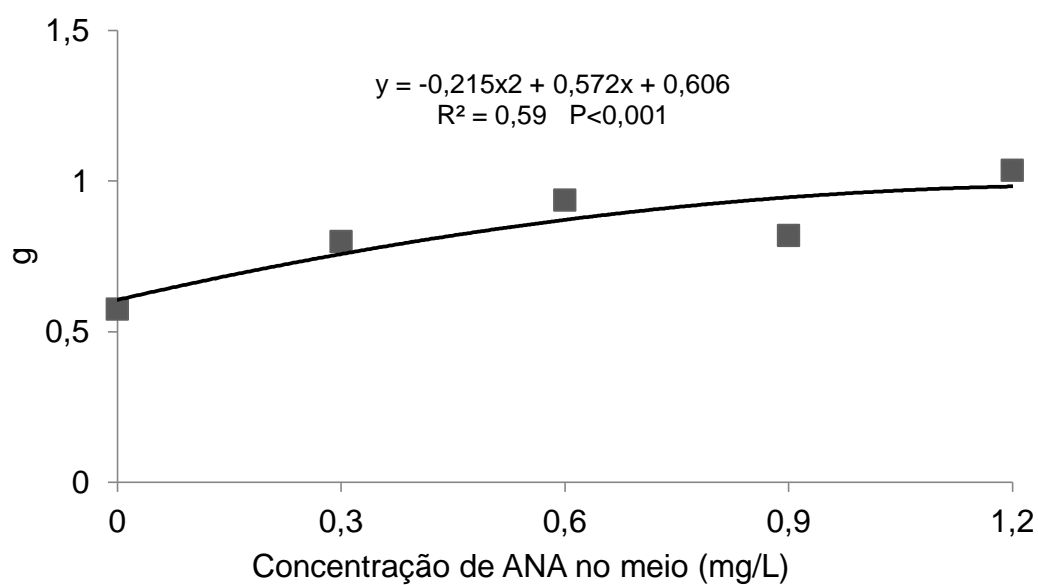


FIGURA 26. Massa fresca das plântulas de *Butia odorata* enraizadas *in vitro* em meios de cultivo com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

4.4.2 Concentrações de sacarose no meio de cultivo

Uma vez verificada a concentração de ANA adequada para o enraizamento das plântulas *in vitro*, surgiu a necessidade de investigar o efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo, uma vez que informações da literatura sugerem que concentrações mais elevadas, em comparação à usual para o meio MS, por exemplo, são mais favoráveis para o enraizamento *in vitro* de palmeiras (Badawy *et al.*, 2005; Léo *et al.*, 2007).

Ao final do período de acompanhamento constatou-se 100% de sobrevivência das plântulas, independentemente da concentração de sacarose no meio.

Os dados correspondentes às variáveis percentual de plântulas enraizadas, percentual de plântulas com calo e número de raízes por plântula não apresentaram distribuição normal, mesmo mediante transformações. Portanto, estas variáveis foram analisadas através da ANOVA não-paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 15).

O percentual de enraizamento diferiu entre as concentrações de sacarose. No tratamento com 15 g.L⁻¹ ocorreu o enraizamento de 80% das plântulas, o que foi estatisticamente inferior às duas outras concentrações, que apresentaram 100% de enraizamento. Ao que os resultados indicam 15 g.L⁻¹ de sacarose é uma concentração subótima para o enraizamento das plântulas. Resposta semelhante foi verificada para a variável massa fresca, embora possa estar apenas refletindo a menor massa das plântulas que não emitiram raízes.

TABELA 15. Enraizamento *in vitro* de plântulas de *Butia odorata* em meio de cultivo com 0,6 mg.L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de sacarose. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.

Trat (g.L ⁻¹ sacarose)	Vivas (%)	Plântulas com calo (%)	C/ folhas Senescentes (%)	Enraizamento (%)	Nº de raízes por plântula	Compr. das raízes (cm)	Compr. das folhas (cm)	Massa fresca (g/plântula)
15	100	8,89	4,44	80 b*	2,32	0,81 c	4,88 c	0,726 b
30	100	6,67	2,22	100 a	3,02	2,13 b	5,39 b	1,032 a
45	100	2,22	0,00	100 a	2,98	3,26 a	5,96 a	1,092 a
Análise	-	----- ANOVA não-paramétrica** -----			----- ANOVA paramétrica -----			
Média	100	5,93	2,22	93,33	2,77	2,07	5,41	0,95
Valor P	-	0,456	0,338	<0,01	0,096	<0,01	0,048	<0,01
CV (%)	-	-	-	-	26,3	29,18	17,18	23,95
GL Erro	-	-	-	-	24	24	24	24

*Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste DMS (5%). **Teste Kruskal-Wallis;

Outra variável que apresentou resultado superior em maiores concentrações de sacarose foi o comprimento das raízes, cujo incremento foi diretamente proporcional à concentração de sacarose utilizada.

O número de raízes não foi alterado significativamente em relação ao aumento de concentração de sacarose no meio, o que indica que, na faixa de concentração testada, não há alteração sobre a rizogênese em plântulas de *B. odorata in vitro*.

Em algumas plântulas foram observadas folhas em processo de senescência, com coloração amarelada e parte necrosada. O percentual médio de plântulas com essa condição foi bastante baixo, não chegando a 5% no tratamento onde foi mais intenso. Contudo, a análise não-paramétrica não apontou diferença significativa para esta variável.

Também foi verificada a formação de calo na base de algumas plântulas, independentemente da concentração de sacarose. Porém, estes calos apresentavam tamanho reduzido e não impediram a formação das raízes, pois, havia plântulas com calo, com e sem raízes.

A presença de uma fonte de carbono e energia no meio de cultivo é essencial para o crescimento das plantas, visto que a fotossíntese é limitada *in vitro*. Dentre essas fontes, a sacarose é a mais utilizada nos meios nutritivos (Cid e Teixeira, 2010). No entanto, é possível que a sacarose tenha apresentado variação nas respostas de algumas variáveis no presente estudo não apenas por sua propriedade de carboidrato, mas também pela sua importante função de regulação osmótica que realiza no meio, controlando a relação de hidratação dos tecidos.

Um estudo de Novero *et al.* (2010) com a espécie *Metroxylon sagu* indicou favorecimento no desenvolvimento dos tecidos em meio com elevada

concentração de sacarose, ou em combinação com sacarose e sorbitol. Os autores atribuíram o maior desenvolvimento dos tecidos ao baixo potencial osmótico imposto ao meio pela elevada concentração de solutos.

A amplitude na quantidade de sacarose utilizada em meios nutritivos é bastante elevada e depende de vários fatores. As concentrações mais altas são geralmente utilizadas em trabalhos com embriões, indução de bulbilhos ou na tuberização de raízes de mandioca (Cid e Teixeira, 2010). Porém, resultados têm demonstrado que para diversas espécies de palmeiras, concentrações de sacarose acima de 30 g.L^{-1} , que é a mais usual, têm apresentado resultados superiores. Um exemplo importante é o trabalho de Nizam e Te-Chato (2009), no qual o enraizamento *in vitro* de mudas de *Elaeis guineensis* ocorreu de forma satisfatória em meio WPM com 72 g.L^{-1} . Outro trabalho que reforça essa informação é o estudo de enraizamento de plântulas de coqueiro-anão desenvolvido por Léo *et al.* (2007), onde foram utilizados 40 g.L^{-1} de sacarose em meio Y3 (Eeuwens, 1976) suplementado com 1 mg.L^{-1} de ANA, $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e 0,25% de carvão ativado.

4.4.3 Ajuste da concentração de ANA

Ao analisar os resultados dos dois primeiros experimentos foi considerada a hipótese que a combinações entre os tratamentos de ambos os estudos poderia resultar em respostas diferentes às daqueles trabalhos. Por isso, para o presente experimento, foi combinada a concentração de sacarose a 45 g.L^{-1} , com pequenas variações na concentração de ANA.

A sobrevivência das plântulas foi igualmente elevada, sem diferença estatística entre os tratamentos, com média geral de 97,7%. Também não houve diferença significativa para as variáveis percentual de plântulas enraizadas,

comprimento das raízes e massa fresca das plântulas, com médias 77,8%, 2,47 cm e 1,63g, respectivamente (Tabela 16).

O número de raízes por plântula teve influência direta da concentração de auxina testada. A equação de regressão indica uma relação direta crescente entre esta variável e a concentração de ANA no meio (Figura 27).

O comprimento das folhas também diferiu entre os tratamentos, porém com resposta inversamente proporcional à concentração de auxina do meio. Contudo, mesmo na concentração mais baixa de ANA, o desenvolvimento das folhas foi bastante expressivo, com média entre 4,88 e 6,5 cm, nos tratamentos com menor e maior desenvolvimento, respectivamente (Figura 27).

Melo *et al.* (2001) testaram as auxinas AIB e ANA a 1 mg.L^{-1} no enraizamento *in vitro* de plântulas de *Syagrus oleraceae* (guarirobeira) em meio MS com 3% de sacarose. O ANA mostrou-se mais eficiente possibilitando maior comprimento das raízes, massa da matéria fresca e seca. Contudo, os autores constataram que nas variáveis correspondentes ao desenvolvimento da parte aérea não houve benefício com o uso das auxinas. Estes resultados se assemelham aos do presente estudo, pois não foi constatada diferença para esta variável no primeiro experimento, enquanto que no terceiro, em maior concentração de auxina houve desenvolvimento de plântulas com menor comprimento das folhas.

O percentual de plântulas com calo e de plântulas com folhas senescentes foram influenciados pela concentração de ANA no meio. Conforme o aumento da concentração, também aumentou a expressão destas duas variáveis. Possivelmente o processo que desencadeia a calogênese também altera o metabolismo dos tecidos foliares, provocando a senescência. Esse resultado ilustra a informação sobre o efeito de interação que ocorre entre a auxina e o

etileno no metabolismo vegetal, pois, segundo Taiz e Zeiger (2004), o etileno parece ser o principal regulador do processo de abscisão foliar, com a auxina agindo como um supressor do efeito do etileno. Entretanto, concentrações supraótimas de auxina estimulam a produção de etileno, desencadeando o processo de senescência foliar, o que provavelmente tenha ocorrido nesse estudo, pois a presença de calos em regiões da plântula onde naturalmente há formação exclusiva de raízes indica algum desbalanço hormonal, nesse caso, o desequilíbrio em favor da auxina.

Comparando as análises de correlação do primeiro com o terceiro experimento, onde foram testadas concentrações de ANA, verifica-se que, para a maioria das variáveis, as correlações diferem de um experimento para o outro (Tabelas 14 e 17). Como exemplo, no primeiro experimento, onde a concentração de sacarose do meio foi 2%, houve correlação positiva entre massa fresca e comprimento de folhas; número de raízes; e plantas com calo, no entanto, no terceiro experimento, em meio com 4,5% de sacarose, estas variáveis não apresentaram correlação. Situação semelhante foi verificada entre as variáveis: número de raízes e percentual de enraizamento; número de raízes e comprimento de folhas. Verifica-se, portanto, respostas morfogênicas distintas em diferentes relações de ANA: sacarose.

Em um experimento com enraizamento *in vitro* de *Phoenix dactylifera*, Badawy *et al.* (2005) constataram que o número e o comprimento das raízes aumentou proporcionalmente à concentração de ANA (de 0,1; até 1,5 mg.L⁻¹). Com 1,5 mg.L⁻¹ de ANA houve formação de 2,5 raízes por planta, com comprimento médio de 3,0 cm. No entanto, a elevação do ANA para 4,5 mg.L⁻¹ reduziu significativamente, tanto o número de raízes quanto o comprimento.

TABELA 16: Análise de variância dos dados das avaliações das plântulas de *Butia odorata* submetidas a enraizamento *in vitro* em meio de cultivo com 45 g.L⁻¹ de sacarose e ácido naftalenoacético a 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L⁻¹. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.

Conc. ANA (mg.L ⁻¹)	Bloco	Pl. vivas (%)	C/ calo (%)	C/ folhas senescentes (%)	Enraiz. (%)	Nº de raízes/pl.	Compr das raízes (cm)	Compr. das folhas (cm)	Massa Fresca (g)
0,3	1	100,0	12,0	4,0	68,0	3,0	2,23	6,42	1,356
0,3	2	100,0	28,0	0,0	76,0	3,1	2,32	5,96	1,536
0,3	3	100,0	20,0	4,0	96,0	2,5	2,56	7,11	1,838
0,6	1	92,0	32,0	20,0	68,0	3,8	2,29	4,57	1,856
0,6	2	100,0	32,0	8,0	64,0	2,6	2,34	4,08	1,188
0,6	3	92,0	40,0	12,0	80,0	3,8	2,37	5,41	1,554
0,9	1	95,0	45,0	25,0	80,0	4,6	3,02	4,60	1,940
0,9	2	100,0	40,0	28,0	76,0	5,0	2,18	5,02	1,542
0,9	3	100,0	48,0	16,0	92,0	4,8	2,70	5,02	1,822
Transf. dos dados		-	Raiz (x+10)	Raiz (x+10)	-	-	-	-	-
Valor P (Trat)		0,606	<0,001	<0,001	0,650	<0,001	0,539	<0,001	0,412
Valor P (Bloco)		0,403	0,315	0,485	0,051	0,925	0,594	0,315	0,183
Média Geral		97,7	33	13	77,8	3,7	2,44	5,35	1,626
CV (%)		22,0	19,13	28,49	24,49	31,09	30,07	19,13	28,39
GL Erro		38	38	38	38	37	38	38	38

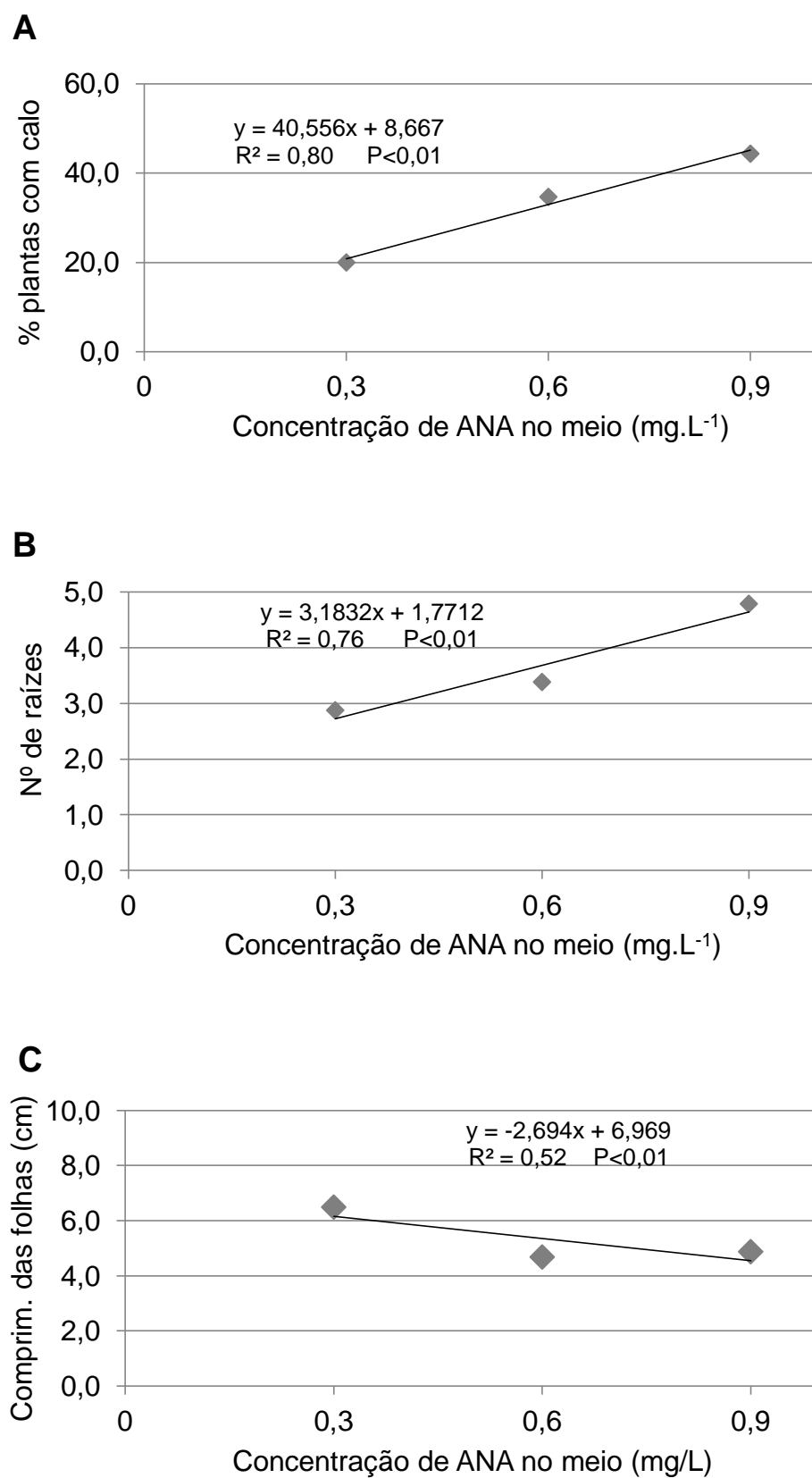


FIGURA 27. Enraizamento de plântulas de *Butia odorata in vitro* em meio de cultivo com 45 g.L⁻¹ de sacarose e ácido naftalenoacético a 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L⁻¹. A: plantas com calo; B: número de raízes e C: comprimento de folhas. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

TABELA 17. Análise de correlação das variáveis avaliadas em plântulas de *Butia odorata* submetidas a enraizamento *in vitro* em meio de cultivo com 45 g.L⁻¹ de sacarose e ácido naftalenoacético a 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L⁻¹. FZB-RS, Porto Alegre, 2009.

	Compr. folhas	Compr. raízes	Nº de raízes	Enraizam. (%)	Plânt. c/ folhas senescentes	Plântulas. c/ calo
Massa fresca	0,06 ^{ns}	0,65*	0,46 ^{ns}	0,63*	0,43 ^{ns}	0,38 ^{ns}
Compr. folhas		-0,13 ^{ns}	-0,44 ^{ns}	0,47 ^{ns}	-0,61*	-0,679**
Compr. raízes			0,31 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,48 ^{ns}
Nº de raízes				0,19 ^{ns}	0,86***	0,79**
Enraiz. (%)					-0,01 ^{ns}	0,24 ^{ns}
Pl. c/ folhas senescentes						0,71**

ns: não significativo; * significativo a 10%; ** significativo a 5%; e *** significativo a 1%.

Nizam e Te-Chato (2009) submeteram mudas de *Elais guineensis* obtidas a partir de folhas jovens de plantas adultas a meios MS, MS diluído e WPM com diferentes concentrações dos fitorreguladores ANA e paclobutrazol (PBZ). Além de proliferação de brotações, os autores verificaram que na combinação de concentrações 6 mg.L⁻¹ de ANA e 9 mg.L⁻¹ de PBZ ocorreu formação de numerosas raízes em 88% dos explantes.

Comparando os três experimentos, constata-se que a concentração de auxina não influenciou a variável comprimento das raízes. No entanto, com relação a concentrações de sacarose, foram verificadas respostas diferenciadas para essa variável. Ou seja, a resposta ocorreu diretamente proporcional ao aumento da concentração.

Parece haver uma forte relação entre a quantidade de sacarose disponível no meio de cultivo e o desenvolvimento de raízes em palmeiras. Em experimentos com *Phoenix dactylifera*, Badawy *et al.* (2005) obtiveram respostas superiores na formação de raízes com concentrações de sacarose entre 30 e 40 g.L⁻¹. Com 20 g.L⁻¹ ocorreu a formação de raízes com o menor comprimento em relação às

demais concentrações. As raízes mais longas foram formadas em plantas cultivadas em meio com 40 g.L⁻¹ de sacarose. Quando utilizadas 50 g.L⁻¹ o crescimento da parte aérea foi menos intenso em comparação ao registrado em 30 e 40 g.L⁻¹. Embora tratando-se de espécies distintas, estes resultados são muito similares aos encontrados no presente estudo, pois foi observada relação semelhante para a variável comprimento de folhas em meio com variações na concentração de sacarose.(Tabela 15).

Asemota; Eke e Odewale (2007) sugerem que há favorecimento no desenvolvimento de raízes de palmeiras *in vitro* quando são associadas doses elevadas de sacarose e ANA no meio de cultivo. Segundo esses autores, a rizogênese é promovida quando ocorre uma interação entre ANA e sacarose.

Em estudos futuros sugere-se a ampliação das concentrações de auxina, combinada com sacarose em concentração acima de 3%. Além disso, a adição de carvão ativado ao meio de cultivo também deve ser testada, pois é possível que esse componente beneficie o enraizamento e desenvolvimento de plântulas *in vitro*. Lédo *et al.* (2007) ressaltaram a importância do carvão ativado para a fase de enraizamento de plântulas de coqueiro-anão pelo efeito do sombreamento da região onde está ocorrendo a formação do sistema radicular.

Diante do exposto, foi possível concluir que plântulas de *B. odorata* podem ser enraizadas *in vitro* em meio de cultivo com a auxina ANA em concentrações de sacarose entre 3 e 4,5%.

4.5 Testes preliminares visando à embriogênese somática em *Butia odorata*

4.5.1 Calogênese em embriões zigóticos

Os percentuais de contaminação em ambos os experimentos foram inferiores a 2%, e houve somente ocorrência de fungos. Assim como nos demais experimentos onde foram utilizados embriões zigóticos como explantes, a contaminação foi bastante baixa. Esta é uma característica importante da espécie, e o maior aproveitamento dos explantes isentos de contaminação facilita números estudos em cultivo *in vitro*, sem a necessidade de maiores precauções em relação à desinfestação pré-incubação.

Na primeira avaliação, aos 15 dias, a maioria dos embriões apresentava início de formação de calos, caracterizados pela coloração clara, de maneira geral, a levemente escurecida na região de contato com o meio de cultivo. Nessa avaliação, percebia-se maior desenvolvimento dos explantes estabelecidos nos meios com as maiores concentrações de 2,4-D.

Na avaliação realizada aos 40 dias, a análise da variância não apontou diferença significativa para o percentual de embriões desenvolvidos em ambos os testes, com média geral de 80% ($P > 0,3$). Os 20% restantes apresentavam-se muito semelhantes, em cor e formato, à ocasião da inoculação, com a diferença de um leve aumento no volume.

Em concentrações mais altas de 2,4-D ocorreu maior formação de calo, tanto em percentual quanto em diâmetro. A tendência linear ascendente para estas variáveis, em função da concentração do fitorregulador, foi significativa para ambos os experimentos. Nas maiores concentrações testadas, 100% dos embriões formaram calo, com diâmetro de cerca de 10 mm (Figuras 28 e 29).

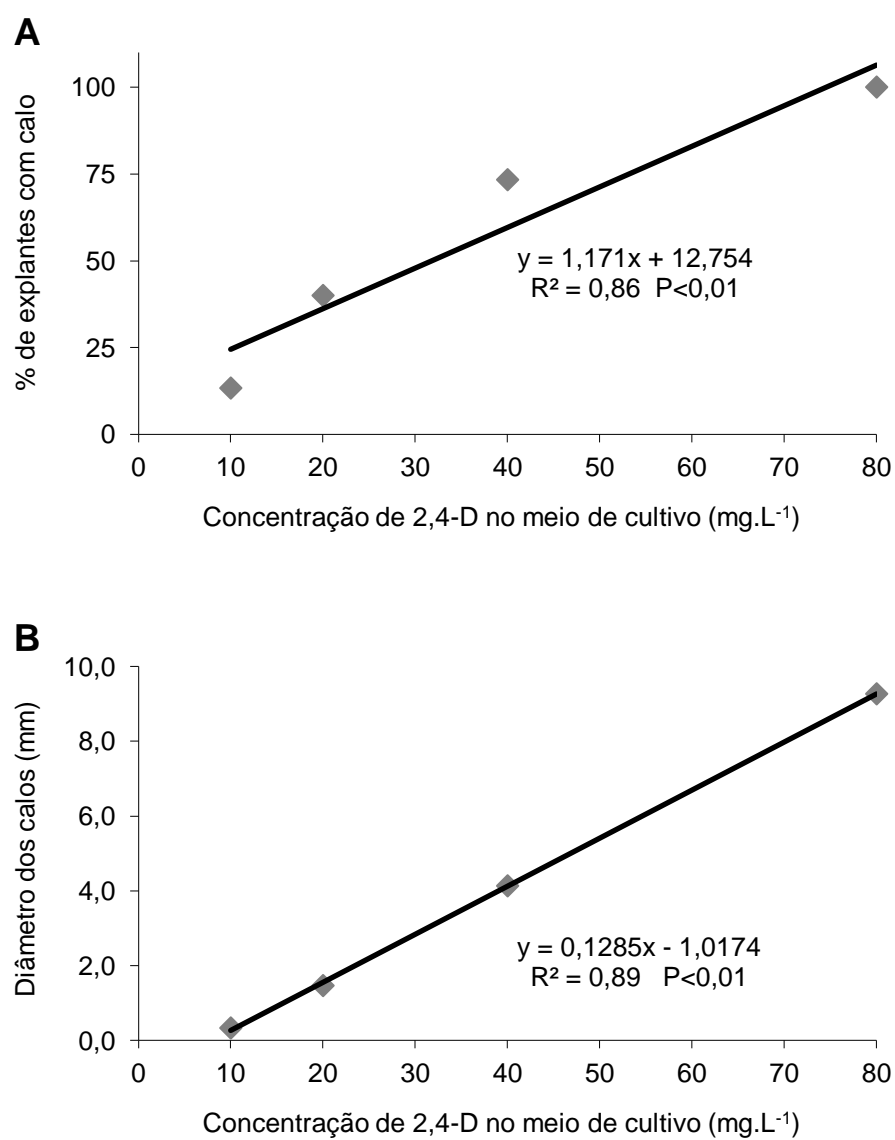


FIGURA 28. Percentual de explantes com calo (A) e diâmetro médio de calos (B) em embriões zigóticos de *Butia odorata* cultivados em meio MS com 2 mg.L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de 2,4-D. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

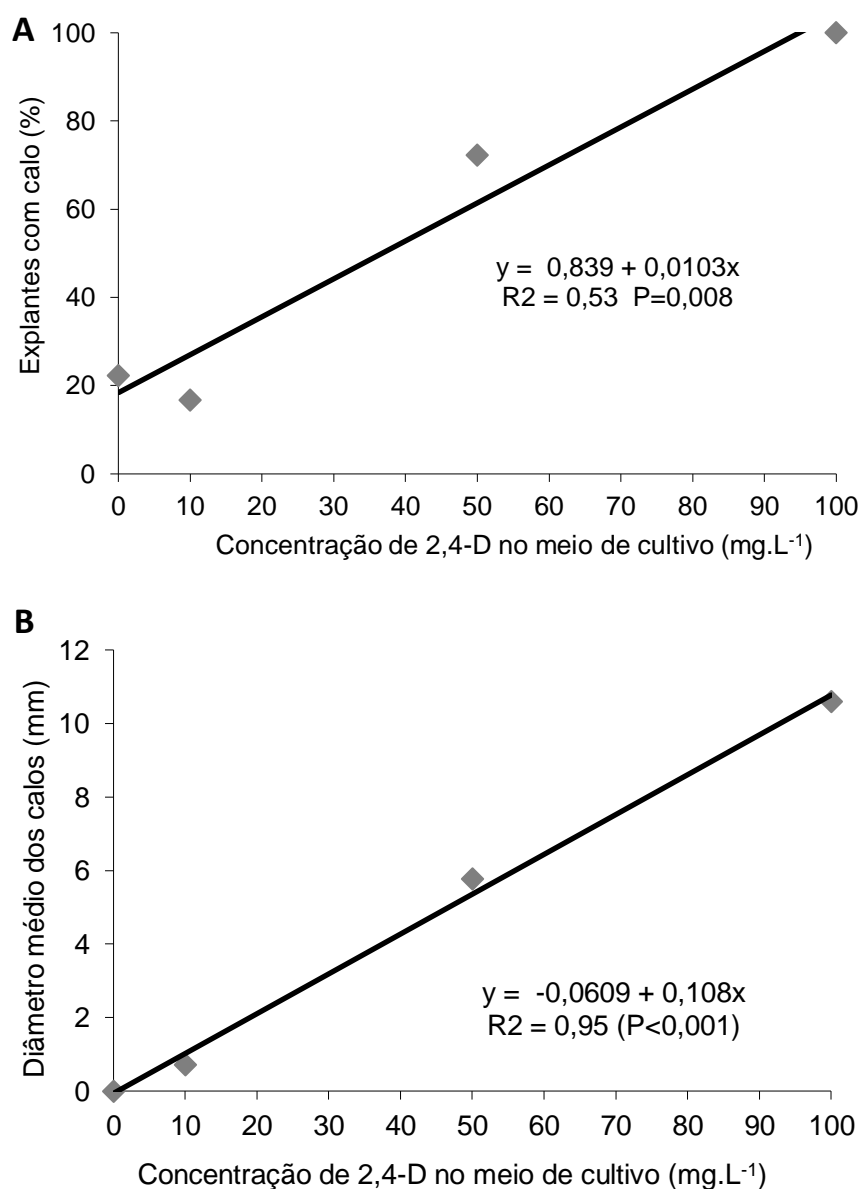


FIGURA 29. Percentual de explantes com calo (A) e diâmetro médio dos calos (B) em embriões zigóticos de *Butia odorata* cultivados em meio MS + 2 g.L⁻¹ de carvão ativado e diferentes concentrações de 2,4-D. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2008.

Na avaliação aos 40 dias, no primeiro experimento, foi verificada a formação de raízes sobre os calos nos meios com as concentrações de 40 e 80 mg.L⁻¹. Alguns desses calos formaram de 4 a 6 raízes cada. Não havia sinal de formação de parte aérea, ou estruturas embriogênicas.

Verdeil *et al.* (1992) isolaram calos de tecidos de *Cocos nucifera* aos seis

meses em cultivo contínuo em meio rico em 2,4-D (concentrações próximas a 80 mg.L⁻¹). A indução à embriogênese nesses tecidos ocorreu de duas formas. Em uma delas, segundo os autores, a origem foi multicelular, a partir de estruturas meristemáticas epidérmicas, surgindo na superfície de alguns calos. Esta via leva a formação, muitas vezes, de embriões incompletos ou mal formados. A formação de raízes de formato e número incomum ocorrida em *B. odorata* no presente trabalho pode estar associada a essa origem, o que explicaria em parte os resultados observados. Outra possível causa seria a condição ambiental, principalmente o fator presença de luz, que pode ter interferido na diferenciação celular, impedindo a formação de embriões e dando origem às raízes.

Contudo, esses dados apontam semelhança da espécie *B. odorata* com outras palmeiras estudadas, no que condiz às respostas a elevadas concentrações de fitorreguladores, e, principalmente, a tolerância a elevados níveis de auxina no meio, o que supera a média da maioria das espécies vegetais.

Não foram observadas estruturas que indicassem a formação de embriões somáticos sobre os calos formados. Diante disso, salienta-se a necessidade de estudos com maiores concentrações de 2,4-D a fim de definir uma curva de resposta destas variáveis, uma vez que esse fator é relevante para a elaboração da metodologia para embriogênese somática. Além disso, faz-se necessária a exploração de outros fitorreguladores, bem como outras partes da planta. Guerra *et al* (2000), trabalhando com embriogênese somática de *Euterpe edulis*, alcançou resultados favoráveis com o uso de concentrações e combinações de fitorreguladores específicas para cada explante. Segundo esses autores, embriões zigóticos de *E. edulis* requerem de 50 a 100 mg.L⁻¹ de 2,4-D na fase inicial, o que se assemelha muito aos resultados da indução de calos no presente

trabalho.

Embora o meio base não tenha sido o mesmo, a presença do carvão ativado no segundo experimento parece não ter influenciado nas variáveis analisadas, havendo desenvolvimento e formação de calos de forma muito similar em ambos os experimentos.

A maioria das informações da literatura dá conta de que a presença de carvão ativado no meio de cultivo é bastante favorável à proliferação celular em tecidos de palmeiras. A presença de carvão no meio teve efeito positivo sobre o enraizamento de *Phoenix dactylifera*, sendo a maior concentração testada (9 g.L⁻¹) a que promoveu os resultados superiores. O efeito favorável da alta concentração de carvão ativado foi atribuído a sua capacidade de reduzir o acúmulo de substâncias inibidoras no meio (Badawy *et al.*, 2005).

4.5.2 Tecidos da inflorescência como explantes iniciais para embriogênese somática

O emprego predominante de tecidos do zigoto e da plântula, como fonte de explantes, gera lotes de mudas constituídos de clones dos embriões originais, cujo desempenho vegetativo ainda é desconhecido. O uso destes tecidos atende satisfatoriamente ao objetivo de preservação de germoplasma, porém, não permite a propagação massal de um indivíduo adulto em especial. Assim, não podem ser preservados genótipos que apresentem combinações de características especialmente vantajosas ao emprego comercial, ou ainda visando ao melhoramento genético (Fior *et al.*, 2007).

Após quatro semanas inoculados, os tecidos apresentaram, em média, 12% de contaminação, sem diferença entre os tratamentos (Kruskal-Wallis, valor $P > 0,4$). Na maioria dos casos a colônia microbiana caracterizava-se pela

presença de massa superficial pulverulenta, caracterizando fungo, e em menor proporção, colônias de coloração leitosa, com aspecto úmido, caracterizando bactéria ou levedura.

Não foi observado sinal de início de regeneração, estando 100% dos explantes com aspecto oxidado, de coloração marrom-escura, tanto na avaliação dos 30 como aos 60 dias.

A oxidação observada pode estar associada à impossibilidade de desdiferenciação dos tecidos da inflorescência na fase em que foi coletada. Em um experimento desenvolvido por Verdeil *et al.* (1993) com meio de cultivo semelhante ao do presente estudo houve formação de calos sobre explantes de inflorescências de *Cocos nucifera* coletadas com desenvolvimento entre 15 a 40 cm de comprimento.

Visando à clonagem *in vitro* de *Areca catechu* através da embriogênese somática, Karun *et al.* (2004) utilizaram como explantes tecidos da inflorescência. Esses autores concluíram que inflorescências coletadas com tamanho entre 8 e 12 cm geram explantes com maior resposta à formação de calos.

Explantes oriundos de ápice terminal de plantas de *Phoenix dactylifera* com 60 a 80 cm de caule foram induzidos à embriogênese somática *in vitro* em meio MS com ANA e 2ip, e concentrações de sacarose de 2, 3, 4 e 5%. Avaliação do número e comprimento de raízes às seis semanas demonstrou maior número de embriões formados em meio com 3% de sacarose. A concentração onde houve menor embriogênese foi 2% (Badawy *et al.*, 2005).

Apesar de ter sido realizado apenas um teste preliminar, e utilizando-se explantes de uma única inflorescência, pode-se inferir que, para a indução à embriogênese *in vitro*, tecidos de inflorescência podem não ser os mais adequados. Baseado no que foi mencionado acima sobre a relação de respostas

de tecidos de inflorescências em função da fase do seu desenvolvimento, existe a possibilidade de utilização de inflorescências mais jovens de *B. odorata*, o que geraria explantes com tecidos menos diferenciados.

4.6 Desenvolvimento inicial de mudas de *Butia odorata*

Na primeira etapa do experimento as variáveis número de folhas e aumento no número de folhas não apresentaram distribuição normal dos dados, mesmo mediante transformações. Por isso foram analisadas através da análise de variância não-paramétrica (teste Kruskal-Wallis).

Não houve perda de mudas por morte durante a condução do experimento. Também não foram observadas pragas ou moléstias que evidenciassem algum sinal ou sintoma nas mudas. A altura média das plantas do tratamento com apenas casca de arroz carbonizada (CAC) foi de 31,3 cm, significativamente inferior aos demais tratamentos, que apresentaram média de 35,7 cm. Através da variável aumento em altura, verifica-se que o crescimento médio durante os 90 dias desta etapa do experimento foi de 11,6 cm em substrato CAC e 16,15 cm, nos demais. Nesse período, cada planta emitiu, em média, 1,85 folha, sem diferença estatística entre os tratamentos.

Além da altura das plantas, constatou-se diferença entre os tratamentos para a variável pH do substrato. No tratamento com apenas CAC o pH foi de 3,67, diferindo de todos os demais. Nos tratamentos com maior proporção de casca de pínus compostada (CPC) verificou-se pH mais elevado, porém, mesmo no tratamento com 100% de CPC, o pH foi bastante baixo, diferindo muito da condição de todos os substratos no início do experimento (Tabelas 18, 19 e 20).

TABELA 18. Análise do substrato casca de pinus compostada, peneirada em malha de 5 mm, utilizado em ambos os experimentos de desenvolvimento de mudas de *Butia odorata*, com ênfase nas características químicas. (Laboratório de Análises, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2009).

Determinações	Valores	Método de análise	Deteção mínima
Umidade (%)	58	Gravimetria	-
pH	6,8	Relação 1:5 (em água)	
Densidade (Kg.m ⁻³)	680	-	
Carbono orgânico (%)	20	Combustão úmida - Walkey Black	0,01%
Nitrogênio (TKN) %	0,38	Kjeldahl	0,01%
Fósforo total %	0,16	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	0,01%
Potássio total %	0,47	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	0,01%
Cálcio total %	0,89	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	0,01%
Magnésio total %	0,26	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	0,01%
Enxofre total %	0,07	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	0,01%
Cobre total ppm	41	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	0,6 ppm
Zinco total ppm	68	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	2 ppm
Ferro total %	2,5	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	4 ppm
Manganês total ppm	980	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	4 ppm
Sódio total ppm	384	Digestão úmida nítrico perclórica ICP-OES	0,01%
Boro total ppm	10	Digestão seca ICP-OES	1 ppm

A condutividade elétrica (CE) não teve variação significativa entre os tratamentos, estando bem acima da condutividade inicial dos substratos, o que indica que nessa fase o fertilizante de liberação lenta incorporado ao substrato ainda estava suprindo o meio com nutrientes.

O pH baixo dos tratamentos com maior proporção de CAC, associado ao fato de este componente do substrato ter apresentado pH levemente alcalino (8,0) no início do experimento, sugere que o adubo de liberação lenta tenha provocado esta queda do pH (Tabelas 18, 21 e 22). Já nos tratamentos com maior proporção de CPC, teve efeito o fator tamponante da CPC, ainda assim, o pH estava com índice abaixo do verificado para este substrato na análise inicial.

TABELA 19. Análise dos substratos utilizados em ambos os experimentos de desenvolvimento de mudas de *Butia odorata*, com ênfase nas características físicas (Laboratório de Análise de Substratos, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2009).

Determinações	Tratamento				
	1*	2	3	4	5
DU (Kg.m ⁻³)	260	454	487	548	722
DS (Kg.m ⁻³)	131	201	222	241	307
MS (g.100 ⁻¹)	51	44	46	44	42
pH (1:5 - em água)	8,05	7,05	6,69	6,53	6,21
CE (mS.cm ⁻¹) - 1:5 - em água)	0,099	0,092	0,894	0,096	0,117
pT (m ³ .m ⁻³)	0,81	0,86	0,84	0,81	0,85
EA (m ³ .m ⁻³)	0,57	0,52	0,47	0,41	0,32
AFD (m ³ .m ⁻³)	0,12	0,11	0,1	0,09	0,08
AT (m ³ .m ⁻³)	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
AD (m ³ .m ⁻³)	0,14	0,13	0,12	0,11	0,11
CRA 10 (m ³ .m ⁻³)	0,23	0,34	0,37	0,4	0,54
CRA 50 (m ³ .m ⁻³)	0,11	0,23	0,27	0,31	0,45
CRA 100 (m ³ .m ⁻³)	0,09	0,22	0,25	0,29	0,43

*1: Casca de arroz carbonizada (CAC); 2: CAC + Casca de pinus compostada (CPC) (2:1); 3: CAC + CPC (1:1); 4: CAC + CPC (1:2); e 5: CPC – Proporções volumétricas; DU: densidade úmida; DS: densidade seca; MS: matéria Seca; CE: condutividade elétrica; pT: porosidade total; EA: espaço de aeração; AFD: água facilmente disponível; AT: água tanponante; AD: água disponível; CRA: capacidade de retenção de água.

A CAC misturada à CPC alterou sua densidade. Quanto maior seu volume relativo, menos denso se tornou o substrato sendo o valor mais baixo de 260 Kg.m⁻³, enquanto que a CPC teve densidade de 722 Kg.m⁻³. Segundo Minami (1995), a casca de arroz carbonizada apresenta forma floculada, é leve, de fácil manuseio, com grande capacidade de drenagem, baixa capacidade de retenção de umidade, pH neutro, rica em cálcio e potássio, livre de nematoides e patógenos devido ao processo de carbonização.

TABELA 20. Desenvolvimento de mudas de *Butia odorata* submetidas à primeira etapa do experimento em tratamentos com substratos em combinações dos componentes: casca de pinus compostada (CPC) e casca de arroz carbonizada (CAC), aos 91 dias após o estabelecimento. Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2009.

Tratam.	Avaliação do substrato		Avaliação das plantas				
	CE* ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	pH	Altura (cm)	Nº de Folhas	Diâmetro do caule (cm)	Aumento em altura (cm)	Aumento em nº de folhas
1 ¹	4,543	3,67 d ²	31,3 b	3,2	0,81	11,6 b	1,8
2	4,588	3,90 c	36,0 a	3,1	0,79	16,1 a	1,9
3	4,517	4,06 b	35,3 a	3,3	0,81	14,8 a	1,9
4	5,049	4,19 a	35,2 a	3,3	0,80	17,1 a	1,8
5	5,499	4,15 a	36,3 a	3,4	0,82	16,6 a	1,9
Análise	ANOVA	ANOVA	ANCOVA	ANOVA Ñ-Param. ³	ANOVA	ANOVA	ANOVA Ñ-Param.
P (Trat)	0,389	<0,01	<0,01	0,342	0,895	<0,01	0,901
P (Bloco)	0,691	<0,01	0,012	1,000	<0,01	0,247	1,000
Média	4,84	3,99	34,82	3,26	0,81	15,24	1,86
CV (%)	17,18	2,56	13,58	-	15,58	31,31	-
GL do erro	94	94	144	144	144	144	144

¹ 1: Casca de arroz carbonizada (CAC); 2: CAC + Casca de pinus compostada (CPC) (2:1); 3: CAC + CPC (1:1); 4: CAC + CPC (1:2); e 5: CPC – Proporções volumétricas.

² Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste DMS a 5%.

³ ANOVA não paramétrica, teste de Friedman;

CE: Condutividade elétrica

Kämpf (2005) salienta que a densidade não pode ser considerada de forma isolada para escolha de um substrato. Como exemplo, a autora menciona que a casca de arroz carbonizada e a areia apresentam valores de densidade extremamente diferentes, no entanto, quando submetidos à tensão negativa de 100hPa, apresentam a mesma capacidade de retenção de água.

Utilizando resíduo de mineração de areia misturado a casca de arroz carbonizada para desenvolvimento de mudas de pupunha (*Bactris gasipaes*) Garcia *et al.*, (2011) verificaram que a maior proporção de casca de arroz favoreceu o decréscimo da densidade e a elevação na porosidade total, proporcionando menor microporosidade e maior macroporosidade.

Tratando-se de materiais de origem orgânica, como no presente estudo, o comportamento de algumas propriedades físicas apresenta relação mais estreita com a densidade, quando comparados com materiais de origem mineral. Conforme Kämpf (2005), a densidade destes materiais um substrato permite interpretar algumas propriedades físicas. Por exemplo, quanto mais alta a densidade, mais difícil o seu uso em recipiente, quer pela limitação ao crescimento das plantas, quer pela dificuldade no transporte. Segundo o autor, para recipientes com altura entre 20 e 30 cm, que é o caso do presente trabalho, a densidade seca do substrato a ser utilizado deve estar entre 300 e 500 Kg.m⁻³. Ainda, de acordo com De Boodt e Verdonck (1972), um substrato considerado ideal deve apresentar espaço de aeração entre 20-30% e porosidade total de, pelo menos, 85%. Os resultados apresentados na Tabela 19 demonstram que o substrato formado apenas por CPC estaria dentro destas faixas, sendo, portanto, o mais recomendado dentre as misturas testadas. No entanto, se considerarmos que a faixa de água disponível considerada ideal por De Boodt e Verdonck (1972) para a maioria das espécies é 30%, nenhuma das misturas testadas estaria

próxima deste valor. Por isso, quando utilizados esses substratos, o monitoramento da necessidade de irrigação deve ser intenso, uma vez que há menos água disponível para a absorção das raízes em intervalos entre irrigações.

Para pH, o fator bloqueamento teve variância significativa (Tabela 20), o que sugere efeito da fase de desenvolvimento das plantas no condicionamento químico do substrato. Isso pode ter ocorrido em função da liberação de exudatos das raízes, ou mesmo a absorção diferenciada de nutrientes devido à fase de desenvolvimento em cada bloco, alterando o pH.

Na segunda etapa do experimento, a composição do substrato foi determinante no desenvolvimento das mudas, conforme verificado na maioria das variáveis analisadas (Tabelas 21 e 22). Contudo, para todas as variáveis referentes ao desenvolvimento das plantas, que apresentaram variância significativa, o teste de comparação de médias indicou diferença entre o substrato CAC (100%) e os demais, ou seja, a presença de CPC, mesmo que em baixa proporção, foi suficiente para favorecer o incremento no desenvolvimento vegetativo. Somente o número de folhas por planta não teve variância significativa entre os tratamentos (Tabela 22).

Este resultado pode estar relacionado tanto com as propriedades físicas dos substratos com CPC, cujas características se assemelham às consideradas ideais, conforme já mencionado, quanto com o condicionamento químico provocado pelo efeito da CPC (Tabelas 18 e 21).

TABELA 21. Desenvolvimento de mudas de *Butia odorata* submetidas a tratamentos com substratos em combinações dos componentes: casca de pinus compostada (CPC) e casca de arroz carbonizada (CAC), aos 250 dias após o estabelecimento, e a 160 dias em quatro níveis de pH. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009.

Fontes de Variação		Variáveis analisadas (avaliação final, 160 dias em quatro níveis de pH)										
Substr.*	Bloco (pH)	CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	pH	Altura (cm)	Nº Folhas	Compr. Raízes (cm)	Nº Raízes	Diâm. colo (cm)	Nota / Raízes	Nota / parte aérea	Incremento altura (cm)	Incremento Nº folhas
1	4,0	122,80	4,19	33,75	4,50	17,75	4,00	0,90	1,50	1,50	3,45	1,75
1	4,9	109,60	4,11	26,60	4,75	13,50	2,75	0,91	1,50	1,25	0,75	1,75
1	5,8	116,20	4,39	27,00	5,50	17,25	4,00	1,06	2,25	2,00	1,38	2,50
1	6,7	111,20	4,41	24,13	4,75	16,50	4,00	0,91	1,75	1,75	0,00	2,00
2	4,0	256,55	4,46	35,00	5,25	22,88	4,50	1,39	3,25	2,50	3,83	2,00
2	4,9	256,10	4,33	33,50	5,25	21,75	4,50	1,40	3,75	2,75	4,50	2,25
2	5,8	288,20	4,51	34,67	5,33	19,00	4,67	1,28	3,67	3,00	6,67	2,58
2	6,7	234,35	4,58	37,75	5,50	20,25	6,00	1,39	4,25	3,75	4,38	2,50
3	4,0	258,40	4,58	44,67	5,67	20,67	6,00	1,38	4,33	3,67	8,59	2,67
3	4,9	287,00	4,69	39,50	5,00	21,25	5,50	1,58	3,50	3,50	7,95	1,75
3	5,8	380,45	4,58	32,13	5,25	19,88	4,75	1,35	3,25	2,50	5,28	2,25
3	6,7	347,25	4,52	37,25	5,50	21,50	5,75	1,38	3,75	3,00	11,58	2,50

Continuação TABELA 21. Desenvolvimento de mudas de *Butia odorata* avaliadas ao final da segunda etapa do experimento com substratos em combinações dos componentes: casca de pinus compostada (CPC) e casca de arroz carbonizada (CAC), aos 250 dias após o estabelecimento, e a 160 dias em quatro níveis de pH. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009.

Fontes de Variação		Variáveis analisadas (avaliação final, 160 dias)										
Substr.*	Bloco (pH)	CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	pH	Altura (cm)	Nº Folhas	Compr. Raízes (cm)	Nº Raízes	Diâm. colo (cm)	Nota / Raízes	Nota / parte aérea	Incremento altura (cm)	Incremento Nº folhas
4	4,0	377,25	4,62	40,00	6,33	20,67	5,33	1,70	4,33	4,33	6,75	3,08
4	4,9	296,15	4,70	37,38	5,25	21,00	5,00	1,31	3,00	2,75	8,03	2,50
4	5,8	421,50	4,60	36,00	5,50	20,75	5,75	1,50	3,25	3,25	7,88	2,25
4	6,7	374,10	4,70	40,13	5,25	20,75	5,25	1,30	3,50	3,25	8,50	2,75
5	4,0	487,50	4,68	37,88	5,75	17,50	5,25	1,40	3,50	3,00	6,50	2,25
5	4,9	342,55	4,65	47,25	5,75	20,75	6,25	1,61	4,00	4,00	13,18	2,75
5	5,8	513,00	4,71	35,38	6,50	23,00	5,75	1,60	4,00	3,50	5,68	3,50
5	6,7	468,50	4,75	36,38	4,75	16,88	5,25	1,28	2,75	2,75	5,70	1,75
Valor P (Substr.)		<0,001	<0,001	0,006	0,168	0,021	0,003	<0,001	<0,001	0,006	0,006	0,373
Valor P (Bloco)		0,031	0,335	0,196	0,327	0,91	0,689	0,478	0,907	0,974	0,784	0,56
GL do erro		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Média		302,43	4,54	35,82	5,37	19,67	5,01	1,33	3,25	2,9	6,03	2,37
CV (%)		12,72	1,99	10,42	8,37	9,72	11,66	9,73	16,39	20,41	39,07	19,82

*1: Casca de arroz carbonizada (CAC); 2: CAC + Casca de pinus compostada (CPC) (2:1); 3: CAC + CPC (1:1); 4: CAC + CPC (1:2); e 5: CPC – Proporções volumétricas; CE: condutividade elétrica.

TABELA 22: Desenvolvimento de mudas de *Butia odorata* avaliadas ao final da segunda etapa do experimento com substratos em combinações dos componentes: casca de pinus compostada (CPC) e casca de arroz carbonizada (CAC), aos 250 dias após o estabelecimento, e a 160 dias em quatro níveis de pH. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2009.

Substrato	CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	pH	Altura (cm)	Nº Folhas	Compr. Raízes (cm)	Nº Raízes	Diâm. à alt. Colo	Nota / raízes	Nota / parte aérea	Increm em altura (cm)	Incremento em nº folhas
1	114,95 d**	4,27 c	27,87 b	4,88 ns	16,25 b	3,69 b	9,47 b	1,75 b	1,63 b	1,39 b	2,00 ns
2	258,80 c	4,47 b	35,23 a	5,33	20,97 a	4,92 a	13,65 a	3,73 a	3,00 a	4,84 ab	2,33
3	318,28 b	4,59 ab	38,39 a	5,35	20,82 a	5,50 a	14,21 a	3,71 a	3,17 a	8,35 a	2,29
4	367,25 b	4,65 a	38,38 a	5,58	20,79 a	5,33 a	14,53 a	3,52 a	3,40 a	7,79 a	2,65
5	452,89 a	4,70 a	39,22 a	5,69	19,53 a	5,63 a	14,72 a	3,56 a	3,31 a	7,76 a	2,56
Média	302,43	4,54	35,82	5,37	19,67	5,01	13,31	3,25	2,90	6,03	2,37
DMS*	59,28	0,14	5,75	-	2,95	0,90	2,00	0,82	0,91	3,63	-

* DMS: diferença mínima significativa a 95% de confiabilidade; **: Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste DMS (5%); ns: não significativo; CE: condutividade elétrica; Nota parte aérea e raízes: escala de 1 a 5 atribuída ao aspecto visual.

Mesmo com a correção do pH do substrato e das soluções de adubação aplicadas ao longo da condução do experimento, ao final deste (160º dia) não houve diferença significativa para o nível de pH entre os blocos. Assim como na primeira etapa, este comportamento do pH pode ter relação com o efeito tamponante que as mudas de butiazeiro exercem no substrato em recipientes, bem como a possibilidade da CPC ter assumido esta função devido a sua condição química e biológica, pois mesmo que o processo de compostagem tenha sido realizado de forma a atingir certa estabilidade, há presença de partículas maiores que, possivelmente, continuam o processo de decomposição e, conseqüentemente, de liberação de elementos que possam alterar o pH do meio. Esta observação é reforçada pelo fato de ter havido diferença estatística significativa no pH dos tratamentos (proporções das misturas), sendo os índices mais elevado nos três tratamentos com maior proporção de CPC (Tabela 22), desta forma, seria descartada a possibilidade de o adubo de liberação lenta ter sido o causador da redução do pH. Contudo, estudos mais detalhados precisam ser realizados para testar essa hipótese.

O uso do adubo de liberação lenta mostrou-se bastante prático para a manutenção das mudas de *B. odorata*, pois dispensa a mão de obra na adubação periódica. De acordo com Bataglia e Furlani (2010) o uso de fertilizantes de liberação lenta tem sido uma prática na produção de palmeiras em vasos. No entanto, os autores alertam para a necessidade do monitoramento, principalmente em situações de alta temperatura, onde pode haver liberação mais rápida de nutrientes, havendo lixiviação, diminuindo a eficiência da adubação. Este pode ser o caso de uma situação em cultivo em casa de vegetação nos meses de verão no Rio Grande do Sul, onde a temperatura ambiente pode ultrapassar 40 °C.

Desconsiderando as diferenças das variáveis relacionadas ao substrato e à

adubação ao longo da condução de todo o experimento, o desenvolvimento das mudas apresentou algumas variações entre as etapas que refletem as condições ambientais do período (Figura 30). Na primeira etapa, quando as plantas foram mantidas sob sombreamento de 70%, por 90 dias, o incremento em número de folhas, em altura e no diâmetro do caule foram de 1,85; 15 cm e 3 mm, respectivamente. Na segunda etapa, em condição de maior intensidade luminosa (50%) e tempo mais prolongado (160 dias), o incremento em número de folhas, em altura e no diâmetro do caule das mesmas variáveis foi de 2,37; 5,3 cm e 8 mm, respectivamente. À primeira impressão, percebe-se o menor crescimento em altura na segunda etapa. Porém, ao dividir o aumento de cada variável pelo número de dias da etapa correspondente, verifica-se que a única que manteve a intensidade de crescimento foi o diâmetro do caule (0,0033 mm por dia, igualmente em ambas as etapas). Voltando-se para as variáveis ambientais do período, verifica-se que a primeira etapa foi conduzida no período de primavera e verão (meados de novembro a meados de fevereiro) e a segunda no final do verão, todo o outono e início do inverno (fevereiro a julho). Esta informação remete à diferença de temperatura e horas de sol por dia nas duas etapas. No entanto, o fato de as plantas terem mantido o crescimento em espessura da base (altura do colo), mesmo no período ambientalmente desfavorável, sugere que a maior intensidade luminosa, pela mudança de casa de vegetação, tenha suprido essa deficiência dos fatores temperatura e horas de luz da segunda etapa.

É provável que no início da segunda etapa, quando a temperatura média ainda mantinha-se elevada, o aumento da intensidade luminosa, tenha favorecido um crescimento mais acelerado das plantas em espessura da base, tendo estabilizado no período de temperatura mais baixa, o que, na média, resultou em um crescimento diário idêntico entre os períodos. Apesar de ser um tanto

especulativo considerar essa hipótese como provável, sob o ponto de vista da utilização prática dessa informação, pode-se inferir que nos meses de outono e inverno as plantas de *B. odorata* encontram condições ambientais mais favoráveis sob maior intensidade luminosa, do que nos meses de primavera e verão, e que essa maior intensidade compensaria a deficiência da diminuição das horas de luz e, principalmente, da baixa temperatura.

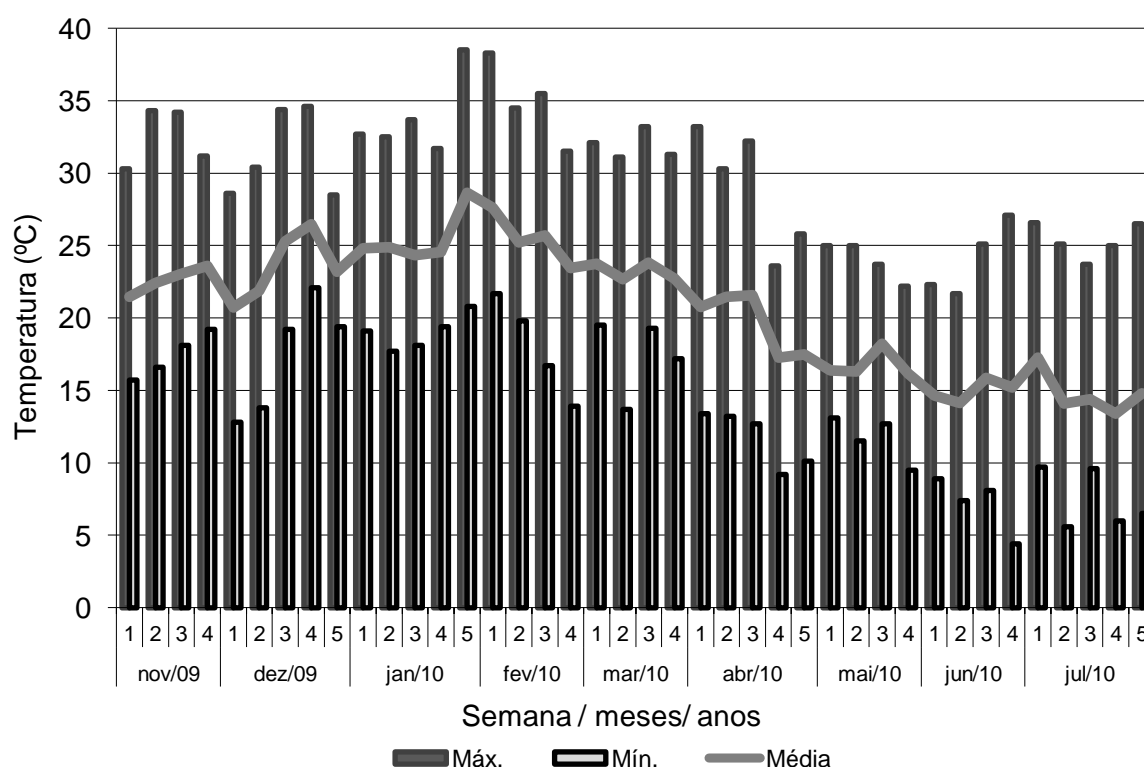


FIGURA 30. Temperaturas máximas e mínimas absolutas e médias semanais do ambiente externo à casa de vegetação, de todo o período de condução do experimento com desenvolvimento de mudas de *Butia odorata*. (Dados obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (8º Distrito de Meteorologia - Porto Alegre, 2009).

O desenvolvimento de mudas de butiazeiro em recipientes parece ser afetado pela densidade do substrato. Contudo, esta variável esteve diretamente relacionada com o pH em função da característica do substrato utilizado. Em

função das variações ocorridas ao longo das duas etapas do experimento, e por não terem sido evidenciados sintomas nas plantas, pode-se inferir que *B. odorata* tolera amplitudes de pH entre neutro a fortemente ácido.

A manutenção das plantas em ambiente com maior intensidade luminosa durante os meses de outono e inverno, pode compensar a queda da temperatura e diminuição das horas de luz do dia, mantendo as mudas em crescimento nesse período.

4.7 Adubação e desenvolvimento de mudas

Conforme verificado na análise do substrato CPC e discutido no item 4.6, em função do reduzido percentual de água disponível, fez-se necessário um monitoramento mais intenso da disponibilidade de água no substrato, por isso, para esse estudo foram utilizados tensiômetros a fim de evitar deficiência hídrica para as plantas. No início do experimento, quando as plantas ainda estavam pouco desenvolvidas, e a demanda evaporativa do ar não apresentava índices elevados devido à condição climática, a necessidade de irrigação indicada nos tensiômetros, eram com periodicidade semanal, ou a cada cinco dias. Com o avanço do período, que coincidiu com a entrada da primavera, as irrigações foram sendo mais constantes, passando a uma vez a cada dois dias e, finalmente na fase final do experimento, quando as plantas apresentavam-se bastante desenvolvidas, as irrigações ocorriam diariamente.

Durante os 426 dias de condução do experimento as temperaturas médias semanais junto às plantas oscilaram entre 9,5 °C, em final de junho e 28,7 °C em final de janeiro. As temperaturas absolutas variaram de mínima 3 °C, em início de julho, e máxima de 42 °C em início de janeiro (Figura 31).

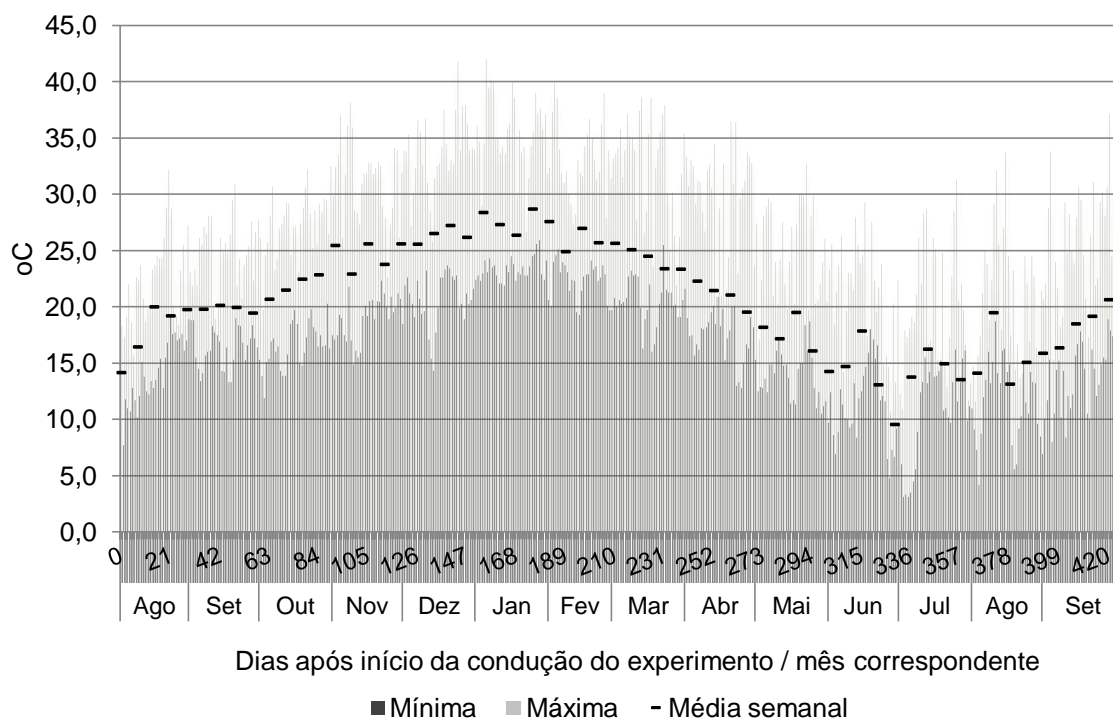


FIGURA 31. Temperaturas mínimas e máximas absolutas, e médias semanais do ambiente de casa de vegetação durante o período de condução do experimento de adubação e desenvolvimento de mudas de *Butia odorata* (agosto de 2010 a setembro de 2011). FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

Nas avaliações ocorridas entre o período correspondente a 6^a e a 7^a adubação, verificou-se pouca variação, tanto na CE, como no pH do substrato. A análise de regressão não apontou tendência significativa para estas duas variáveis. A CE durante todo o período apresentou uma faixa bem distinta entre os tratamentos. O substrato não adubado (tratamento controle) apresentou CE entre 0,2 a 0,25 mS.cm⁻¹, enquanto que os demais tiveram distribuição compatível com a concentração da adubação (em média 2,45 mS.cm⁻¹ para a adubação com 0,6 g.L⁻¹, 5,6 mS.cm⁻¹ para 1,2 g.L⁻¹; 9,3 mS.cm⁻¹ para 2,4 g.L⁻¹ e 12,4 mS.cm⁻¹ para 3,6 g.L⁻¹, respectivamente) (Figura 32). Constatou-se, portanto, que no período entre adubações a CE do substrato manteve-se relativamente constante, mesmo nas concentrações mais baixas utilizadas. Importante ressaltar que essa avaliação foi realizada no mês de fevereiro, quando a irrigação foi mais frequente

devido à maior demanda evaporativa provocada, principalmente, pela temperatura elevada, o que pode ter contribuído para a lixiviação de parte dos sais.

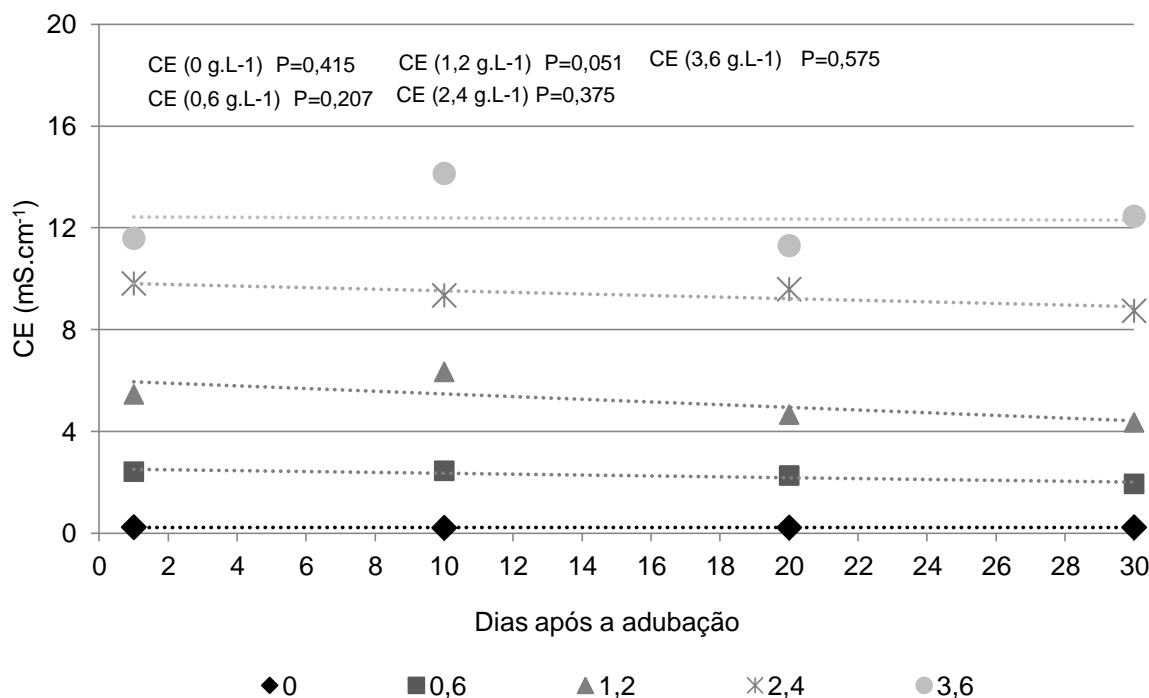


FIGURA 32. Condutividade elétrica (CE) do substrato casca de pínus compostada nos recipientes com as mudas de *Butia odorata* no período de 30 dias entre as aplicações de fertilizantes nas concentrações 0, 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ no experimento de adubação e desenvolvimento de mudas de *Butia odorata*. Método de análise: *pour thru*. Os valores P correspondem à significância estatística da análise de regressão linear. FZB-RS, Porto Alegre, 2011).

Variação muito semelhante foi verificada para o pH nestas mesmas avaliações, também distinguindo-se em relação às concentrações da adubação. No tratamento controle foi verificado pH variando entre 6,2 e 6,4, o que corresponde a um índice muito próximo ao constatado no início do experimento. Quanto maior a concentração da adubação, mais ácido se tornou o substrato, no entanto, ainda em uma faixa aceitável para a maioria das espécies nativas do sul do Brasil (Figura 33).

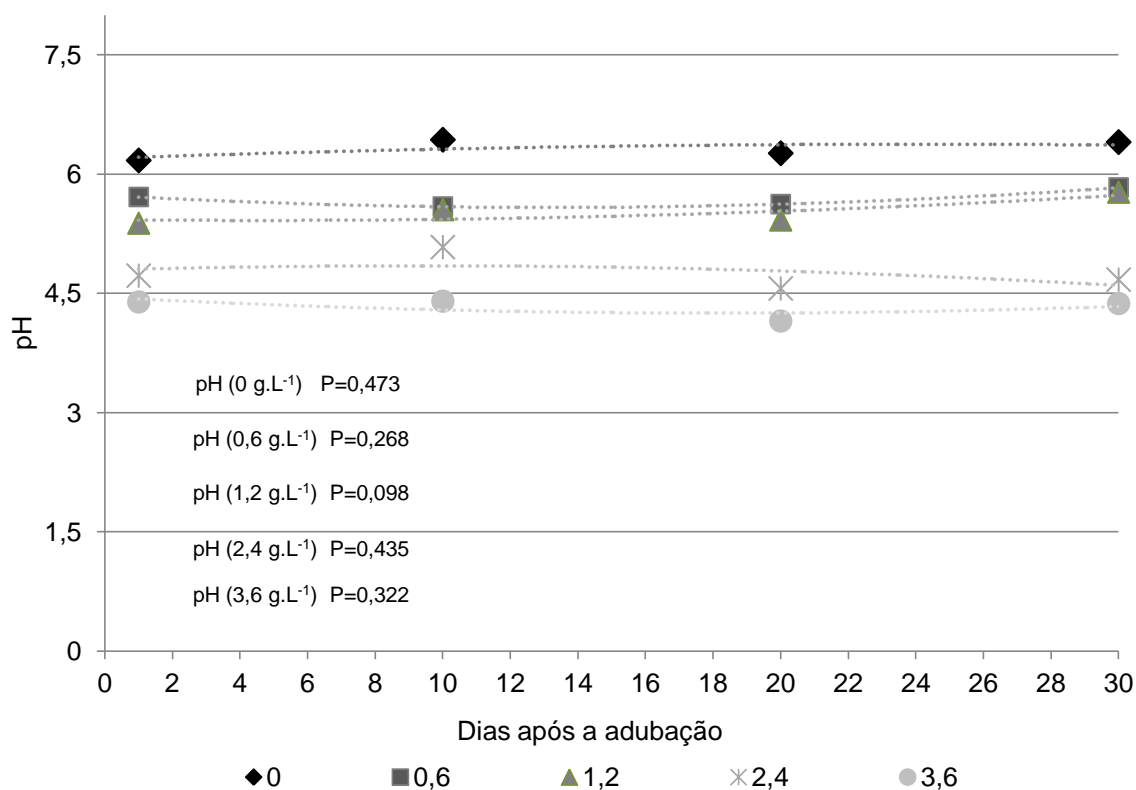


FIGURA 33. pH do substrato casca de pinus compostada nos recipientes com a as mudas de *Butia odorata* no período de 30 dias entre as aplicações de fertilizantes nas concentrações 0, 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ no experimento de adubação e desenvolvimento de mudas de *Butia odorata*. Método de análise: *pour thru*. Os valores P correspondem à significância estatística da análise de regressão linear. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

Sobrepondo esses resultados com a tendência de variação da CE apontada na Figura 34, percebe-se que as quantidades de sais presentes no substrato durante estas avaliações são as mais elevadas de todo o período de condução do experimento.

Desde o início das adubações, houve um aumento gradual da CE no substrato de todos os tratamentos, com exceção do controle. A partir dos 218 dias de condução do experimento (após a sexta adubação) houve um decréscimo na CE do substrato dos tratamentos com as duas maiores concentrações de sais, enquanto que nos demais, a máxima expressão da CE foi após os 316 dias. Cabe lembrar que a partir dos 220 dias, a periodicidade de adubação passou de 30

para 60 dias. Aparentemente, esse é um fator que explica a queda na CE a partir desse ponto. No entanto, a queda da CE nos tratamentos de menor dosagem iniciou em um momento posterior à redução da frequência de adubação. Essa diferença, associada à tendência quadrática da regressão de todos os tratamentos com adubação, sugere que enquanto as aplicações eram a cada 30 dias, houve um acúmulo gradual e uma saturação, que ocorreu antecipadamente nos tratamentos com maior dosagem. Com a aplicação mais espaçada da adubação, houve a lixiviação parcial, e conseqüente queda na CE.

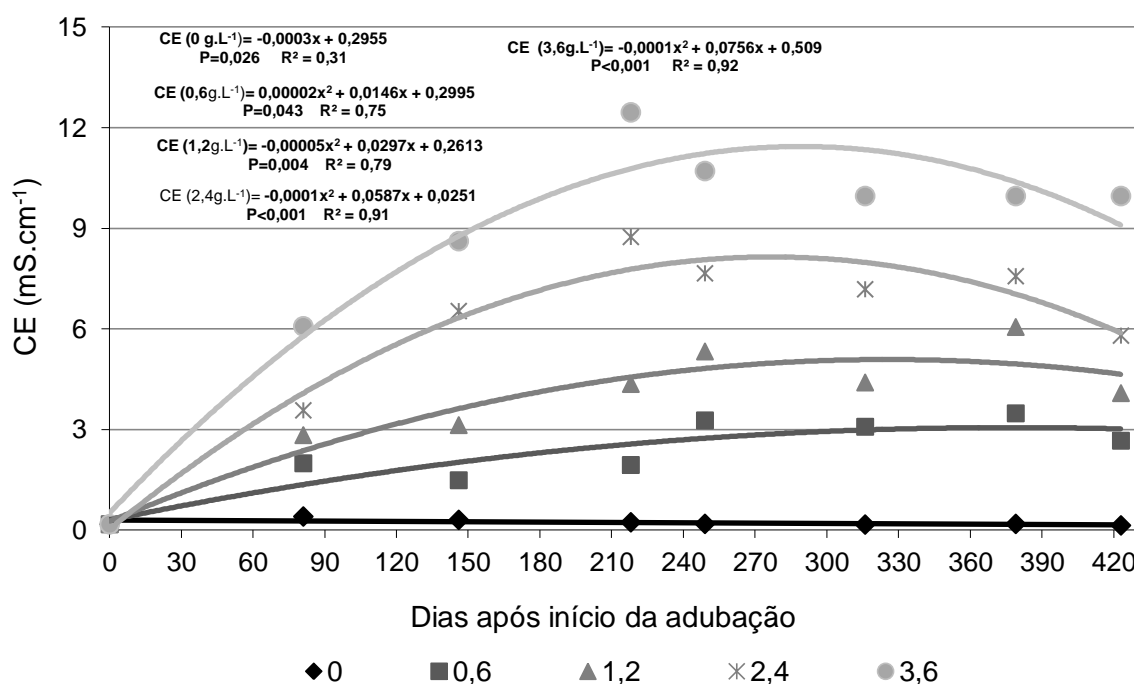


FIGURA 34. Avaliações da condutividade elétrica (CE) do substrato casca de pínus compostada nos recipientes com mudas de *Butia odorata* durante o período de condução do experimento de adubação com 0, 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ de fertilizantes. Método de análise: *pour thru*. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

O pH do substrato dos tratamentos com as duas dosagens de adubação mais baixas, além do tratamento controle, variou de 5,3 e 6,6 ao longo de todo o experimento. Não foi constatada tendência significativa de alteração do pH em função das adubações nesses tratamentos. A variação foi muito semelhante, o

que sugere efeito tamponante do substrato para essas dosagens de fertilizante, o que não aconteceu nos demais tratamentos, cuja análise de regressão indicou tendência quadrática com variação semelhante à verificada para a variável CE, embora inversamente proporcional, ou seja, enquanto a CE aumentou, o pH diminuiu (Figura 35).

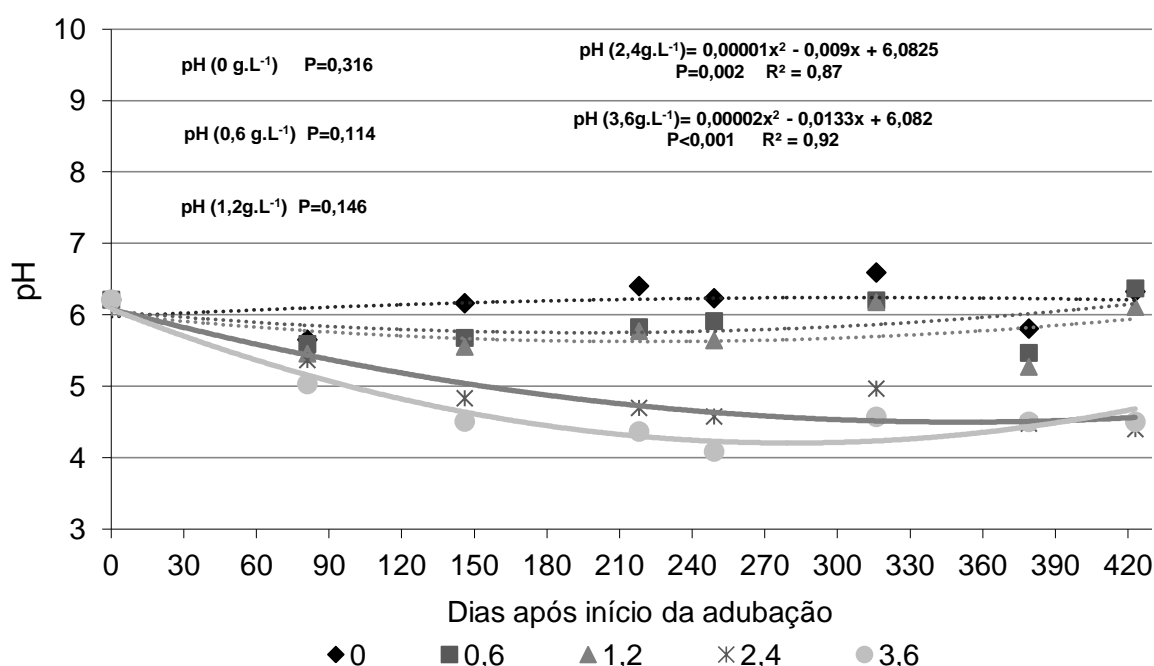


FIGURA 35. Avaliações do pH do substrato casca de pínus compostada nos recipientes com as mudas de *Butia odorata* durante o período de condução do experimento de adubação com 0, 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ de fertilizantes. Método de análise: *pour thru*. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

Com exceção dos tratamentos com as duas dosagens mais elevadas (2,4 e 3,6 g.L⁻¹) o pH manteve-se em uma faixa considerada adequada para a maioria dos cultivos em substratos. De acordo com Handreck e Black (1999) o pH do substrato para cultivos em geral, deve ser entre 5,5 e 6,3 para palmeiras cultivadas em recipientes. Já, Bataglia e Furlani (2010) recomendam pH entre 5 e 6 para a maior disponibilidade de todos os nutrientes.

A análise de variância indicou diferença significativa entre os tratamentos para todas as variáveis relacionadas ao desenvolvimento das plantas. Também ocorreu diferença entre blocos para a variável diâmetro do caule. As plantas oriundas de sementes coletadas em Santa Vitória do Palmar apresentaram maior diâmetro, comparas às de Encruzilhada do Sul (5,64 e 5,17 cm, respectivamente) (Tabela 23).

TABELA 23. Análise de variância dos dados da avaliação final de mudas de dois acessos de *Butia odorata* submetidas à adubação com diferentes doses de fertilizante, aos 426 dias após início do experimento. FZB-RS, Porto Alegre, RS, 2011.

	Nº total de folhas	Diâmetro do caule (cm)	Nº folhas pinadas
Tratamentos	P=0,02	P<0,01	P<0,01
Blocos	P=0,37	P<0,01	P=0,09
Média Geral	12,42	5,37	7,24
Desvio padrão	1,6	0,75	1,41
CV(%)	12,24	11,37	17,71

Através da análise de regressão, tendo como variável independente a concentração de sais na adubação, identificou-se tendência linear decrescente para o número de folhas, indicando que o aumento da dosagem na adubação fez com que a emissão de folhas fosse inibida (Figura 36). Entre as médias dos tratamentos, o número máximo de folhas por planta foi 13,3, enquanto que o mínimo foi de 11 folhas.

Para as variáveis diâmetro do caule e número de folhas pinadas, a análise de regressão indicou tendência quadrática significativa, com pontos de máxima resposta a 0,74 e 1,1 g.L⁻¹ para diâmetro do caule e número de folhas pinadas, respectivamente (Figura 36).

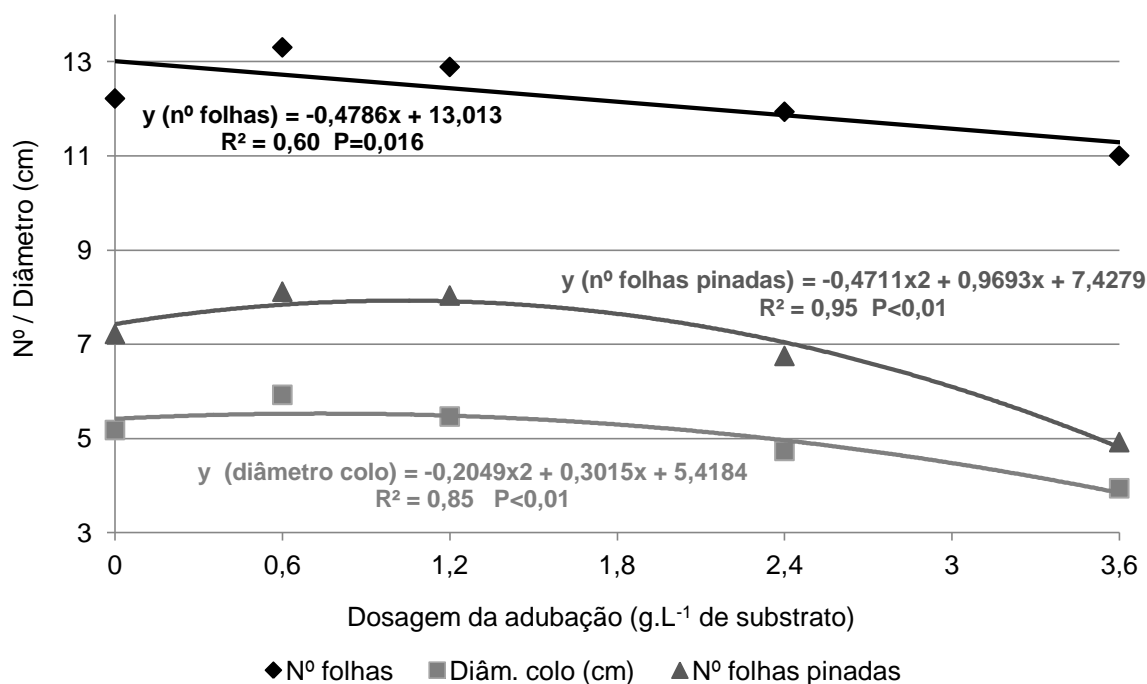


FIGURA 36. Avaliações do desenvolvimento das mudas de *Butia odorata* adubadas por 426 dias com diferentes doses de fertilizantes aplicados no substrato. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

As dosagens que induziram respostas superiores nas variáveis analisadas foram 0,6 e 1,2 g.L⁻¹. Conforme apontado na Figura 34, a CE do lixiviado destes tratamentos aumentou gradativamente desde o início das aplicações até cerca de 10 meses depois, quando teve uma estabilização e leve declínio, possivelmente pela diminuição da frequência de aplicação, conforme já mencionado anteriormente. Contudo, de acordo com a equação da regressão, a CE máxima destes tratamentos foi de 5 mS.cm⁻¹, na concentração 1,2 g.L⁻¹. Associando estas informações, pode-se inferir que esse é o limite máximo de CE do substrato tolerável pela espécie, acima do qual há diminuição de intensidade de crescimento.

Esses resultados indicam que, em relação à tolerância a salinidade no substrato visando à maior produtividade, *B. odorata* encontra-se em uma faixa média para a maioria das espécies. Segundo Cavins *et al.* (2000), a faixa de CE entre 2,6 e 4,5 mS.cm⁻¹, determinada pelo método *pour thru*, é considerada

padrão, comum para a maioria das plantas. De acordo com esses autores, acima de $4,6 \text{ mS.cm}^{-1}$ é considerada uma CE elevada, e passa a diminuir o vigor e a taxa de crescimento da maioria das espécies.

Conforme Kämpf (2000), quanto à sensibilidade aos sais, as plantas dividem-se entre aquelas muito sensíveis, cuja adubação não pode exceder 1 g de sais por litro de substrato, plantas tolerantes, cuja faixa aceitável é 1 a 2 g.L^{-1} , e as exigentes, cuja adubação deve ser de cerca de 3 g.L^{-1} . De acordo com essa classificação, os resultados obtidos no presente estudo, *B. odorata* situa-se entre as sensíveis e as tolerantes, uma vez que a faixa de melhor resposta para as variáveis diâmetro do caule e número de folhas pinadas foi de 0,74 e $1,1 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Peruzzi *et al.* (1999) avaliaram o crescimento de mudas de *Eucalyptus globulus* em substrato casca de pinus com diferentes doses de fertilizante formado por 60% de superfosfato simples e 40% de adubo de liberação lenta. As mudas emergiram no próprio substrato e permaneceram até os 100 dias. As variáveis analisadas apresentaram desenvolvimento diretamente proporcional à quantidade de adubo aplicado, sendo as respostas superiores na dosagem de 7,5 Kg de fertilizante por metro cúbico de substrato ($7,5 \text{ g.L}^{-1}$).

Não foram encontrados trabalhos com adubação de plantas da espécie *B. odorata*. Além disso, são raros os trabalhos disponíveis com adubação de outras espécies do gênero *Butia*.

A adubação de plantas jovens de *B. capitata* a campo foi testada por Aquino *et al.* (2009). Embora utilizando diferentes dosagens de fertilizantes mineral e orgânico, após quarenta e três meses de aplicação os autores não identificaram diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, a qual foi estabelecida em solo de cerrado, em Minas Gerais, sem fertilização durante o

período. Os autores atribuíram a ausência de resposta das plantas à adubação aplicada, devido ao fato de a espécie sobreviver e produzir em solos que apresentam, em geral, baixa fertilidade. Além disso, segundo informado, o local onde foi desenvolvido o experimento já apresentava fertilidade naturalmente alta, o que poderia suprir as plantas quanto às suas exigências naturais.

Conforme Geymonat e Rocha (2009), *B. odorata* é uma espécie tolerante à salinidade e à maresia, sendo utilizada em regiões de balneários em diversas partes do mundo. Richards (1954) referiu que solos salinos analisados pelo método de “pasta saturada” apresentam CE acima de 4 mmho.cm^{-1} ($1 \text{ mmho.cm}^{-1} = 1 \text{ mS.cm}^{-1}$). Este valor corresponde a de $5,22 \text{ mS.cm}^{-1}$, quando determinado pelo método *pour thru*, conforme a relação indicada por Cavins (2000). Ou seja, o solo pode ser considerado salino quando apresentar valores acima de $5,22 \text{ mS.cm}^{-1}$ pelo método *pour thru*. Este valor está acima do limite máximo que as mudas de *B. odorata* suportaram, sem interferência no desenvolvimento. Em função disso, pode-se concluir que, para o cultivo da espécie visando à máxima produtividade, os solos salinos devem ser evitados, pelo menos até a fase juvenil.

Analisando o desenvolvimento médio das plantas, percebe-se que o número de folhas fotossinteticamente ativas por planta aumentou de forma contínua até cerca de 270 dias do início do experimento, o que corresponde ao final do mês de abril. A partir desse período, o número de folhas manteve-se relativamente estável, com leve aumento a partir do final do mês de julho (Figura 37). Além da condição ambiental menos favorável à fotossíntese nesse período, também ocorreu o início da emissão das folhas pinadas, às quais são de maior tamanho e, conseqüentemente, demandam maior energia da planta para sua formação, o que poderia explicar a estabilização do número total de folhas por planta nesse período.

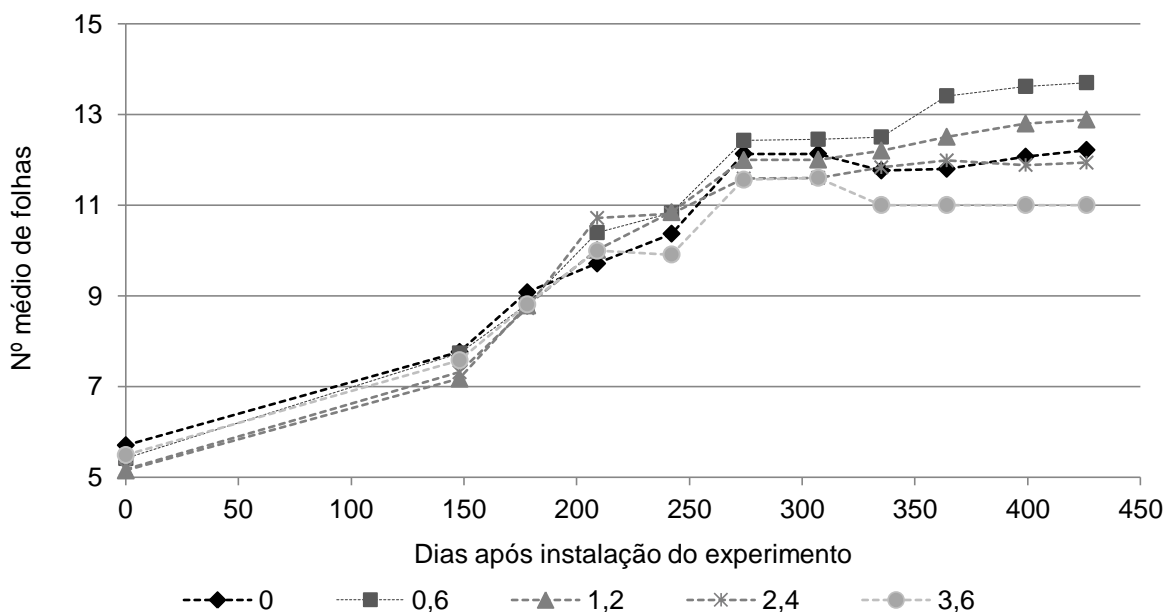


FIGURA 37. Número médio de folhas presentes em mudas de *Butia odorata* ao longo do período de condução do experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

A emissão das primeiras folhas pinadas foi observada aos 120 dias desde o início do transplante (cerca de 440 dias desde a germinação). Aos 148 dias, 28% das plantas haviam emitido pelo menos uma folha pinada, sem diferença estatística entre os tratamentos (Kruskal-Wallis, $P=0,662$) e aos 178, 209 e 242 dias, 74, 86 e 97%, respectivamente. Considerando que na ocasião da instalação do experimento as mudas tinham, em média, 322 dias desde a germinação, a emissão de folhas pinadas, em pelo menos 50% das plantas ocorreu, aproximadamente, aos 480 dias (cerca de 16 meses). Esse, portanto é o tempo que 50% das plantas conduzidas em casa de vegetação levaram para atingir a fase “juvenil 2”, conforme classificação de Bernacci *et al.* (2008) para mudas de *Syagrus romanzoffiana*. Contudo, para as plantas de *B. odorata*, não foi possível distinguir claramente a fase “Juvenil 1”, a qual, segundo esses autores, caracteriza-se por apresentar eófilos jovens mais espessos, antes da emissão das

folhas pinadas (Figura 38).

O aumento médio do número de folhas pinadas por planta foi praticamente contínuo e uniforme desde o início da emissão até meados do mês de março. A partir desse período, foi menos intenso, possivelmente em função da diminuição da temperatura e do fotoperíodo.

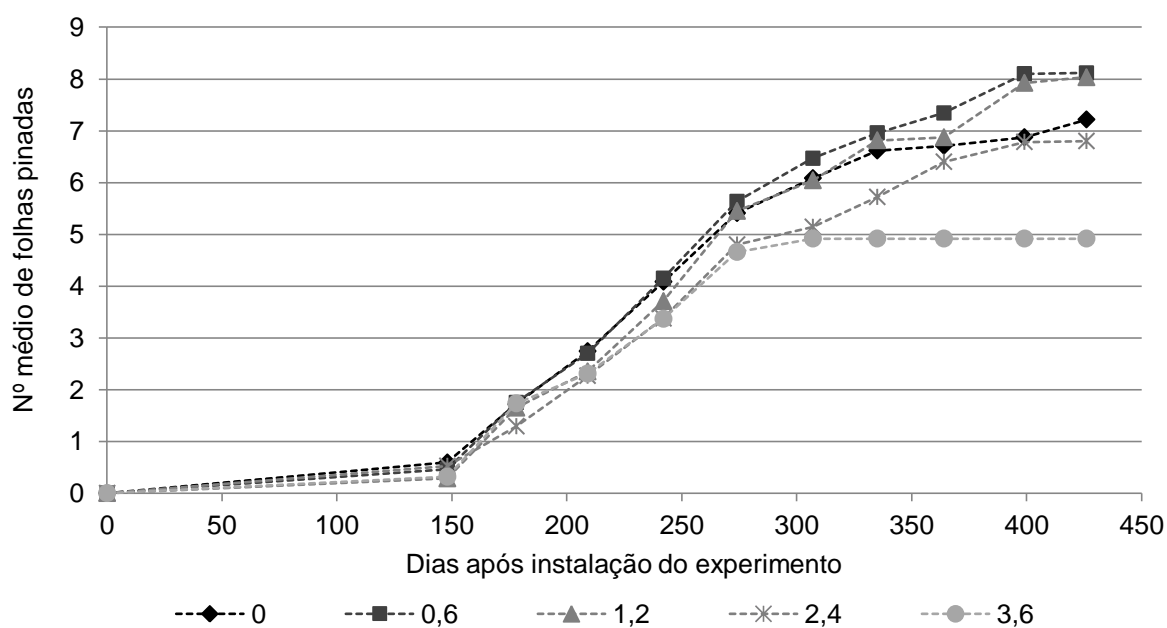


FIGURA 38. Número médio de folhas pinadas presentes em mudas de *Butia odorata* ao longo do período de condução do experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

Analisando a evolução da variável diâmetro do caule, nos tratamentos com as duas menores dosagens de fertilizantes, percebe-se que ao longo da condução do experimento o crescimento das plantas foi praticamente contínuo mesmo com temperaturas e fotoperíodo reduzidos (Figura 39). A evolução dessa variável apresentou-se muito similar na segunda etapa do experimento com desenvolvimento inicial de mudas. Este comportamento parece ser uma característica da espécie que, quando as condições ambientais estão menos

favoráveis, diminui a intensidade de emissão de folhas, mas prossegue o desenvolvimento em espessura do caule. Esta é uma informação interessante a ser investigada, pois, ao que tudo indica, durante o períodos mais favoráveis à fotossíntese, os fotoassimilados são destinados às mais diversas demandas do desenvolvimento vegetal, enquanto que no curto período de temperaturas baixas o desenvolvimento prioritário é o aumento da espessura do caule.

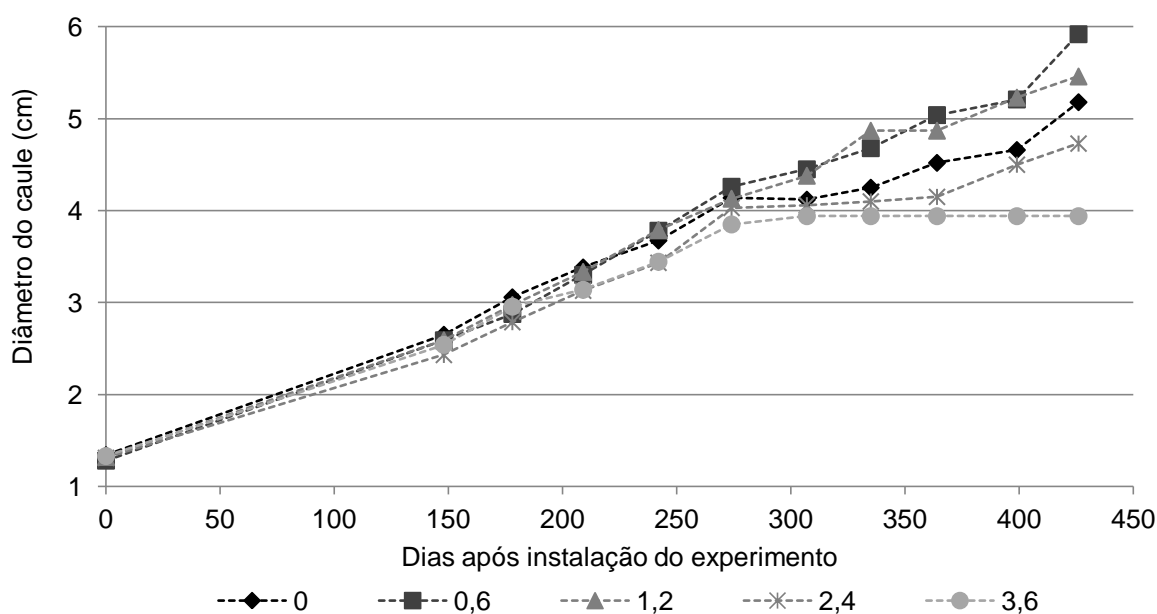


FIGURA 39. Diâmetro do caule de mudas de *Butia odorata* ao longo do período de condução do experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

Os sintomas de distúrbio nutricional visualizados nas plantas consistiram de folhas jovens amareladas, sendo observados desde a sua emissão. Algumas apresentavam uma pequena descoloração na folha mais jovem, podendo ou não evoluir para maiores áreas da folha, enquanto que outras apresentavam grandes porções, ou até mesmo toda a área foliar de pigmentação amarelo-clara. A estes sintomas, conforme a área foliar (em escala visual) e o número de folhas atingidas, atribuiu-se número crescente de um a quatro, diretamente proporcional

à intensidade. Quando em maiores intensidades, além das folhas amareladas, algumas apresentavam bordas necrosadas, a estas foi atribuído o número cinco, como máximo na escala de intensidade. Esses sintomas foram percebidos somente a partir da avaliação aos 242 dias após o início das adubações. No entanto, nessa avaliação, todas as plantas adubadas com $3,6 \text{ g.L}^{-1}$ apresentaram sintomas, enquanto que no tratamento com a segunda maior dose ($2,4 \text{ g.L}^{-1}$) o percentual de plantas com sintomas apresentou uma variação relacionada ao período, diminuindo a intensidade nos meses de temperatura e fotoperíodo reduzido. No entanto, apresentou aumento contínuo a partir do final do inverno, chegando a 100% das plantas no início da primavera (Figura 40).

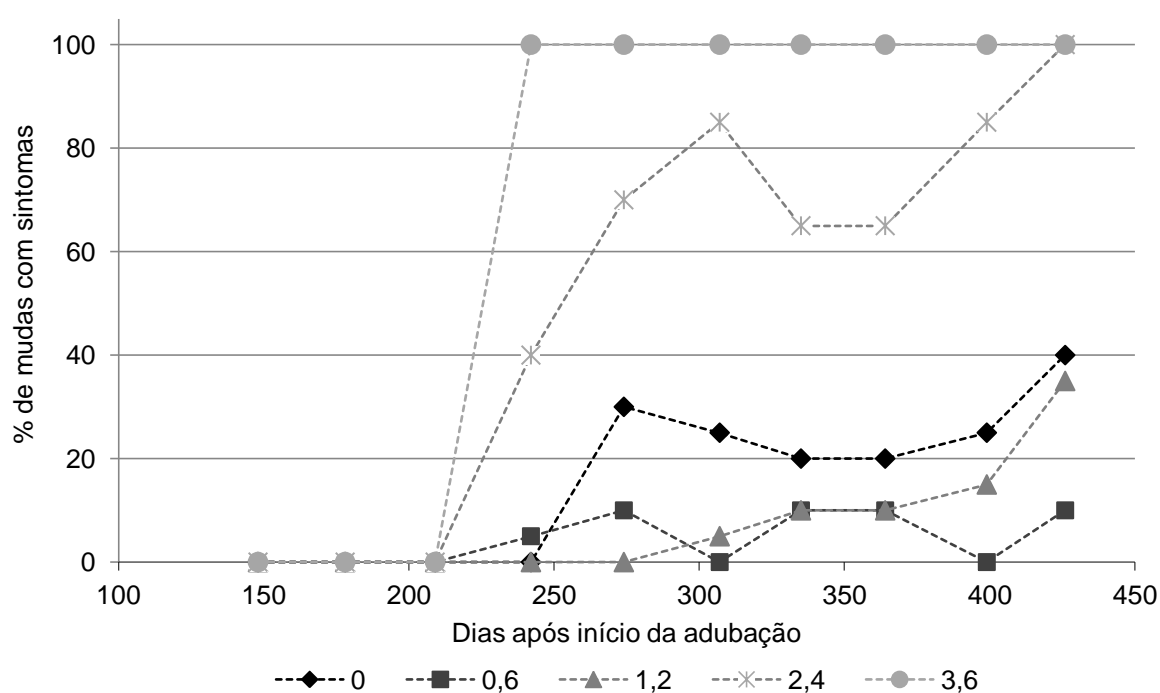


FIGURA 40. Percentual de mudas de *Butia odorata* com algum sintoma de distúrbio nutricional ao longo do período de condução do experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L^{-1} de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

Nos demais tratamentos o percentual máximo de plantas com sintomas

ocorreu entre as plantas não adubadas, que chegou a 40%, também no final da primavera. Possivelmente nesse tratamento os nutrientes disponibilizados pelo substrato não tenham sido suficientes, desencadeado a manifestação dos sintomas a partir deste período. O menor percentual de plantas com sintomas foi observado no tratamento com a dosagem de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, que oscilou entre 0 a 10% ao longo do período do experimento.

O surgimento dos sintomas de distúrbios nutricionais nas plantas adubadas ocorreu, em geral, quando a CE do substrato superou a faixa de 4 a 5 mS.cm^{-1} . Assim, confirmando o que foi observado na análise do desenvolvimento das plantas, esta parece ser a faixa de CE limite tolerável pela espécie, sem diminuição da taxa de crescimento.

A intensidade dos sintomas foi maior no tratamento com a dosagem mais alta de fertilizante, sendo que 100% das plantas atingiram a escala máxima (número 5) por volta dos 330 dias depois do início das adubações. Nessa condição, as plantas apresentavam folhas jovens uniformemente amareladas, e com as bordas necrosadas (Figura 41). Apesar disso, as folhas mais velhas permaneciam verde-escuras e sem sintoma de distúrbio nutricional. Houve a morte de três plantas desse tratamento, evidenciando a intolerância da espécie a esse nível de salinidade (Figura 42).

Na segunda maior dosagem, a escala média de sintomas nas plantas foi inferior a “3”, indicando que esse nível de salinidade, apesar de elevado, não provoca danos tão severos às plantas. Semelhante ao que foi relatado para o percentual de plantas com sintomas, também foi observada queda na intensidade nos meses de inverno, quando, além da diferença nas variáveis climáticas, diminuindo a demanda evaporativa, houve redução da periodicidade das aplicações.



FIGURA 41. Mudanças de *Butia odorata* com as intensidades dos sintomas de distúrbio nutricional considerados representativos da escala utilizada na avaliação ao longo do experimento. **A:** Escala zero (sem sintoma); **B:** escala 1; **C:** escala 2; **D:** escala 3; **E:** escala 4; **F:** escala 5; FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

Nos tratamentos com as duas menores dosagens, mais o “controle”, a intensidade de sintomas foi bastante reduzida. A média na escala de sintomas entre os tratamentos foi inferior a “1”, evidenciando o melhor aspecto visual destas plantas em relação aos dois outros tratamentos.

De acordo com Bataglia e Furlani (2010) os sintomas de distúrbio nutricional verificados nas folhas jovens de palmeiras podem ser associados à deficiência de cálcio, enxofre, boro, ferro, manganês, zinco e cobre. No entanto, conforme esses mesmos autores, as alterações no desenvolvimento de palmeiras por distúrbios nutricionais podem também estarem associadas ao excesso de

nutrientes. Essas informações corroboram os dados do presente trabalho, evidenciando o que foi observado para a espécie *B. odorata*.

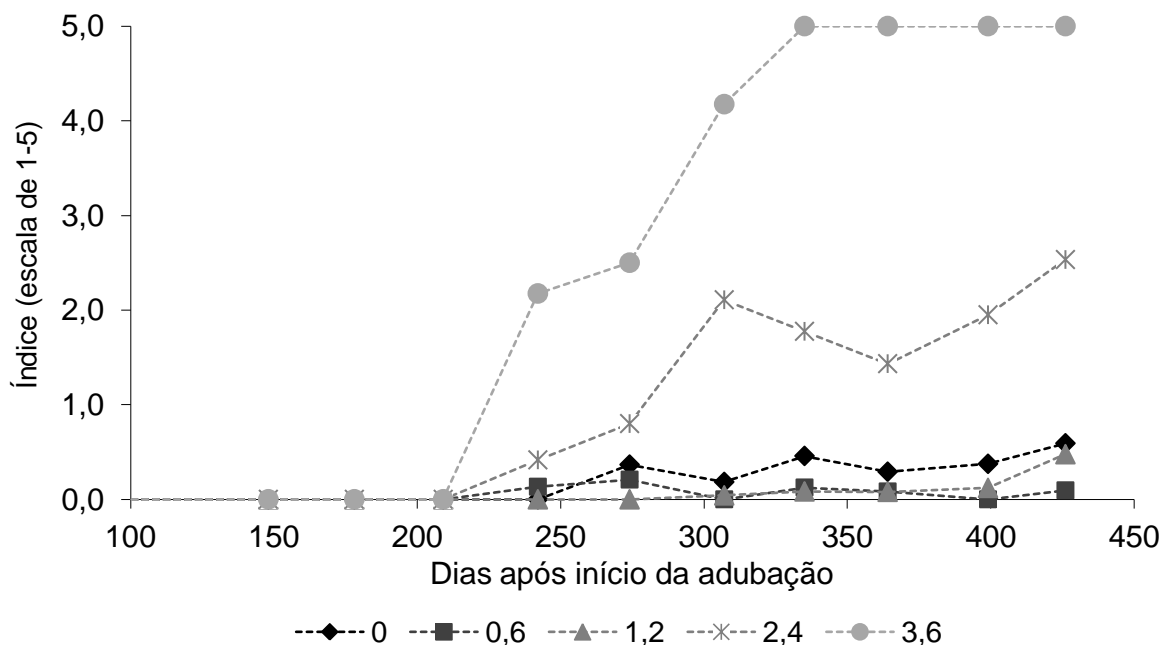


FIGURA 42. Intensidade dos sintomas de distúrbio nutricional em mudas de *Butia odorata* ao final de 426 dias em experimento de adubação com 0; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,6 g.L⁻¹ de fertilizantes. FZB-RS, Porto Alegre, 2011.

Para Bataglia e Furlani (2010), a coloração uniformemente amarelada das folhas jovens de palmeiras é um sintoma característico de deficiência de enxofre. Considerando que os sintomas observados nas plantas do presente estudo se assemelham muito a essa descrição, pode-se inferir que, apesar da aplicação de enxofre como parte da adubação dos tratamentos, possivelmente o excesso de salinidade, de maneira geral, favoreceu a absorção em maior proporção de alguns elementos, em detrimento a outros, o que pode explicar a presença dos sintomas de deficiência de enxofre.

O diagnóstico visual é o procedimento mais simples para a identificação de problemas nutricionais e é adequado para identificação de deficiências de N, K,

Mg, Mn e B. Muitas deficiências, entretanto, têm sintomas semelhantes, o que leva à necessidade de análises químicas para esclarecimento (Bataglia e Furlani, 2010). Não foram realizadas análises químicas de tecidos das plantas nesse experimento, pois considerou-se que a retirada de partes da planta para análise poderia comprometer a execução de experimentos posteriores, principalmente relacionados à investigação do período de juvenilidade das plantas, o qual fora estabelecido a campo e continuará sendo acompanhado como parte de um projeto posterior ao presente trabalho. No entanto, salienta-se que a avaliação pela análise de tecidos seria imprescindível para um próximo estudo, a fim de confirmar se os sintomas observados conferem com as informações de literatura para outras espécies de palmeiras.

Os sintomas de distúrbio nutricional observados nas folhas das plantas de alguns tratamentos, provavelmente são devidos ao excesso de salinidade no substrato, dificultando a absorção, pela diminuição do potencial da água. Os solutos dissolvidos na zona das raízes das plantas geram um potencial osmótico baixo (mais negativo), que diminui o potencial hídrico do solo. Assim, o balanço hídrico geral das plantas é afetado, pois, para se desenvolver, as plantas necessitam de um potencial ainda mais baixo a fim de manter um gradiente de potencial hídrico entre o solo e as folhas (Taiz e Zeiger, 2004).

Plantas submetidas a estresse por falta de água, ou por salinidade excessiva, são estimuladas a acumular e manter níveis elevados de solutos orgânicos no citoplasma à custa de energia desviada de funções de crescimento. Esse acúmulo de osmorreguladores é uma forma de reduzir o potencial osmótico interno das células, e conseqüentemente o potencial da água, gerando um gradiente favorável à absorção pelas raízes. Esse fenômeno é denominado de ajuste osmótico ou condicionamento osmótico, e reduz a taxa de crescimento da

planta (Taiz e Zeiger, 2004; Verslues *et al.*, 2006). Ao que tudo indica, essas informações justificam a redução da taxa de desenvolvimento das mudas dos tratamentos com as dosagens mais altas de fertilizantes.

Mesmo nos tratamentos mais favoráveis às plantas, o desenvolvimento das mudas ao longo do período de acompanhamento não foi uniforme em relação às três variáveis analisadas. Parece haver uma definição de prioridade no desenvolvimento das estruturas vegetativas, determinada, em parte, pela disponibilidade de fotoassimilados. Ao que tudo indica, o espessamento do caule ocorre de forma contínua, independente da época do ano. A emissão de folhas durante a fase juvenil parece seguir um sincronismo orientado pela relação folhas iniciais/folhas pinadas. Quando iniciou a formação das folhas pinadas, diminuiu a intensidade do aumento do número total de folhas, e, para os dois tratamentos aparentemente menos favoráveis (controle e a maior dosagem), houve uma queda no número total de folhas fotossinteticamente ativas no período do inverno, o que sugere que a planta sacrifica algumas folhas primárias para abastecer a emissão de folhas pinadas quando as condições são menos favoráveis para a produção de fotoassimilados. No entanto, esta é apenas uma especulação, uma vez que as análises realizadas não permitem conclusões a essa profundidade de detalhes fisiológicos.

4.7.1 Ocorrência de pragas durante a condução do experimento

A partir do início da primavera foi observado o surgimento de cochonilhas em diversas plantas, indiferentemente do tratamento de adubação. A partir de então, passaram a ser administradas doses de óleo mineral, sempre que observada a presença destes insetos. De acordo com identificação a espécie observada é *Abgrallaspis cyanophylli* (Figura 43).

Foi observada a presença de pulgão-preto (*Aphididae*) em várias mudas, principalmente entre os períodos de aplicação do óleo mineral, os quais diminuía consideravelmente após esse procedimento, sem a necessidade de utilização de outro defensivo para seu controle.

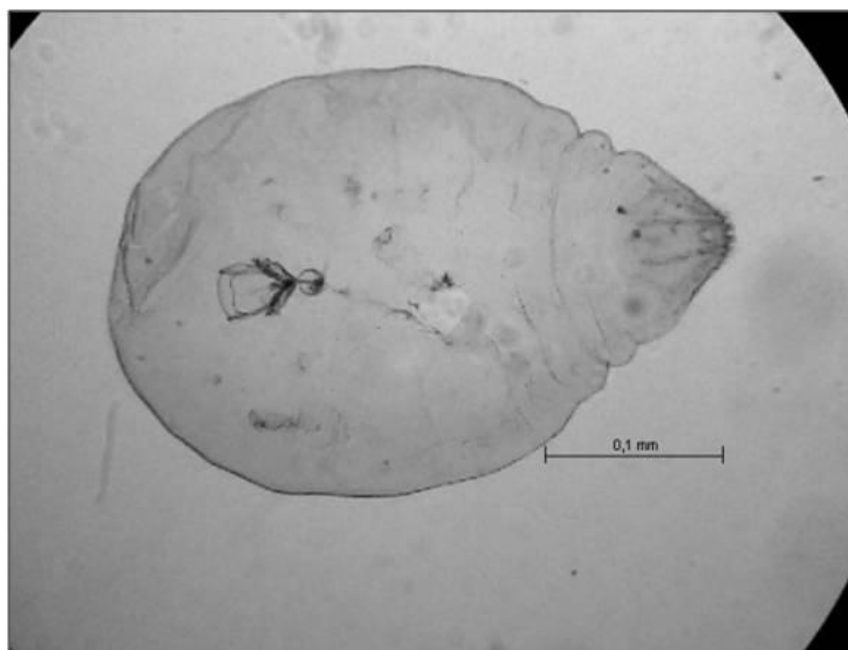


FIGURA 43. Cochonilha *Abgrallaspis cyanophylli* observada em mudas de *Butia odorata*. Corpo corado em fuccina ácida após clareamento. Coleta e processamento: Gabriela Chesim de Souza. Identificação: Dra. Vera Wolff. FEPAGRO, Porto Alegre, RS, 2011.

Também durante a primavera, foram encontradas lagartas (lepidópteros) se alimentando de folhas primárias, e em um caso, de uma folha pinada. A pulverização de *Bacillus thuringiensis* demonstrou-se eficiente no controle (Figura 44).

Eventualmente eram observados sintomas e sinais de tripes (*Thysanoptera, Phlaeothripidae*), caracterizados por pequenos pontos semi-circulares esbranquiçados no limbo das folhas primárias. Além dos já mencionados, Não foi utilizado produto fitossanitário específico para o controle

deste inseto.

Durante os meses de dezembro e janeiro, foram observados sintomas em folhas recém emitidas, inicialmente muito semelhantes a manchas foliares provocadas por distúrbios nutricionais, mas através de observação mais detalhada, foi possível observar que as manchas estavam associadas a pequenas extensões necrosadas nas bordas das folhas, em sentido longitudinal, na base das mudas (Figura 45). Através de análise em microscópio foi identificado que tratava-se de um ácaro (*Eriophyidae*) (Figura 46). A região da planta atacada foram as bases das folhas novas, principalmente a região próxima ao ponto de crescimento.

O controle foi realizado através de duas aplicações com intervalo quinzenal de acefato (Orthene® 750 BR), 1 g.L⁻¹. A partir da segunda aplicação, não foram mais percebidos sintomas recentes nas plantas.

Pelo que foi observado, dificilmente a infestação dos ácaros teria provocado a morte de alguma muda na fase do desenvolvimento em que as se encontravam. No entanto, em trabalhos de germinação realizados na mesma época, houve perdas de plântulas recém germinadas, às quais manifestavam os mesmos sintomas aqui descritos, seguido de secamento total da planta devido, possivelmente, aos danos causados pelos ácaros no ponto de crescimento.



FIGURA 44. Lepidóptero em folhas primárias de *Butia odorata*. Fundação Zoobotânica, Porto Alegre, RS, 2011.

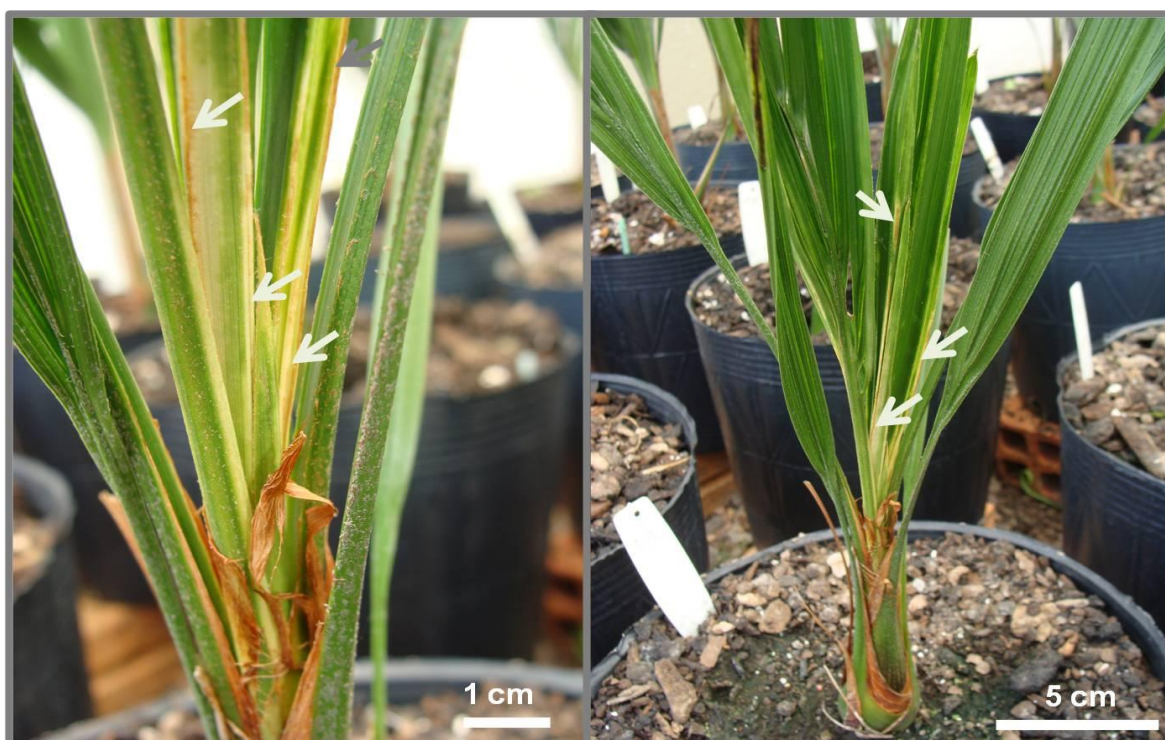


FIGURA 45. Sintoma de ataque de *Eriophyidae* em mudas de *Butia odorata* em casa de vegetação. Setas: localização dos principais sintomas. Fundação Zoobotânica, Porto Alegre, RS, 2011.

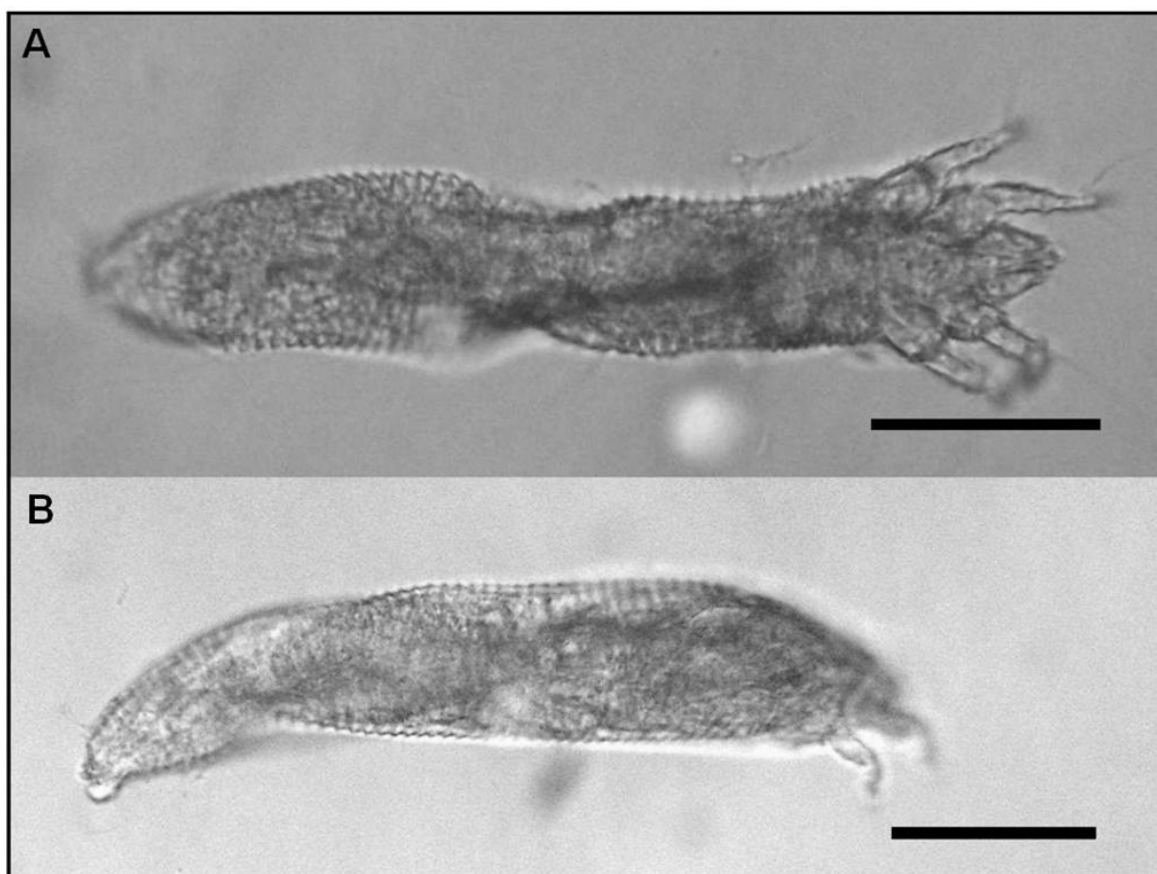


FIGURA 46. Ilustração de um indivíduo de ácaro (*Eriophyidae*) em mudas de *Butia odorata* em casa de vegetação. **A**: vista ventral; **B**: vista lateral. Barra: 50µm. Identificação e Foto: Dra. Ana Paula Ott. Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011).

5 CONCLUSÕES

- Diásporos de *B. odorata* de uma mesma população apresentam teor de água com variação significativa entre matrizes e entre condições visuais de maturação;
- A massa de 1000 diásporos é bastante variável entre plantas de uma mesma população. Com teor de umidade próxima a 11%, 1000 diásporos pesam, em média, 1,90 Kg;
- O desenvolvimento de embriões isolados *in vitro* é rápido e com elevado percentual de viabilidade, indicando a ausência de dormência fisiológica;
- As três sementes formadas em um diásporo apresentam potencial semelhante para formação de plantas normais;
- Sementes de *B. odorata* armazenadas em ambiente com baixa umidade do ar e temperatura moderada mantêm viabilidade elevada por, pelo menos, três anos;
- A abertura da cavidade embrionária das sementes de *B. odorata* e *B. capitata* permite a superação da dormência;
- A longevidade das sementes, a condição mais favorável de armazenamento, a viabilidade após conservação em temperatura sub-zero e dessecação a baixos percentuais de umidade, sugerem comportamento fisiológico ortodoxo;
- Explantes de inflorescência imatura não responderam à indução *in vitro*, porém, não apresentaram contaminação;
- Plântulas de *B. odorata* apresentam enraizamento *in vitro* satisfatório em meio de cultivo com a auxina ANA combinado a concentrações de sacarose entre 3 e 4,5%;
- Embriões zigóticos formam calos em meio de cultivo com concentrações elevadas de 2,4-D;
- Plântulas em desenvolvimento até a fase juvenil não apresentam exigência

elevada em adubação e correção de pH, desde que mantidas em substrato orgânico estabilizado e com densidade moderada;

- Mudas em fase juvenil têm seu desenvolvimento prejudicado se a condutividade elétrica do substrato for superior a 5 mS.cm^{-1} ;
- Nas condições climáticas e fotoperiódicas de Porto Alegre, RS, mudas conduzidas em casa de vegetação sem controle de temperatura e umidade, e com 50% de sombreamento, sob manejo de irrigação e fertilização adequada, emitem as primeiras folhas pinadas com cerca de um ano e três meses após a germinação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1449-1452, 2006.

ALTAMURA, M. M. et al. Histological study of embryogenesis and organogenesis from anthers of *Vitis rupestris* du Lot cultured *in vitro*. **Protoplasma**, Viena, v. 171, p. 134-141, 1992.

AQUINO, C. F. et al. Desenvolvimento do Coquinho-Azedo (*Butia capitata*) Face à Aplicação de Adubação Mineral e Orgânica no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Brasília, v. 4, n. 2, p.1768-1771, 2009.

ARRUDA, F. B.; PIRES, R. C. M.; SAKAI, E. Irrigação. In: MATHES, L. A. F.; UZZO, R. P; (Org.). **Palmeiras Ornamentais: produção e cultivo**. Campinas: Fundag, 2010. p. 31-42.

ASEMOTA, O.; EKE, C. R.; ODEWALE, J. O. 2007 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, 2010.

AZAMBUJA, P. **Tahim – a última divisa: geografia e história de uma região**. Santa Vitória do Palmar: Ed. Polygraph Serigrafia & Stillus Artes Gráficas, 2001. 251p.

BADAWY, E. M. et al. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera*) plants by using tissue culture technique. **Arab Journal of Biotechnology**, Giza, v.8, n. 2, p. 343-354, 2005.

BÁEZ, F.; JAURENA, M. **Regeneración de palmar de Butiá (*Butia capitata*) en condiciones de pastoreo: revelamiento de establecimientos rurales de Rocha**. Rocha: PROBIDES, 2000. 35p. (Documentos de trabajo 27)

BALLARIN, M. C. C. Nutrición mineral y abonado para cultivo en sustratos de baja actividad química. In: BARBOSA, J. G. et al. (Ed.). **Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substrato**. Viçosa: UFV, 2004. p. 92-96

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998. 666 p.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 14, p. 1–16, 2004.

BATAGLIA, O. C.; FURLANI, P. R. Adubação. In: MATHES, L. A. F.; UZZO, R. P; (ORGS.). **Palmeiras Ornamentais: produção e cultivo**. Campinas: Fundag, 2010. p. 43-57.

- BEHLING, H. et al. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio. In: PILLAR, V. P et al. (Ed.). **Campos Sulinos** - conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009. 403p.
- BERNACCI, L. C. et al. Estrutura de estádios ontogenéticos em população nativa da palmeira *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman (Arecaceae). **Acta Botanica Brasileira**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 119-130, 2008.
- BOVI, M. L. A.; MARTINS, C. C.; SPIERING, S. H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeitos sobre a germinação e o vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 109–112, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- BROSCHAT, T. K. Palm nutrition guide. University of Florida Extension. **Circular SS-ORH-02**, Gainesville. 2000, 6p.
- BROSCHAT, T. K. Pindo Palm (*Butia capitata*) Seed Germination Revisited. TropicLine – **Horticulture Newsletter of the University of Florida Fort Lauderdale Research & Education Center**. v. 10 n. 3-4, 1998., Disponível em: <http://flrec.ifas.ufl.edu/pdfs/TropicLine/TropicLine_10-3-4.pdf>. Acesso em: 30 mar 2011.
- BUSH, C. S. The palm: *Butia capitata* x *Arecastrum romanzoffianum*. **Proceedings of the annual meeting**, Florida State Horticultural Society, Gainesville, v. 86, p. 470-473, 1974.
- BÜTTOW, M. V. et al. Conhecimento tradicional associado ao uso de butiás (*Butia* spp., Arecaceae) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1069-1075, 2009.
- CARDOSO, M. C. **El palmar, la palma y el butiá**. Montevideo: Productora Editorial, 1995, 23p. (Fichas didáticas n. 4.)
- CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A.G. ; BORGHETTI, F (Org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 323p.
- CARPENTER, W. J. Seed after-ripening and temperature influence in *Butia capitata* germination. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 4, p. 702-703. 1988.
- CARPENTER, W. J.; OSTMARK, E. R. Temperature and desiccation affect the germination of *Chamaedorea* palm seed. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Gainesville, v. 107, p. 183-186, 1994.
- CARVALHO, N. M; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargil. 1983. 429p.
- CAVINS, T. J. et al. **pH and EC Meters - Tool for Substrate Analysis**. Carolina do Norte: NC State University. Florex 001, 2000.
- CLAUMANN, A. D. et al. Indução da Embriogênese Somática em *Butia eriospatha*

Mart. ex Drude (Arecaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 16.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS; 3.; SIMPÓSIO DE PLANTAS ORNAMENTAIS NATIVAS, 2007, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBFPO/ABCTP, 2007, 1 CD-ROM.

CHARLO, H. C. O. et al. Aspectos morfológicos, germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Archontophoenix alexandrae* (F. Mueller) H. Wendl. E. Drude (Arecaceae) em diferentes substratos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n.6, p.933-940, 2006.

CID, I. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, 303p.

CORRÊA, L. B. et al. Caracterização citológica de palmeiras do gênero *Butia* (Arecaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1111-1116, 2009.

COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. **Informativo ABRATES**, Lavras, v. 18, n. 1/2/3, p. 39-50, 2008.

COSTA, F. H. S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

CRUZ-HERNANDEZ, A. et al. Agrobacterium tumefaciens - mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. **Plant Cell Reports**, New York. v. 17, n. 6-7, p. 497-503, 1998.

DEBLE, L. P.; MARCHIORI, J. N. C. *Butia lallemantii*, uma nova Arecaceae do Brasil. **Balduinia**, Santa Maria, v. 9, p.1-3, 2006.

DE BOODT, M; VERDONCK, O. The physical properties of the substrates in horticulture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 26, p.37-44, 1972.

DE LA VIÑA, G.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media in irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill. microcuttings. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65 p. 229-237. 2001.

DICKIE, J. B.; BALICK, M. J.; LININGTON, I. M. Experimental investigations into the feasibility of *ex situ* preservation of palm seeds; an alternative strategy for biological conservation of this economically important plant family. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 1, p.112-119. 1992.

DODEMAN V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, n. 48, p. 1493-1509, 1997.

EBERT, A.; TAYLOR, H. F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 20, p. 165-172, 1990.

EBERT, A.; TAYLOR, H. F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 33, p. 157–162, 1993.

EEUWENS, C. J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 36 p. 23-28, 1976.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, n.230, p.1167-1174, 1990.

EPAGRI. **Receitas a base de butia-da-serra (*Butia eriospatha*)**. Florianópolis: EPAGRI, 2007. 46p. (Boletim Didático, 77)

ESPINOSA, B. M. **Biología y conservación del palmar de butiá en la Reserva de Biosfera Bañados del Este**. Avances de investigación. Rocha: PROBIDES, 2001. 33p. (Documentos de Trabajo 34)

FERREIRA, S. A. N.; GENTIL, D. F. O. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 2, p. 141-146, 2006.

FIOR, C. S.; CALIL A. C.; LEONHARDT C. *Siphocampylus betulaefolius* (Cham.) G. Don: propagação e o potencial ornamental. **Iheringia – Série Botânica**, Porto Alegre, v. 59, n. 2, p. 207-210, 2004.

FIOR, C. S.; LATTUADA, D. S.; SCHWARZ, S. F. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* e *Butia capitata* (ARECACEAE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20; ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 54, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: DCM/Incaper, 2008. 1 CD-ROM.

FIOR, C. S. et al. Aspectos da propagação de *Persea willdenovii* Kosterm. (Lauraceae). **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 58, p. 27-44, 2007.

FIOR, C. S. et al. Formação de mudas de gerivá. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2003, Lavras. **Resumos....** Lavras: UFLA/FAEP, 2003. 462p.

GARCIA, V. A. et al. Características do resíduo de mineração de areia como componente de substratos para a produção de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 3, s. 1, p. 595-604, 2011.

GEYMONAT, G.; ROCHA, N. **M'botiá. Ecosistema único en el mundo**. Castillos: Casa Ambiental. 2009. 405 p.

GLASSMAN, S. F. A conspectus on the palm genus *Butia* Becc. **Fieldiana Botany**, Chicago, v. 32, n. 10, p. 127-172, 1970.

GOMES, K. K. P. et al. Indução de calo a partir de eixo embrionário de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 124-126, 2004.

GOMES, P. B.; VÁLIO, I. F. M.; MARTINS, F. R. Germination of *Geonoma brevispatha* (Arecaceae) in laboratory and its relation to the palm spatial distribution in a swamp forest. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p.16–20, 2006.

GOMEZ-LIM, M. A.; LITZ, R. E. Genetic transformation of perennial tropical fruits. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Oxon, v. 40, n. 5, p. 442-449, 2004.

GORRET, N. et al. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. **Journal of Biotechnology**, Ankara, v. 108, p-253-263, 2004.

GRUSZYNSKI, C. **Produção comercial de crisântemos: vaso, corte e jardim**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001, 166p.

GRUSZYNSKI, C. **Resíduo agro-industrial “casca de tungue” como componente de substrato para plantas**. 2002. 100f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

GUERRA, M. P. et al. Embriogênese somática e micropropagação do palmito (*Euterpe edulis* Mart. – Arecaceae). In: REIS, M. S.; REIS, A. (Org.) **Euterpe edulis Martius – (Palmito) biologia, conservação e manejo**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000. p.150-162

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. (Org.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. 354p.

GUNN, B. F. The phylogeny of the Cocoeae (Arecaceae) with emphasis on *Cocos nucifera*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 91, n. 3 p. 505-522, 2004.

HANDRECK, K. ; BLACK, N. **Growing media for ornamental plants and turf**. Sydney: University of New South Wales, 1999. 448p.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 63 p. (IPGRI. Technical Bulletin n. 1)

JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 196-223, 2001.

JOHNSON, D. V. **Tropical palms - 2010 revision**. Rome: FAO, 2010. 241p. (Non-Wood Forest Products, n.10/Rev. 1) Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i1590e/i1590e.pdf>>. Acesso em: 16 nov 2011.

KANCHANAPOOM, K.; DOMYOAS, P. The origin and development of embryoids in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) embryo culture. **Science Ásia**, Bangkok, v. 25, p. 195-202, 1999.

KAHN, F. Life forms of Amazonian palms in relation to forest structure and dynamics. **Biotropica**, Baton Rouge, v. 18, p. 214-218. 1986.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. 2.ed. Guaíba: Agrolivros, 2005. 256 p.

KÄMPF, A. N. Seleção de materiais para uso como substrato. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Gênese, 2000. p.139-145.

KARUN, A. et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, Bangalore, v. 86, n. 12, 2004.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic, 1995. 495p.

LÉDO, A. S. et al. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 2, p.147-154, 2007.

LIENDO, A.; VILLEGAS, L.; ALVAREZ, R. C. Isolation, purification and characterization of protoplasts from wild and cultivated species of *Persea*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, S. 3, p.1617, 1997.

LINK, D.; NAIBO, J. G. Nível de infestação de *Butiobruchus* sp em amêndoas de butiazeiro. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 201-203. 1995.

LOPES, P. S. N, et al. Tratamentos físicos e químicos para superação de dormência em sementes de *Butia capitata* (Martius) Beccari. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 120-125, 2011.

LOPES, P. S. N. et al. Absorção de água em sementes de coquinho-azedo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 787-790, 2007.

LORENZI, H. et al. (Ed). **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. 367p.

LUDWIG, F. et al. Análise de crescimento de gérbera de vaso conduzida em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p.70-74. 2010.

LUZ, P. B.; PIVETTA, K. F. L. Armazenamento de sementes de *Archontophoenix cunninghamii* H. Wendl. & Drude (Palmeira real australiana). **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 4, p.349-354, 2010.

MACHADO NETO, N. B. et al. Casca de pinus: avaliação da capacidade de retenção de água e da fitotoxicidade. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 1, n. 1, p. 19-24, 2005.

MAGALHÃES, H. M. **Dormência e germinação de coquinho-azedo: substâncias inibidoras nos pirenos e morfoanatomia dos embriões e de plântulas**. 2011. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Área de concentração: Agroecologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Viçosa, 2011.

MAGALHÃES, M. M. et al. Viabilidade de sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata*) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20; ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 54, 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: DCM/Incaper, 2008. 1 CD-ROM

MARCATO, A. C. **Revisão taxonômica do gênero *Butia* (Becc.) Becc. e filogenia da subtribo *Butiinae* Saakov (Palmae)**. 2004. 147f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; NAKAGAWA, J. Desiccation effects on germination and vigor of King palm seeds. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n.1, p. 88-92. 2003.

MARTINS, C. C. et al. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.4, p.635-642, 2009.

MARTIN, T. N. et al. Utilização de vermiculita, casca de pinus e carvão na produção de mudas de pepino e de pimentão. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p.107-113. 2006.

MARTINS, C. C. et al. Teores de água crítico e letal para sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart. - PALMAE). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 125-132. 1999.

MEEROW, A. W.; BROCHAT, T. K. **Container Production of Palms**. (University of Florida Bulletin CIR 1163). Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/CN010>>. Acesso em: 17 nov 2011.

MEEROW, A. W. **Palm seed germination**. Gainesville, University of Florida, 1991. (Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida Cooperative Extension Service Bulletin, 274)

MELO, B. et al. Efeito de ANA e AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea da plântula da guaribeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.17, n.1, p.49-59, 2001.

MICHAUX-FERRIERE, N.; GROUT, H.; CARRON, M. P. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaeae) **American Journal of Botany**, Gainesville. v. 79, n. 2, p. 174-180, 1992.

MINAMI, K. **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. São Paulo: Fundação Salim Farah Maluf, 1995. 128p.

MOREL, G. M.; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **America Journal of Botany**. Saint Louis, v. 38, n. 2, p. 141-143, 1951.

MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961. 42p.

MOURA, E. et al. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 447-454, 2009.

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

NEGREIROS, G. F.; PEREZ, S. C. J. G. A. Resposta fisiológica de sementes de palmeiras ao envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 391-396, 2004.

NEVES, S. C. et al. Germinação *in vitro* de embriões de coquinho-azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae)] obtidos de frutos com diferentes graus de maturação. **Revista de Biologia Neotropical**. Goiânia, v.7, n.1, p.47-54, 2010.

NEVES, S. C. et al. Efeito de métodos de armazenamento e do tempo sobre a viabilidade de embriões de *Butia capitata* (Mart.) Beccari. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 59.; REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 31.; CONGRESSO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE CACTÁCEAS Y OTRAS SUCULENTAS, 4.; CONGRESS OF INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR SUCULENT PLANT STUDY, 30., Natal, 2008. **Anais...** Natal: UFERSA: UFRN: SBB, 2008a. 1 CD-ROM.

NEVES, S. C. et al. Efeito da luz sobre a germinação de embriões e desenvolvimento inicial de plântulas de *Butia capitata* cultivadas *in vitro*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 59., REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 31., CONGRESSO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE CACTÁCEAS Y OTRAS SUCULENTAS, 4., CONGRESS OF INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR SUCULENT PLANT STUDY, 30., Natal, 2008. **Anais...** Natal: UFERSA: UFRN: SBB, 2008b. 1 CD-ROM.

NIKLAS, K. J. **The evolutionary biology of plants**. Chicago: University of Chicago Press, 1997. 449 p.

NIZAM, K.; TE-CHATO, S. Optimizing of root induction in oil palm plantlets for acclimatization by some potent plant growth regulators (PGRs). **Journal of Agricultural Technology**, Bengali, v. 5, n. 2, p. 371-383, 2009.

NOVERO, A. et al. The influence of osmotic concentration of media on the growth of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) *in vitro*. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v.4, n.6, p.453-456, 2010.

OLIVEIRA, M. L. A. A. et al. Flora e Vegetação. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. (Org.). **Biodiversidade da região da Lagoa do Casamento e dos butizais de Tapes, Planície costeira do Rio Grande do Sul**. Brasília: MMA/SBF, 2007. p. 85-111.

OLIVEIRA, O. A.; TEIXEIRA, C. A. R.; ROCHA, N. O. Palmar de Tiburcio e os Currais de Palma. **Biblos**, Rio Grande, v. 23, n. 1, p. 101-112, 2009.

PANZA, V. et al. Effects of desiccation on *Euterpe edulis* Martius seeds. **Biocell**, Mendoza, v.31, n.3, p. 383-390, 2007.

PEDRON, F. A.; MENESES, J. P.; MENESES, N. L. Parâmetros biométricos de frutos, endocarpo e sementes de butiazeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 585-586, 2004.

PEREIRA, K. A. R. Ecofisiologia de germinação de *Butia purpurascens* Glassman: um estudo piloto. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 59., REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 31., CONGRESSO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE CACTÁCEAS Y OTRAS SUCULENTAS, 4., CONGRESS OF INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR SUCULENT PLANT STUDY, 30., Natal, 2008. **Anais....** Natal: UFERSA: UFRN: SBB, 2008. 1 CD-ROM.

PÉREZ, H. E. Promoting germination in ornamental palm seeds through dormancy alleviation. **HortTechnology**, Alexandria, v. 19, n. 4, p. 682-685, 2009.

PÉREZ, H. E.; CRILEY, R. A. Promoting germination in dormant seeds of *Pritchardia remota* (Kuntze) Beck., an endangered palm endemic to Hawaii, **Natural Areas Journal**, Bend, v. 28, n. 3, p. 251–260, 2008.

PEZZANI, F. **Reserva de Biosfera Bañados del Este, Uruguay**. Paris: UNESCO, 2007. 36p. (Documentos de trabajo n.37. Programa de Cooperación Sur-Sur., Illus, UY/2007/SC/ECO/PI/1)

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; AGUIAR, I. B. Maturação e dispersão de sementes. In: SEMENTES florestais tropicais. Brasília: ABRATES, 1993. p. 215-274.

PRITCHARD, H. W et al. 100-seed test for desiccation tolerance and germination: a case study on eight tropical palm species. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.32, n.2, p. 393-403, 2004.

PROBIDES. **Plan Director. Reserva de Biósfera Bañados del Este - Uruguay**. Rocha: PROBIDES, 1999.159p.

QUEIROZ, M. H. Botão germinativo do palmitreiro como indicador da germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 55-59, 1986.

REINERT, J. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, Heidelberg, v. 45, p. 344-345, 1958.

REYNOLDS, T. L. Pollen embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 33, p. 1-10, 1997.

REITZ, R. Palmeiras. In: R. REITZ (Ed.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1974. 189p.

RIBEIRO, L. M. et al. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 2, p. 133-139, 2011.

RICHARDS, L. A. (Ed.). **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: United States Salinity Laboratory, 1954. 160p.

RIVAS, M.; BARILANI, A. Diversidad, potencial productivo y reproductivo de los palmares de *Butia capitata* (MART.) Becc. de Uruguay. **Agrociencia**, México, v. 8. n. 1, p.11-20, 2004.

RIVAS, M. Desafíos y alternativas para la conservación *in situ* de los palmares de *Butia capitata* (Mart.) Becc. **Agrociência**, Montevideo, v. 9, n. 1-2, p.161-168, 2005.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.4, p.499-514, 1973.

ROBINSON, M. L. **Cultivated palm seed germination**. SP-02-09 University of Nevada. 2002. Disponível em: <<http://www.unce.unr.edu/publications/files/ho/2002/sp0209.pdf>>. Acesso em: 15 mai 2008.

ROSA, L.; CASTELLANI, T. T.; REIS, A. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 281-287, 1998.

ROSSATO, M. **Recursos genéticos de palmeiras do gênero *Butia* do Rio Grande do Sul**. 2007. 136 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

SÁENZ, L. et al. 2,4-diclorophenoxyacetic acid uptake and formation of embryogenic calli in coconut plumular explante cultured on activated charcoal-free media. **Revista Fitotecnia Mexicana**, México, v. 28, n. 2, p. 151-159, 2005.

SALDANHA, C. W. **Conservação *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius através da embriogênese somática**. 2007. 108f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Geomática, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação – um enfoque estatístico**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 2004. 248p.

SCHAFER, G.; SOUZA, P. V. D. Método não destrutivo para monitoramento da reação e salinidade do substrato na produção de mudas cítricas. **Laranja**, Corderópolis, v. 26, n. 1, p. 151-162, 2005.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência de regimes de temperatura e da secagem sobre germinação de diásporos de *Butia capitata* (Becc.). In: CONGRESO NACIONAL DE HORTIFRUTICULTURA, 11.; CONGRESO DE PROMOCIÓN DEL CONSUMO DE FRUTAS Y VERDURAS, 3., 2007, Montevideo. **Resumos...** Montevideo: Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura, 2007. 1 CD-ROM.

SCHWARTZ, E. et al. Avaliação de populações de *Butia capitata* de Santa Vitória do Palmar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.3, p. 736-745, 2010.

SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. Estudos de fórmulas para cálculo de germinação. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 62-73, 1995.

SILVA, B. M. S. et al. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Oenocarpus minor* Mart. (Arecaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2, p. 289-292, 2006.

SOARES, K. P.; LONGHI, S. J. Uma nova espécie de *Butia* (Becc.) Becc. (Arecaceae) para o Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 2, p. 203-208, 2011.

SOBRAL, M. et al. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos: RiMA/Novo Ambiente, 2006. 350p.

STEWART, F. C.; MAPES, M. O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, Gainesville, v. 45, p. 705-708, 1958.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 559p.

TAVARES A.R. et al. Jussara palm seed germination under different shade levels. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p.492-494, 2008.

TONIETTO, A.; SCHLINDWEIN, G.; TONIETTO, S. M. **Usos e potencialidades do butiazeiro**. Porto Alegre: Fepagro, 2009. 28p. (Circular Técnica, n. 26) Disponível em: <www.sct.rs.gov.br/include/download.php?arq=1256811442butia_oficial.pdf> Acesso em: 30 mar 2011.

VERDEIL, J. L. et al. Coconut clones through somatic embryogenesis. In: NAIR, M. K. (Ed.). **Advances in coconut research and development**, New Delhi: Oxford & IBH Pub.Co, 1993.

VERDEIL, J. L. et al. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L) : obtention de plusieurs clones de vitro plants Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis: obtention of several clone ramets. **Oléagineux**, Paris, v. 47, n. 7, p. 465-469, 1992.

VERSLUES, P. E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, n. 4, p.523-539, 2006

VILLA, F. et al. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 312, p. 118-124, 2007.

VON ARNOLD, S. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, p. 233-249, 2002.

WANG, H. C. et al. Plant regeneration through shoot formation from callus of

Areca catechu L. (Arecaceae). **Plant Cell Tissue & Organ Culture**, Dordrecht, v.75, p. 95-98, 2003.

WEATHERHEAD, M. A.; BURDON, J.; HENSHAW, G.G. Effects of activated charcoal as an additive plant tissue culture media: part 2. **Zeitschrift Pflanzenphysiol, Bodenkd**, v. 94, p.399-405, 1979.

WALDOW, D.A. G. et al. Melhor período para o subcultivo *in vitro* de embriões de *Butia capitata*. In: SIMPÓSIO DE BIODIVERSIDADE, 2007, Santa Maria. **Anais do....** Santa Maria, 2007a. p.23-24

WALDOW, D. A. G. et al. Germinação de embriões de *Butia capitata in vitro* com ácido giberélico. In: SIMPÓSIO DE BIODIVERSIDADE, 2007, Santa Maria. **Anais do....** Santa Maria, 2007b. p. 22-23

WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, Oxford, v.57, p.443-462, 1986.

WITJAKSONO; LITZ, R. E. Effect of gamma irradiation on embryogenic avocado cultures and somatic embryo development. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.77, p.139-147, 2004.

WITJAKSONO; LITZ, R. E.; GROSSER, J. W. Isolation, culture and regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.) protoplasts. **Plant Cell Reports**, New York, v.18, p.235-242, 1998.

WOODWARD, B.; PUONTI-KAERLAS, J. Somatic embryogenesis from floral tissue of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, Dordrecht, v.120, p.1-6, 2001.