

AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO DE SEGMENTOS DE RÁQUILAS DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA *IN VITRO*¹

Ana da Silva LEDO²

Osmar Alves LAMEIRA³

Abdlatiff K. BENBADIS⁴

Ilmarina Campos de MENEZES⁵

Maria do Socorro Padilha de OLIVEIRA⁶

Carlos Alberto da Silva Ledo⁷

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da adição de antioxidantes no meio de cultura e o efeito nos estádios de desenvolvimento de inflorescências de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), sobre a intensidade de oxidação de explantes cultivados *in vitro*. As atividades foram realizadas no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA). Os segmentos de ráquilas, obtidos de inflorescências de açaizeiro previamente desinfestadas, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura de MS (Murashige & Skoog, 1962), sólido e líquido, com 3 % de sacarose, suplementado com diferentes antioxidantes. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob ausência total de luz. Aos 15 dias após a inoculação, foram avaliados a intensidade de oxidação e o número de explantes contaminados. Os segmentos de ráquilas obtidos de inflorescências jovens, em meio MS sólido suplementado com os diversos antioxidantes testados, apresentaram menor intensidade de oxidação. Entretanto, os segmentos de ráquilas de inflorescências maduras somente alcançaram menor oxidação quando inoculados em meio MS sólido suplementado com 0,3 % de carvão ativado, tanto na presença quanto na ausência de ácido ascórbico. Os demais antioxidantes quando associados ao meio MS líquido não apresentaram um efeito satisfatório no controle da oxidação de segmentos de ráquilas jovens e maduras.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Euterpe oleracea* Mart., Antioxidante, Ácido Ascórbico, Carvão Ativado, Polivinilpirrolidona.

¹ Aprovado para publicação em 08.02.2001

Parte da tese de Doutorado do primeiro autor, financiada com recursos da Embrapa Amazônia Oriental/JICA.

² Engenheira Agrônoma, M.Sc., Pesquisadora da Embrapa-Acre e doutoranda da Universidade Federal do Ceará – Caixa Postal 392 – CEP 69900-000, Rio Branco (AC)

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48 – CEP 66017-970 – Belém (PA)

⁴ Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Visitante da Universidade Federal do Ceará. Campus do Pici.

⁵ Engenheira Agrônoma, M.Sc., Técnica da Embrapa Amazônia Oriental.

⁶ Engenheira Agrônoma, Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental.

⁷ Engenheiro Agrônomo, Doutorando da Universidade Federal de Lavras – Caixa Postal 37 – CEP 37200-000 – Lavras (MG)

EVALUATION OF THE OXIDATION OF AÇAÍ RACHIS SEGMENTS (*Euterpe oleracea* Mart.) UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF *IN VITRO* CULTURE

ABSTRACT: The objectives of this work were to evaluate the efficiency of different antioxidants in the culture medium and the effect of the stage of development of açai inflorescence (*Euterpe oleracea* Mart.) on the intensity of oxidation of explant segments cultivated *in vitro*. The experimental activities were held in the Laboratory of Genetic Resources and Biotechnology of Embrapa Oriental, Amazon Basin, Belém (PA). The rachis segments, obtained from açai aseptic inflorescence, were previously inoculated in tubes of solid and liquid MS medium (Murashige & Skoog, 1962) with 3% of sucrose and supplemented with different antioxidants. The cultures were kept in growth room under total absence of light. After 15 days of inoculation, the oxidation intensity and the number of contaminated explants were determined. The young rachis segments showed little oxidation intensity. The mature rachis segments only reached small oxidation intensity when inoculated in a solid MS medium with 0,3% of activated charcoal, in the presence or absence of ascorbic acid. The other antioxidants when associated to the liquid medium did not show a satisfactory control of the oxidation intensity on young and mature açai rachis segments.

INDEX TERMS: Antioxidant, Ascorbic Acid, Activated Charcoal, Polyvinilpirrolidone

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de gemas florais é particularmente útil para o estudo das condições que permitam a diferenciação de partes florais específicas e se aplica a estudos do controle da morfogênese (Pinedo Panduro, 1987). Nas palmeiras, a utilização de inflorescências ainda jovens tem-se apresentado como alternativa mais interessante para a micropropagação, sendo empregadas freqüentemente ráquulas ou mesmo gemas florais isoladas (Almeida, 1994). Entretanto, a oxidação dos explantes é uma dificuldade nos estudos de cultura *in vitro* em palmeiras.

Muitos autores têm descrito o escurecimento de explantes como conseqüência de oxidações, em decorrência da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em resposta aos ferimentos (Sondahl & Teixeira, 1991). Os polifenóis e quininas são inibidores da formação de calos e do processo de embriogênese

(Reuveni & Lilien-Kipnis, 1974). A oxidação de tecidos em palmeiras também pode ser promovida pelas auxinas, citocininas e impurezas do ágar presentes no meio de cultura (Rabéchault & Martin, 1976).

Pré-tratamentos dos explantes e a adição de substâncias adsorventes ao meio de cultura têm sido amplamente testados no cultivo de tecidos de palmeiras. A inclusão, por exemplo, de carvão ativado ao meio de cultura tem sido relatada como uma condição indispensável para o cultivo *in vitro* de diversas palmeiras (Reynolds, 1982).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de antioxidantes no meio de cultura e o isolamento inicial em meio líquido ou sólido, bem como o efeito nos estádios de desenvolvimento de inflorescências de açazeiro sobre a intensidade de oxidação de segmentos de ráquulas cultivados *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA). Espatas de açaizeiro, em dois estádios de desenvolvimento (10 e 25 cm de comprimento), com brácteas externa e interna fechadas, foram coletadas de plantas adultas da coleção de açaizeiro da Embrapa Amazônia Oriental. Foram lavadas em água corrente e, posteriormente, submetidas ao processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar; em seguida, imersas em álcool etílico a 70 % por dois minutos e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio a 2 % por 20 minutos sob agitação e, em seguida, lavadas cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, as espatas foram abertas sob câmara asséptica com a remoção das duas brácteas envoltórias, expondo-se, assim, as inflorescências. A partir da porção apical das ráquilas, foram cortados transversalmente segmentos com aproximadamente 5 a 10 mm de comprimento.

Os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura básico de MS (Murashige & Skoog, 1962) com 3 % de sacarose. Os seguintes tratamentos foram testados: meio MS sólido + 0,3 % de carvão ativado (CA); meio MS sólido + 0,3 % de CA + 0,025 % de ácido ascórbico (AA); meio MS sólido + 0,025 % de AA; meio MS sólido + 0,1 % de polivinilpirrolidona (PVP); meio MS líquido + 0,3 % de CA; meio MS líquido + 0,025 % de AA e meio MS líquido + 0,1 %

de PVP; combinados com dois estádios de desenvolvimento da espata (jovem e madura), perfazendo um total de 14 tratamentos.

Para os tratamentos correspondentes ao meio MS sólido foram adicionados 0,6 % de ágar, e nos tratamentos com meio MS líquido foram utilizadas pontes de papel filtro. O pH dos meios de cultura MS e ½ MS foi ajustado para 5,8, e todos os tratamentos foram submetidos à esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de 26°C ± 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70 % e sob ausência total de luz.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 14 tratamentos e com cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída de cinco tubos de ensaio contendo um explante cada.

Aos 15 dias após a inoculação, foram avaliadas a intensidade de oxidação (Ox) e o número de explantes contaminados por fitopatógenos. Para a quantificação da intensidade de oxidação, foi observado o percentual de oxidação da superfície dos segmentos de ráquilas, por meio de uma escala de notas: 1- baixa intensidade de oxidação (Ox ≤ 30 %); 2- nível médio de oxidação (30% < Ox < 70 %); 3- nível alto de oxidação (Ox ≥ 70 %).

Foi realizada a análise de variância não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis (Siegel & Catellan Jr., 1988), ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor de $H=65,6135$ foi altamente significativo ($p=0,00001$), ou seja, foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos. Os segmentos de ráquulas obtidos de inflorescências jovens e cultivados em meio MS sólido suplementado com os diversos antioxidantes testados apresentaram menor intensidade de oxidação ($Ox=1$), mantendo-se viáveis por períodos de até três meses, sem a necessidade de repicagens (Tabela 1).

Guerra & Handro (1998) também observaram maior oxidação em explantes de *Euterpe edulis* Mart. obtidos de inflorescências em estádios mais próximos ao da abertura das flores. Possivelmente, o estágio fisiológico e o desenvolvimento do explante devem estar relacionados com a

maior ou menor liberação de metabólitos pelo explante no meio de cultura.

A adição de carvão ativado ao meio de cultura também reduziu a oxidação de explantes de *Cocos nucifera* L., *Elaeis guineensis* Jacq., *Phoenix dactylifera* L., *Bactris gasipaes* Kunth. e *Euterpe edulis* Mart. (Blake, 1983; Nwankwo & Krikorian, 1983; Tisserat, 1984; Stein & Stephens, 1991; Guerra & Handro, 1998). Neste caso, o principal efeito do carvão ativado no meio de cultura está relacionado com a capacidade de adsorver metabólitos produzidos pelo explante in vitro (Fridborg et al., 1978), como compostos fenólicos, bem como diminuir os efeitos tóxicos da interação de altas concentrações de reguladores de crescimento, adicionados ao meio de cultura, com substâncias secretadas pelo explante (Stein & Stephens, 1991).

Tabela 1 - Médias da intensidade de oxidação de segmentos de ráquulas (SR) de *Euterpe oleracea* Mart., cultivados em meio MS em função do estágio de desenvolvimento da espata e diferentes meios de cultura aos 15 dias de inoculação. Embrapa Amazônia Oriental, Belém(PA), Brasil, 2001.

Meios de Cultura	Intensidade de oxidação	
	SR Jovem	SR Madura
MS sólido + 0,3 % CA	1,0bA	1,0bA
MS sólido + 0,3 % de CA + 0,025 % AA	1,0bA	1,0bA
MS sólido + 0,025 % AA	1,0bB	2,6aA
MS sólido + 0,1 % PVP	1,0bB	2,4aA
MS líquido + 0,3 % CA	3,0aA	3,0aA
MS líquido + 0,025 % AA	3,0aA	3,0aA
MS líquido + 0,1 % PVP	2,0aA	2,9aA

Nota: Médias seguidas por letras minúsculas na coluna, e por letras maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1 % pelo teste de Kruskal-Wallis.

Em ráquilas jovens, todos os antioxidantes testados quando associados ao meio MS líquido não apresentaram um efeito satisfatório no controle da oxidação (Tabela 1). Estes resultados discordam dos relatos de Blake (1983), onde o meio líquido poderia liberar e diluir substâncias inibitórias ao desenvolvimento dos explantes no meio de cultura e de Reynolds (1982), que associa a oxidação à presença de agentes geleificantes como o ágar no meio de cultura.

Alguns trabalhos com outras palmeiras demonstram a eficiência do meio líquido. Explantes de inflorescências jovens de *Cocos nucifera* L., cultivados em meio líquido com 0,1% de PVP, apresentaram menor percentagem de oxidação (Siqueira & Inoue, 1991). Guerra & Handro (1998) também contornaram a oxidação em culturas de inflorescência de *Euterpe edulis* Mart. com a inoculação inicial em meio líquido com carvão ativado.

Desta forma, a intensidade de oxidação, além de estar relacionada com o tipo e idade fisiológica de explante, meio de cultura, presença de reguladores de crescimento, nível endógeno de fitorreguladores e de agentes geleificantes, dentre outros fatores, também depende da espécie a ser cultivada in vitro. Esta hipótese pode ser reforçada pelo fato de que a eficiência de antioxidantes no meio de cultura tem variado entre diversas palmeiras e entre explantes da mesma espécie. Não foi observada a contaminação dos explantes por fitopatógenos, o procedimento de desinfestação empregado foi eficiente.

4 CONCLUSÃO

a) Os segmentos de ráquilas obtidos de inflorescências jovens apresentaram menor intensidade de oxidação;

b) o meio de cultura MS sólido, suplementado com todos os antioxidantes testados, foi eficiente no controle da oxidação de segmentos de ráquilas jovens;

c) o meio de cultura MS sólido suplementado com carvão ativado, na presença ou ausência de ácido ascórbico, foi satisfatório no controle da oxidação de segmentos de ráquilas maduras;

d) o meio de cultura MS líquido não apresentou efeito sobre o controle da oxidação dos explantes;

e) o procedimento de desinfestação das espatas foi altamente satisfatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Marcílio de. *Emprego da cultura in vitro para a multiplicação vegetativa de pupunha (Bactris gasipaes H.B.K.) palmae*. 1994. 78 p. Tese (Doutorado) – ESALQ, São Paulo, 1994.

BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DOODS, J.H. (Ed.). *Tissue culture of trees*. London: Croom Helm, 1983. p.23-50.

FRIDBORG, Gunnar, PEDERSÉN, Marianne, LANDSTROM, Lars-Erik et al. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.43, n.2, p.104-106, 1978.

- GUERRA, Miguel Pedro, HANDRO, Walter. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. *Journal of Plant Research*, Tokyo, v.111, n.1101, p.65-71, Mar.1998.
- MURASHIGE, Toshio., SKOOG, Folke. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NWANKWO, B.A., KRIKORIAN, A.D. Morphogenetic potential of embryo and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. *Annals of Botany*, London, v.51, n.1, p.65-76, Jul. 1983.
- PINEDO PANDURO, Mário Herman. *Organogénesis directa en ápices caulinares de pejibaye (Bactris gasipaes H.B.K.)*. 1987. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrícolas e Recursos Naturais) – CATIE, Turrialba, 1987.
- RABÉCHAULT, H., MARTIN, J.P. Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) l'aide de cultures de tissus foliaires. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences- Série D*, Paris, v.283, p.1735-1737, 1976.
- REUVENI, O., LILIEN-KIPNIS, H. *Studies of the in vitro culture of date palm (Phoenix dactylifera L.) tissue and organs*. Bet Dagan: Volcani Institute Agricultural Research, 1974. 40p (Pamphlet, 145).
- REYNOLDS, J.F. Vegetative propagation of palm trees. In: BONGA, J.M., DURZAN, D.J. (Eds.). *Tissue culture in forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Pub., 1982. p.182-207.
- SIEGEL, S., CASTELLAN Jr., N. J. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: Mc Graw-Hill, 1988.
- SIQUEIRA, Edmar Ramos de., INOUE, Mário Takao. Controle da oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.26, n.7, p.949-953, jul. 1991.
- SONDAHL, M.R., TEIXEIRA, J.B. Tissue culture of palms. In: CROCOMO, O.J., SHARP, W.R., MELO, M. (Eds.). *Biotecnologia para produção vegetal-Biotechnology for plant production*. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p. 205-248.
- STEIN, M., STEPHENS, C. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. *Turrialba*, Costa Rica, v.41, n.2, p.196-201, abr./jun. 1991.
- TISSERAT, B. Clonal propagation: palms. In: VASIL, I.K. (Ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. New York: Academic Press, 1984. v.1, p.74-81.