



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

JULCINARA OLIVEIRA BAPTISTA

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Euterpe edulis*
Martius**

ALEGRE – ES
2022

JULCINARA OLIVEIRA BAPTISTA

**GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Euterpe edulis*
Martius**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia na Área de Concentração Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Lopes

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

ALEGRE – ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

O48g Oliveira Baptista, Julcinara, 1997-
Germinação de sementes in vitro e aclimatização de Euterpe edulis Martius / Julcinara Oliveira Baptista. - 2022.
51 f. : il.

Orientador: José Carlos Lopes.

Coorientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

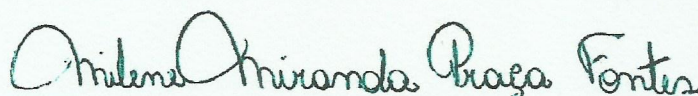
I. Carlos Lopes, José. II. Sobreira Alexandre, Rodrigo. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 63

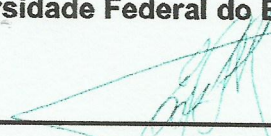
GERMINAÇÃO DE SEMENTES *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Euterpe edulis* Martius

Julcinara Oliveira Baptista

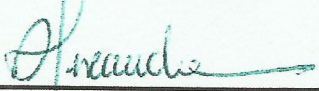
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia na Área de Concentração Agronomia.




Profa. Dra. Milene Miranda Praça Fontes (1º Examinador)
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Edilson Romais Schmildt (2º Examinador)
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre (Coorientador)
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. José Carlos Lopes (Orientador)
Universidade Federal do Espírito Santo

ALEGRE – ES
2022

DEDICATÓRIA

Ao Deus da minha vida, todo poderoso e, digno de toda honra e glória

A minha amada família, meu grande exemplo de força e perseverança na vida

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu grande amor e misericórdia, por me guiar, me sustentar, me dar sabedoria nos momentos de dificuldade e, principalmente, por me conceder a dádiva de renovar minhas forças e esperança todos os dias para poder lutar pelos meus sonhos.

Aos meus pais, Marcos de Freitas Baptista e Maria das Graças Oliveira Baptista, estes que não tenho palavras para descrever a minha imensa admiração, orgulho e amor, que cuidam de mim com todo carinho, e com grande esforço sustentam a família com um lindo trabalho de agricultura familiar.

À minha irmã Júnia Nália Oliveira Baptista Lopes, a quem tenho imensa admiração, pelo apoio, amor e carinho em me ajudar em todos os momentos com palavras de força e orientação. Ao Vagner dos Santos Moraes, pela dedicação, auxílio e incentivo nas minhas conquistas.

Aos meus demais familiares, os quais sempre estiveram em oração por mim. Aos meus amigos que torcem por mim e se alegram com minhas conquistas.

A equipe do Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais pelo auxílio na realização dos experimentos e parcerias nas publicações dos trabalhos. As amizades feitas, frutos da lealdade, honestidade e companheirismo diário, em especial a Ingridh Medeiros Simões, Caroline Palacio de Araujo, Natasha Oliveira e Lusiane de Sousa Ferreira.

Ao meu orientador Professor José Carlos Lopes, pela oportunidade de aprendizado acadêmico e humano com sua imensa generosidade, orientação e conselhos valiosos.

Ao meu coorientador Professor Rodrigo Sobreira Alexandre, pela oportunidade de aprender com seus valiosos ensinamentos, paciência e conselhos ao longo do mestrado.

Ao Professor Edilson Romais Schmidt pelo apoio e suas imensas contribuições nas análises estatísticas.

A Universidade Federal do Espírito Santo, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, e ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira pelo uso diário do Laboratório de Sementes Florestais e o de Cultura de Tecidos Vegetais para realização de experimentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) – Taxa de pesquisa - Processo FAPES nº 82195510.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. .

Quando passares pelas águas estarei contigo, e quando pelos rios, não te submergirão; quando passares pelo fogo, não te queimarás, nem a chama arderá em ti.

(Isaías 43. 2, Bíblia sagrada)

RESUMO

BAPTISTA, Julcinara Oliveira. **Germinação de sementes *in vitro* e aclimatização de *Euterpe edulis* Martius**. 2022. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES. Orientador: Prof. Dr. José Carlos Lopes. Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.

A espécie *Euterpe edulis* é propagada por sementes maduras e, devido à dureza do tegumento e do endosperma, apresenta germinação *ex vitro* lenta. Contudo, sementes imaturas no cultivo *in vitro* podem acelerar a germinação e produzir plântulas axênicas normais. Objetivou-se analisar o potencial germinativo de embriões, sementes (imaturas e maduras) *in vitro* e sementes imaturas *ex vitro*, e selecionar o explante de *E. edulis* com resultados superiores para a aclimatização. Foram realizados três experimentos: I: Germinação *in vitro* de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas de *E. edulis*; II: Germinação *in vitro* de sementes e embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* em meio de cultura com ácido giberélico (GA₃) e III: Aclimatização de plântulas provenientes do cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *E. edulis* pré-germinadas em diferentes meios de cultura e substrato *ex vitro*. Foram analisados: germinação, vigor e crescimento de plântulas *in vitro* e *ex vitro*, sobrevivência e o crescimento de plântulas *ex vitro*. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições de 10 sementes nos experimentos I e II, e com seis repetições de cinco sementes no experimento III. O cultivo *in vitro* de sementes imaturas apresenta-se vantajoso em relação a embriões zigóticos, à sementes maduras e à sementes imaturas *ex vitro*. O GA₃, nas concentrações 0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ para sementes de *E. edulis*, não induziu a germinação das sementes. Sementes imaturas utilizam reservas nutricionais presentes no endosperma para germinação, pois somente por meio da solidificação da água com ágar é suficiente para a germinação e crescimento inicial de *E. edulis*, diminuindo assim os custos de produção e descartando a necessidade de meio de cultura contendo sais e nutrientes.

Palavras-chave: *Euterpe edulis*. semente madura. Giberelina. Propagação. aclimatização.

ABSTRACT

BAPTISTA, Julcinara Oliveira. ***In vitro* seed germination and ex vitro acclimatization of *Euterpe edulis* Martius.** 2022. Dissertation (Master in Agronomia) – Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES. Advisor: Prof. Dr. José Carlos Lopes. Co-advisor: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.

Euterpe edulis is propagated by mature seeds and, due to the hardness of the tegument and endosperm, it has slow *ex vitro* germination. However, immature seeds in *in vitro* cultivation can accelerate germination and produce normal axenic seedlings. The objective was to analyze the germination potential of embryos, seeds (immature and mature) *in vitro* and immature seeds *ex vitro*, and to select the explant of *E. edulis* with superior results for acclimatization. Three experiments were carried out: I: *In vitro* germination of zygotic embryos, immature seeds, intact and scarified mature seeds of *E. edulis*; II: *In vitro* germination of seeds and immature zygotic embryos of *E. edulis* in culture medium with GA₃ and III: Acclimatization of seedlings from *in vitro* cultivation of immature seeds of *E. edulis* pre-germinated in different culture media and *ex vitro*. We analyzed: germination, vigor and growth of seedlings *in vitro* and *ex vitro*, survival and growth of seedlings *ex vitro*. A completely randomized design was used, with three replications of 10 seeds in experiments I and II, and with six replications of five seeds in experiment III. The *in vitro* cultivation of immature seeds is advantageous in relation to zygotic embryos, mature seeds and *ex vitro* immature seeds. GA₃, at concentrations of 0, 2, 4 and 8 mg L⁻¹ for *E. edulis* seeds, did not induce seed germination. Immature seeds use nutritional reserves present in the endosperm for germination, because only through the solidification of water with agar is sufficient for the germination and initial growth of *E. edulis*, thus reducing production costs, discarding the need for a culture medium containing salts and nutrients.

Keywords: *Euterpe edulis*. seed maturation. gibberellin. propagation. acclimatization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Germinação (%) (a), índice de velocidade de germinação (IVG) (b), tempo médio de germinação (TMG dias) (c) e plântulas normais (%) (d) de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas de *E. edulis*.
.....27
- Figura 2. Crescimento *in vitro* de plântulas de *E. edulis* oriundas de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas, analisado pelo comprimento de parte aérea (cm) (a); comprimento de raízes (cm) (b); comprimento total (cm) (c); diâmetro do coleto (mm) (d); comprimento de parte aérea/diâmetro do coleto (e)..29
- Figura 3. Utilização das concentrações 0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ de GA₃ na germinação (%) (a), IVG (b), plântulas normais (%) (c), plântulas anormais (%) (d), comprimento de raiz (cm) (e) de *E. edulis*.32
- Figura 4. Oxidação (%) (a), comprimento de parte aérea (CPA, cm) (b), diâmetro do coleto (DC, mm) (c), CPA/CR (d), CPA/DC (e) de sementes imaturas e embrião zigótico de *E. edulis* germinados *in vitro* em meio de cultura contendo GA₃.....33
- Figura 5. Pré-germinação *in vitro* em diferentes substratos, germinação *ex vitro* de sementes imaturas e crescimento de plântulas de *E. edulis* aclimatizadas *ex vitro*..39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Germinação e crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de <i>E. edulis</i> oriundas de embrião zigótico e semente imatura.....	31
Tabela 2. Germinação, IVG e TMG de sementes imaturas de <i>E. edulis</i> em diferentes substratos.....	36
Tabela 3. Crescimento de plântulas na aclimatização de <i>Euterpe edulis</i> oriundas de sementes imaturas.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Espécie <i>Euterpe edulis</i> Martius.....	15
3.2 Importância da espécie	16
3.3 Cultura de tecidos vegetais	18
3.4 Aclimatização	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
Experimento I: Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas de <i>E. edulis</i>	22
Experimento II: Germinação <i>in vitro</i> de sementes e embriões zigóticos imaturos de <i>E. edulis</i> em meio de cultura com GA ₃	23
Experimento III: Aclimatização de plântulas provenientes do cultivo <i>in vitro</i> de sementes imaturas de <i>E. edulis</i> pré-germinadas em diferentes meios de cultura <i>in vitro</i> e substrato <i>ex vitro</i>	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
Experimento I: Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas de <i>E. edulis</i>	25
Experimento II: Germinação <i>in vitro</i> de sementes e embriões zigóticos imaturos de <i>E. edulis</i> em meio de cultura com GA ₃	30
Experimento III: Aclimatização de plântulas provenientes do cultivo <i>in vitro</i> de sementes imaturas de <i>E. edulis</i> pré-germinadas em diferentes meios de cultura e substrato <i>ex vitro</i>	34
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

A palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) é uma espécie nativa da Floresta Atlântica, componente da rica biodiversidade brasileira, sendo muito explorada economicamente (SCHULZ et al., 2016; SCHULZ et al., 2020). Sua importância econômica está, principalmente, na extração do palmito e na produção de polpa para a indústria. Entretanto, a intensa exploração do palmito acarretou drástica redução da sua distribuição natural devido à ausência de perfilhamento e de rebrota após o seu corte (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2010).

Atualmente, a ação antrópica sobre a Floresta Atlântica tem ocasionado redução da variabilidade genética entre as espécies, comprometendo a manutenção dos ecossistemas, e dentre as inúmeras espécies afetadas está a palmeira juçara, que em uma área de 20 fragmentos florestais ao longo da Floresta Atlântica brasileira no sul da Bahia foram encontrados apenas 6.528 indivíduos, em que o maior número de indivíduos de *E. edulis* foi encontrado em fragmentos com 97, 64 e 90% de cobertura florestal circundante, com 868, 783 e 769 indivíduos, respectivamente (LEAL et al., 2021). *E. edulis* encontra-se incluída na Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza na categoria Vulnerável (CNCFlora, 2012), e na Lista das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BRASIL, 2014; FLORA DO BRASIL, 2020).

A exploração sustentável juntamente com a preservação da biodiversidade é uma alternativa economicamente viável e de agregação de valor ao subproduto de *E. Edulis* para agricultores familiares (SCHULZ et al., 2016). Os frutos apresentam altas concentrações de compostos fenólicos, como as antocianinas, importantes antioxidantes que combatem espécies reativas de oxigênio (EROs), e que também são potenciais anti-inflamatórios (BARROSO et al., 2018). Além disso, as cascas dos seus frutos são ricas em nutrientes e são utilizadas na fabricação de farinha (GARCIA et al., 2019), conferindo grande potencial a essa espécie para o desenvolvimento de produtos destinados à indústria. Além da espécie estar ameaçada de extinção devido à exploração indiscriminada, suas sementes apresentam recalcitrância, baixa longevidade, alta variabilidade, baixa percentagem de germinação e crescimento lento das mudas (MOREIRA et al., 2016; LEITE et al., 2021).

O cultivo *in vitro* é uma alternativa precoce de obtenção de mudas de qualidade para espécies que apresentam germinação lenta e irregular como é o caso das palmáceas. O resgate de embriões é uma importante técnica *in vitro*, que pode acelerar a germinação de espécies que apresentam algum tipo de impedimento físico à germinação (KINGSLEY et al., 2016). O método pode ser dividido em duas aplicações, utilizando embriões imaturos e embriões maduros. O primeiro, chamado de resgate de embriões precoces, cultiva embriões que de outra forma seriam abortados; já a segunda auxilia no encurtamento do período da germinação, superando a dormência das sementes (BRIDGEN, 1994). Essa técnica também pode proporcionar altos percentuais de germinação de sementes e embriões que apresentam desenvolvimento incompleto e má germinação (LIU et al., 2017).

A composição do meio (uso de reguladores), a duração da cultura e o tipo de meio (líquido, sólido, fase dupla) pode influenciar na germinação de embriões e na eficiência dos protocolos (TIAN et al., 2008). A suplementação do meio de cultura com ácido giberélico (GA₃) também pode potencializar os processos de germinação e crescimento de plântulas, aumentando a uniformidade e a velocidade de germinação. O efeito antagônico entre ABA e giberelina é necessário na regulação da germinação e da dormência de sementes (ALI et al., 2021). Além disto, a giberelina nas sementes estimula a produção de enzimas hidrolíticas, que atuam na quebra de moléculas de amido, permitindo o crescimento do eixo embrionário (BEWLEY et al., 2013). A giberelina e o brassinosteróide BR também podem atuar na mobilização da proteína glutelina, sendo este processo importante na germinação e crescimento do embrião em cereais (XIONG et al., 2021).

O processo de aclimatização é crítico, já que plântulas oriundas do cultivo *in vitro* passam da condição heterotrófica para autotrófica, sofrendo estresses fisiológicos. As plântulas produzidas em condições *in vitro* recebem nutrientes prontamente disponíveis para o seu crescimento, como fonte de carboidratos, além de serem cultivadas sob baixa irradiância, e quando são transferidas para o ambiente externo sofrem rápida desidratação dos tecidos, tornando necessárias adaptações das condições ambientais para reduzir o impacto direto à plântula (HAZARIKA, 2006). Esta fase de aclimatização é importante para a formação de mudas de qualidade e rustificadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial germinativo de embriões, sementes (imaturas e maduras) *in vitro* e sementes imaturas *ex vitro*, e selecionar explantes de *E. edulis* mais vigorosos para o processo de aclimatização.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar se as sementes imaturas e/ou embriões zigóticos de *E. edulis* apresentam maior germinação do que as sementes maduras;
- Analisar se as sementes imaturas e/ou embriões zigóticos de *E. edulis* são mais responsivos à conversão em plântulas do que as sementes maduras;
- Analisar se o ácido giberélico favorece o processo germinativo e a conversão em plântulas de sementes imatura e em embriões zigóticos de *E. edulis*;
- Analisar se a condição *ex vitro* é favorável à germinação e desenvolvimento de sementes imaturas de *E. edulis*;
- Investigar dentre os diferentes meios de cultura qual é o mais adequado para o estabelecimento de *E. edulis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espécie *Euterpe edulis* Martius

A palmeira *Euterpe edulis* Martius apresenta distribuição ampla no Brasil, nativa da Floresta Atlântica, encontra-se principalmente nos estados de Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (SCHULZ et al., 2016).

E. edulis é uma planta não estolonífera, desta forma a exploração do palmito leva à morte da planta adulta, pois com a derrubada desta não ocorre rebrota, além disso, apresenta crescimento lento e não suporta ambientes com sol pleno, necessitando de ambientes florestais para se manter preservada. O desmatamento e as queimadas florestais levam à mudanças severas no clima, ameaçando a

persistência das espécies no mundo (GÁLAN-ACEDO et al., 2021). *Euterpe edulis* Martius encontra-se dentre estas espécies e está classificada como vulnerável no Livro Vermelho da Flora do Brasil, e possivelmente nos últimos 60 anos esta espécie pode ter sofrido um declínio populacional de 30% (FLORA DO BRASIL, 2020; LEAL et al., 2021).

É popularmente conhecido como içara, palmito doce, palmito juçara, juçara, palmiteiro. Apresenta floração no período de setembro a dezembro e frutificação no período de maio a dezembro (LORENZI et al., 2010). É uma espécie alógama, com polinização por vento e por meio de insetos, como as abelhas *Apis mellifera*, *Plebeia droryana* e *Euglossini undet* (SANTOS et al., 2018). Em sua morfologia apresenta até 13 metros de altura, estirpe com 15-20 cm de diâmetro, bainha das folhas fechadas, envolvendo toda região apical do caule, lenhosa, raque com 0,9-2 metros de comprimento, e segmentos foliares com 50-70 pares (CAXAMBÚ et al., 2015).

As inflorescências apresentam 50-65 cm de comprimento, são ramificadas até primeira ordem; bráctea peduncular com 45-70 cm, deiscente; flores sésseis, pistiladas e estaminadas na mesma inflorescência, distribuídas ao longo de todo o ramo floral; os frutos apresentam de 1-1,5 cm de diâmetro, globoso, com coloração negra a purpúrea quando maduros; mesocarpo fibroso carnosos, e endocarpo duro (CAXAMBÚ et al., 2015). Forma-se em média uma infrutescência por planta, apresentando em média 2.175 frutos maduros (SILVA; REIS, 2018).

A propagação *Euterpe edulis* é seminífera, e tem importante papel na manutenção das populações de palmiteiro, que com o extrativismo e corte indiscriminado do palmito reduziu drasticamente as populações. Suas sementes são recalcitrantes, ou seja, a redução do teor de umidade atua na redução de sua viabilidade e conseqüentemente afeta a porcentagem de germinação das sementes (CARVALHO, 2003; MARTINS et al., 2009). Alguns autores destacam que a germinação de suas sementes é lenta e irregular, podendo levar de 60 a 90 dias para germinar (CURSI; CICERO, 2014), e variação de 30 a 60% de acordo com material genético (SOLER-GUILHEN et al., 2020).

3.2 Importância da espécie

Euterpe edulis Martius é uma espécie florestal de importância ecológica,

econômica e cultural. Os principais produtos da palmeira são o palmito e seus frutos, que são matéria prima para a extração da polpa, apresentando inúmeras formas de utilização para a indústria (LIMA et al., 2012).

As palmeiras pertencentes à família Arecaceae apresentam grande potencial para o desenvolvimento de produtos destinados aos diversos ramos da indústria, excelência nutricional e boa capacidade funcional, apresentando constituintes químicos e propriedades benéficas à perspectiva de melhoria de vida. Souza et al. (2020) estudaram quatro palmeiras pertencentes à família Arecaceae (*Mauritia flexuosa* L.f., *Mauritiella armata* (Mart.) Burret, *Euterpe oleracea* Mart. e *Acrocomia aculeata*), que apresentam características físico-químicas diversas e ampla empregabilidade no mercado. Destacaram ainda que dentre estas quatro espécies, os frutos da palmeira do gênero *Euterpe* apresentam o maior número de solicitação de patentes por empresas de indústrias, como de cosméticos, farmacêuticas e suplementos alimentares naturais.

Seus frutos amadurecem em época de escassez de recursos na floresta, tornando-se uma espécie-chave da Floresta Atlântica, pois é uma fonte de alimento para diversas aves, tais como: sabiás, tucano do bico preto, sabiá coleiro e sabiá una (SANTOS et al., 2018). O sabiá una é a espécie que apresenta maior número de interações entre grupos de palmeiras vizinhas, caracterizando-o como um agente de dispersão da espécie. Dessa maneira, a ação extrativista predatória compromete a diversidade componente da fauna. Para a reintrodução da palmeira juçara no ambiente, objetivando a preservação da espécie e a exploração comercial são utilizadas sementes, principalmente porque a propagação das palmeiras é feita quase exclusivamente de forma seminífera (MELLO et al., 2021).

Atualmente, *E. edulis* apresenta-se como fonte de renda para comunidades rurais e pequenos produtores, que investem na espécie buscando agregar valor por meio da industrialização de produtos oriundos da polpa dos frutos. Seus frutos são ricos em nutrientes e possuem altas concentrações de antocianina, um composto que atua como um antioxidante eficaz à saúde humana (MENDES et al., 2021). Copetti et al. (2020) descrevem que ingerir 250 mL do suco de juçara antes da realização de atividades físicas diminui o índice de estresse oxidativo após o exercício físico e pode atenuar a fadiga após uma sessão de treinamento intercalado de alta intensidade.

Extratos de *E. edulis* evidenciaram potencial neuroprotetor contra os danos celulares induzidos por glutamato nas células neurais HT22, destacando as frações

de hexano e diclorometano extraídas, sendo a última a que apresentou maior teor de fenólicos, com maior atividade sequestrante de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Esse efeito protetor pode estar associado à composição fenólica dessas frações, pois há interação entre os compostos que podem atuar na proteção contra os danos oxidativos (SCHULZ et al., 2019).

As antocianinas são os maiores grupos de pigmentos de plantas, e nos frutos de *E. edulis* encontra-se em níveis elevados durante o amadurecimento, nos estágios 5 e 6, ou seja, 42 e 56 dias após o aparecimento de frutos de coloração vermelha, vantagem observada em relação ao ciclo de amadurecimento de frutos de *Eutrope oleracea*, que varia de 64 a 94 dias (ROGEZ et al., 2011; SCHULZ et al., 2015). Além disso, no estágio de maturação 6 foram encontrados 634,26 mg de cianidina 3-glucosídeo 100 g de massa fresca, valor considerado elevado para o conteúdo de antocianinas (SCHULZ et al., 2015).

3.3 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais consiste no cultivo *in vitro* de plantas ou parte delas, como órgãos, tecidos, células ou até mesmo protoplastos, sob meio nutritivo em condições assépticas e em ambiente controlado (SHARMA et al., 2017). Essa técnica é considerada uma alternativa aos métodos convencionais de produção de mudas, no qual diversos fatores podem influenciar na estabilidade e na formação de plântulas saudáveis e vigorosas, como: a assepsia e o tipo de explante, o genótipo utilizado, composição do meio de cultura, luminosidade, temperatura, dióxido de carbono (CO₂) e oxigênio (O₂) (BAIRU et al., 2011).

O cultivo *in vitro* pode ser iniciado com qualquer parte da planta: semente, embriões zigóticos, gemas, folhas, raízes, entre outras fontes de explantes. Essa técnica tem como base a totipotência celular, ou seja, a capacidade de uma única célula em se dividir e formar um indivíduo multicelular, a exemplo da formação de brotos e/ou raízes pela técnica da organogênese ou embriões somáticos, que regeneram uma planta completa pela técnica da embriogênese somática (VERDEIL et al., 2007; SMERTENKO; BOZHKOVA, 2014).

O processo de germinação *in vitro* tem sido muito utilizado visando à produção de mudas em massa e, principalmente, a conservação de espécies ameaçadas de

extinção, como a *Cattleya elongata* Barb. Rodr. A utilização de protocolos de germinação, regeneração e aclimatização permitiu a reintrodução no seu habitat e viabilizou seu comércio (OLIVEIRA et al., 2021). Não obstante, tem auxiliado na propagação de espécies que apresentam sementes com algum tipo de dormência ou substâncias inibidoras à germinação, que ao remover uma ou mais partes externas da semente reduz a ação inibitória, como observado em palmáceas e outras espécies que apresentam dificuldade em se propagar sexuadamente (SAN et al., 2014; KINGSLEY et al., 2016).

As sementes da palmeira *Elaeis guineensis* Jacq. apresentam dormência física, o que acarreta a não percepção de estímulos de água e oxigênio ao embrião para o seu crescimento, resultando em uma germinação lenta e irregular, levando aproximadamente oito a dez meses. Contudo, quando tratadas com calor seco a 42 °C por 60 dias apresentam de 85 a 100% de germinação (REES, 1962).

O emprego do cultivo *in vitro*, utilizando-se a técnica de cultura de embriões, tem se tornado uma forma rápida e viável para a produção de mudas de dendê. Embriões zigóticos maduros dispostos em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), de força total suplementado com carvão ativado (2 g L⁻¹), complexo vitamínico de Morel (2 mL L⁻¹) e GA₃ (0,1 mg L⁻¹), combinado com genótipos superiores, alcançaram até 90% de germinação em um tempo médio de 14 a 20 dias, ocorrendo uma redução significativa no tempo de germinação de aproximadamente 100 dias (KINGSLEY et al., 2016).

A cultura de embriões também se destaca pela utilização de embriões imaturos, que em condições assépticas e em meio nutritivo alcançam a maturação fisiológica, podendo gerar uma nova planta, e contribuir para o melhoramento de frutas potencialmente comerciais, mas que apresentam algum empecilho à germinação (WU et al., 2021). Os tecidos embrionários são considerados excelentes explantes para estudos visando à propagação *in vitro*, pelo fato deste apresentar tecido juvenil e alta atividade morfogenética (PEREIRA et al., 2006). O uso de embriões zigóticos imaturos de *Euterpe edulis* Martius como fonte de explante possibilitou a formação completa de plântulas pela técnica de embriogênese somática, que ao obter embriões somáticos, cerca de 50% destes germinaram e converteram-se em plântulas normais. Além disso, também foi avaliada a germinação desses embriões isoladamente, e esses apresentaram média geral de germinação de embriões zigóticos imaturos de 74% e a maior média de 80%, completando seu desenvolvimento após 120 dias (SALDANHA;

MARTINS-CORDER, 2012).

Outro emprego da cultura de tecidos é a obtenção de plântulas assépticas, como fonte de explantes juvenis (folhas cotiledonares, gemas, entre outros) para o estabelecimento de algumas plantas adultas, como as lenhosas, que apresentam dificuldade no estabelecimento *in vitro*. Esse entrave pode ser devido à dificuldade encontrada no processo de desinfestação do material, que pode conter contaminações endógenas e exógenas de difícil controle (SILVA et al., 2019).

O tipo e a composição do meio de cultura é um dos fatores que influencia a germinação das sementes e pode otimizar os protocolos, sendo que o meio MS é comumente utilizado no cultivo *in vitro* e proporciona altas porcentagens de germinação para diversas espécies (LÉDO et al., 2007). Tal meio é constituído de sais inorgânicos, carboidratos e vitaminas com altas concentrações de nutrientes para o desenvolvimento das plantas (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura é importante na regulação da germinação, sendo que para algumas espécies o uso do GA₃ acelera a germinação e para outras apresenta efeito reduzido ou nenhum efeito. Estudos com sementes de *Thlaspi caerulescens* sugeriram que os tratamentos com GA₃ foram eficientes na promoção da germinação, apresentando 66% de germinação nas temperaturas de 15 e 20 °C, na presença de luz (GUIMARÃES et al., 2010). Além disso, o uso do GA₃ pode ser eficiente na promoção do crescimento das plântulas (ALHARBY et al., 2021). A giberelina atua na síntese de enzimas essenciais à degradação das reservas, sendo a α -amilase a principal enzima relacionada ao processo de germinação, responsável pela degradação dos grãos de amido que compõem a reserva da semente (BEWLEY et al., 2013).

3.4 Aclimatização

O processo de aclimatização é a etapa final de um sistema de cultivo *in vitro* bem estabelecido, na qual a transferência e a aclimatização são frequentemente mais problemáticas. Esta fase de transferência visa à aclimação e rustificação em condições *ex vitro* para a formação de mudas de qualidade, buscando minimizar o estresse causado pela mudança de uma condição heterotrófica para autotrófica (CHANDRA et al., 2010; SHIN et al., 2014). Desta forma, deve-se estabelecer um

protocolo no qual as plantas sofram menor estresse possível, evitando assim danos profundos ou mortes.

O ambiente *in vitro* é caracterizado por baixa irradiação e atmosfera saturada, reduzindo as trocas gasosas. Devido à transpiração intensa em ambiente *in vitro*, quando as plântulas são transferidas para ambiente *ex vitro* sofrem rápida e intensa perda de água (XIAO et al., 2011). A camada de cera epicuticular das plântulas minimiza a taxa de transpiração e uma das consequências é a desidratação dos tecidos, quando essas são transferidas para a casa de vegetação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O tipo de substrato utilizado na aclimatização é importante por apresentar características químicas, físicas e biológicas, que exercem grande influência na adaptação e desenvolvimento das plantas em ambiente *ex vitro*. Substratos mais porosos influenciam no crescimento das mudas pois apresentam maior aeração, que favorece a absorção de nutrientes e água, beneficiando o crescimento do sistema radicular e conseqüentemente o da parte aérea (SHAFIQUE et al., 2021).

Além do substrato, a composição do meio de cultivo e o estágio de crescimento do material a ser transplantado podem influenciar no desenvolvimento e crescimento das plântulas, e posteriormente a origem dessas plântulas pode interferir no processo de aclimatização. Plântulas desenvolvidas em meio de cultura sem sacarose podem contribuir para diminuição de contaminação no ambiente *ex vitro* (XIAO et al., 2011).

O substrato vermiculita foi utilizado no transplante *ex vitro* de plântulas de *Wasabia japonica* Matsumura cultivadas *in vitro*, em quatro composições de meio: ágar, vermiculita, perlita e lã de rocha, para analisar o desenvolvimento e crescimento da raiz. O ágar e a vermiculita permitiram um crescimento do sistema radicular vigoroso *in vitro*, uma maior taxa fotossintética líquida, massa seca das plântulas e crescimento *ex vitro* (HOANG et al., 2019).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Jerônimo Monteiro, ES, Brasil.

As sementes de *E. edulis* foram obtidas de frutos colhidos em estágio de maturação incompleto, com aproximadamente 180 dias após a antese (DAA), e em estágio de maturação completa, com aproximadamente 228 DAA, de 10 plantas matrizes localizadas em Pedra Menina, distrito de Dores do Rio Preto, na região do Caparaó-ES, Brasil, sob as coordenadas 1. 20°31'32,3"S e 41°48'30,0"W; 2. 20°33'10,5"S e 41°49'34,8"W; 3. 20°32'45,8"S e 41°49'36,6"W; 4. 20°32'45,7"S e 41°49'30,8"W; 5. 20°32'46,7"S e 41°49'30,5"W; 6. 20°32'46,9"S e 41°49'29,7"W; 7. 20°32'45,4"S e 41°49'35,7"W; 8. 20°32'45,4"S e 41°49'36,6"W; 9. 20°33'46,8"S e 41°48'24,0"W; 10. 20°33'10,6"S e 41°49'39,8"W. Após a colheita e a limpeza dos frutos, esses foram homogeneizados para a separação dos lotes de acordo com o delineamento de cada experimento.

Experimento I: Germinação *in vitro* de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas de *E. edulis*

As sementes imaturas de *E. edulis* foram higienizadas com água e detergente neutro (Safra[®]), e após a retirada do tegumento foram imersas em solução de ácido ascórbico a 2% (Dinâmica[®]). Nas sementes maduras, a retirada da polpa envolta das sementes foi realizada com óxido de cálcio (CaO) e água, e posteriormente foram separadas em dois lotes: L1, que permaneceu com o endocarpo intacto; e L2, em que as sementes foram escarificadas na região lateral ao embrião. As sementes imaturas, em câmara de fluxo laminar (Pachane[®]), foram submersas em álcool etílico a 70% (Safra[®]) por um minuto, seguida por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (Super Globo[®]), agitando-se durante 10 minutos e, posteriormente, em solução de amoxicilina (Eurofarma[®]) a 3.000 mg L⁻¹, por 10 minutos. As sementes maduras intactas e escarificadas, após desinfestação, foram lavadas para remoção da amoxicilina e tratadas com uma solução de Captan[®] 2%, durante 10 minutos. O resíduo de cada agente desinfestante foi removido por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada por 30 minutos a 121 °C, com pressão de 1 atm.

A semeadura das sementes imaturas e maduras intactas e escarificadas foi feita diretamente em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Em sementes imaturas, com auxílio de pinça e bisturi foram retirados embriões zigóticos mantidos sobre o meio de cultura. A semeadura foi realizada em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose

(Neon[®]), 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]) e 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi[®]). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, posteriormente, autoclavado por 20 minutos a 121 °C, 1 atm. As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento por 120 dias a 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As variáveis analisadas foram: germinação (%) (BRASIL, 2009); índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962); tempo médio de germinação (TMG, dias) (LABOURIAU, 1983); plântulas normais (BRASIL, 2009, %); diâmetro do coleto (mm); comprimento de parte aérea (cm); comprimento de raízes (cm); comprimento total (cm); comprimento de parte aérea/diâmetro do coleto.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, composto de quatro tratamentos, sendo eles: embrião zigótico, sementes imaturas, sementes maduras intactas e maduras escarificadas, com três repetições de dez sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se o software R (R CORE TEAM, 2021).

Experimento II: Germinação *in vitro* de sementes e embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* em meio de cultura com GA₃

As sementes imaturas de *E. edulis* foram higienizadas e após a retirada do tegumento imersas em solução de ácido ascórbico a 2% (Dinâmica[®]). Na câmara de fluxo laminar as sementes imaturas foram submetidas a mesma desinfestação do experimento I. O resíduo de cada agente desinfestante foi removido por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada por 30 minutos a 121 °C, com pressão de 1 atm.

Posteriormente, o lote L1 de sementes imaturas foi semeado diretamente no meio de cultura e do lote L2 de sementes imaturas foram retirados os embriões zigóticos. Ambos foram dispostos em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Neon[®]), 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi[®]) e 0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ de ácido giberélico (Neon[®]). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e, posteriormente, autoclavado por 20 minutos a 121 °C, com pressão de 1 atm.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz com temperatura de 27 ± 2 °C por 10 dias, e posteriormente analisados quanto à

contaminação (%) e oxidação (%). Após este período, os explantes foram mantidos sob irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 120 dias foram analisados: germinação (%) (BRASIL, 2009); índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962); tempo médio de germinação (TMG, dias) (LABOURIAU, 1983); plântulas normais e anormais (BRASIL, 2009, %), ausência ou atrofia de parte aérea e sistema radicular; diâmetro do coleto (DC, mm); número de raízes; número de folhas; comprimento de parte aérea (CPA, cm); comprimento das raízes (CR, cm); comprimento total (CT, cm); comprimento de parte aérea/comprimento das raiz; e comprimento de parte aérea/diâmetro do coleto.

O experimento realizado em esquema fatorial 2x4 (explantes: sementes imaturas e embrião zigótico x GA₃: 0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹), num delineamento inteiramente casualizado, totalizando oito tratamentos, com três repetições de 10 explantes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão ($p \leq 0,01$ e $p \leq 0,05$), utilizando-se o software R (R CORE TEAM, 2021).

Experimento III: Aclimatização de plântulas provenientes do cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *E. edulis* pré-germinadas em diferentes meios de cultura *in vitro* e substrato *ex vitro*

As sementes do lote L1 de sementes imaturas foram higienizadas, retiradas do tegumento e desinfestadas como no experimento I. Posteriormente, foram semeadas em tubos contendo diferentes meios de cultura para pré-germinação: M1 (MS + 30 g L⁻¹ de sacarose + 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol + 5,5 g L⁻¹ de ágar); M2 (MS + 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol + 5,5 g L⁻¹ de ágar); M3 (5,5 g L⁻¹ de ágar) e M4 (Substrato Carolina Soil[®]), com pH do meio de cultura ajustado a $5,7 \pm 0,1$ e autoclavado durante 20 minutos a 121 °C e 1 atm. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, irradiância de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas, até as sementes apresentarem-se pré-germinadas, com aproximadamente 2 cm de parte aérea e raiz, sendo então transplantadas para bandejas contendo substrato Carolina Soil[®] e mantidas em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), regulada a 27 ± 2 °C, e fotoperíodo de 16 horas.

O lote L2 de sementes imaturas de *E. edulis* foi higienizado, retirado do tegumento e posteriormente imerso em álcool a 70% (Safra[®]) por um minuto, em NaOCl a 2,5% (Super Globo[®]), agitando-se durante 20 minutos em solução de

amoxicilina[®] a 3.000 mg L⁻¹ (Eurofarma[®]) por 20 minutos, e em seguida as sementes foram tratadas por imersão em Captan[®] 2%, durante 10 minutos. Após cada solução de desinfestação, foi realizada a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, à exceção do resíduo do Captan[®], que foi mantido nas sementes. A semeadura foi em bandejas plásticas desinfestadas com álcool a 70% (Safra[®]), e contendo o substrato Carolina Soil[®] autoclavado. Ambos os tratamentos *ex vitro* foram dispostos em seis repetições de cinco sementes e, mantidos em BOD por 120 dias.

As variáveis analisadas na pré-germinação foram: germinação (%) (BRASIL, 2009); índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962); tempo médio de germinação (TMG, dias) (LABOURIAU, 1983). As variáveis analisadas após a aclimatização foram: contaminação (%); sobrevivência (%), número de folhas; número de raízes; diâmetro de coleto (DC, mm); comprimento de parte aérea (CPA, cm); comprimento de raiz (CR, cm); comprimento total (cm); CPA/CR; CPA/DC; massa seca da parte aérea (MSPA, g); massa seca de raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g).

O teste foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se o software R (R CORE TEAM, 2021).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Germinação *in vitro* de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas de *E. edulis*

As variáveis germinação (%) e ocorrência de plântulas normais (%) não apresentaram diferença estatística entre os explantes embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas, apresentando altos percentuais, com germinação superior a 93,33% (Figura 1a) e ocorrência de plântulas normais superior a 83,33% (Figura 1d). No entanto, os explantes embriões zigóticos e sementes imaturas obtiveram maior IVG (0,7630 e 0,8009) (Figura 1b) e menor TMG (15,52 e 15,37 dias) (Figura 1c) em relação aos explantes semente madura e madura escarificada.

Os explantes de sementes imaturas avaliados com aproximadamente 180 DAA já haviam passado pelas fases de aquoso e gelatinoso, e se encontravam com endosperma sólido. Os autores Silva e Reis (2018) caracterizaram estas três fases.

Na primeira fase de endosperma aquoso os frutos apresentavam aproximadamente 5 mm de diâmetro e o endosperma com consistência líquida, com duração de aproximadamente 63 dias; Na fase de endosperma gelatinoso, os frutos têm aproximadamente 8 mm de diâmetro e endosperma com consistência gelatinosa, com duração média de 40 dias; e por fim a fase de endosperma sólido, caracterizada por frutos de aproximadamente 12 mm de diâmetro, coloração verde e embrião em fase de desenvolvimento, com duração em média de 64 dias.

Estudo recente de Mello et al. (2021), avaliando sete estágios de sementes de *E. edulis* (108, 128, 148, 168, 188, 208, 228 DAA), constataram que com aproximadamente 148 DAA os frutos já se encontravam com endosperma sólido, com formação de plântulas normais e 100% de germinação. Além disso, destacam que durante o processo de maturação das sementes ocorre aumento linear no teor de lipídeos, importantes para a manutenção da integridade da membrana celular e reserva de energia para a germinação, apresentando correlação positiva desta variável bioquímica com a variável morfológicas de germinação (MELLO et al., 2021).

Estatisticamente, embriões zigóticos e sementes imaturas não diferiram ($p = 0,05$) quanto ao TMG, no entanto apresentaram diferença estatística quando comparados com sementes maduras, ocorrendo um ganho de 72 dias com a utilização de sementes imaturas e de 83 dias, quando foram utilizados embriões zigóticos (Figura 1c). A eficiência do cultivo de embriões zigóticos depende da aplicação correta da técnica de resgate de embriões, e para isso alguns fatores são necessários, como o grau de maturidade fisiológica das sementes, a composição do meio de cultura, a desinfestação do explante, a habilidade manual de extração dos embriões, dentre outros fatores (JOHRI; RAO, 1984). Para sementes de *E. edulis* esta técnica é mais onerosa pois é necessário extrair o tegumento no ambiente externo de forma manual com auxílio de espátulas, pois o tegumento é bem aderido ao endosperma e também é necessário extrair o embrião de forma manual e asséptica em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinça e bisturi.

Portanto, o uso de sementes imaturas foi vantajoso, pois além de apresentar um processo menos oneroso, apresentou rápida germinação, altas porcentagens de germinação e formação de plântulas normais. Além disso, a colheita dos frutos com sementes imaturas ocorrem antecipadamente, diminuindo o tempo de exposição do fruto à condições ambientais adversas. O endosperma nas sementes de *E. Edulis* é a principal fonte de reservas, armazenando principalmente carboidratos ao longo das

paredes celulares espessas, lipídios e proteínas no citoplasma (PANZA et al., 2004), o que não é observado nos embriões.

A escarificação realizada nas sementes maduras não foi eficiente para redução no TMG, apresentando diferença de apenas 12 dias em relação às sementes maduras intactas (Figura 1c). A escarificação mecânica é uma técnica utilizada para a quebra de dormência física, caracterizado por sementes com tegumento espesso, que apresentam uma ou mais camadas de paliçadas impermeáveis à água, envolvendo a remoção do tegumento, esfregando-a com uma lixa ou submetendo a tratamento térmico (Baskin e Baskin, 2004).

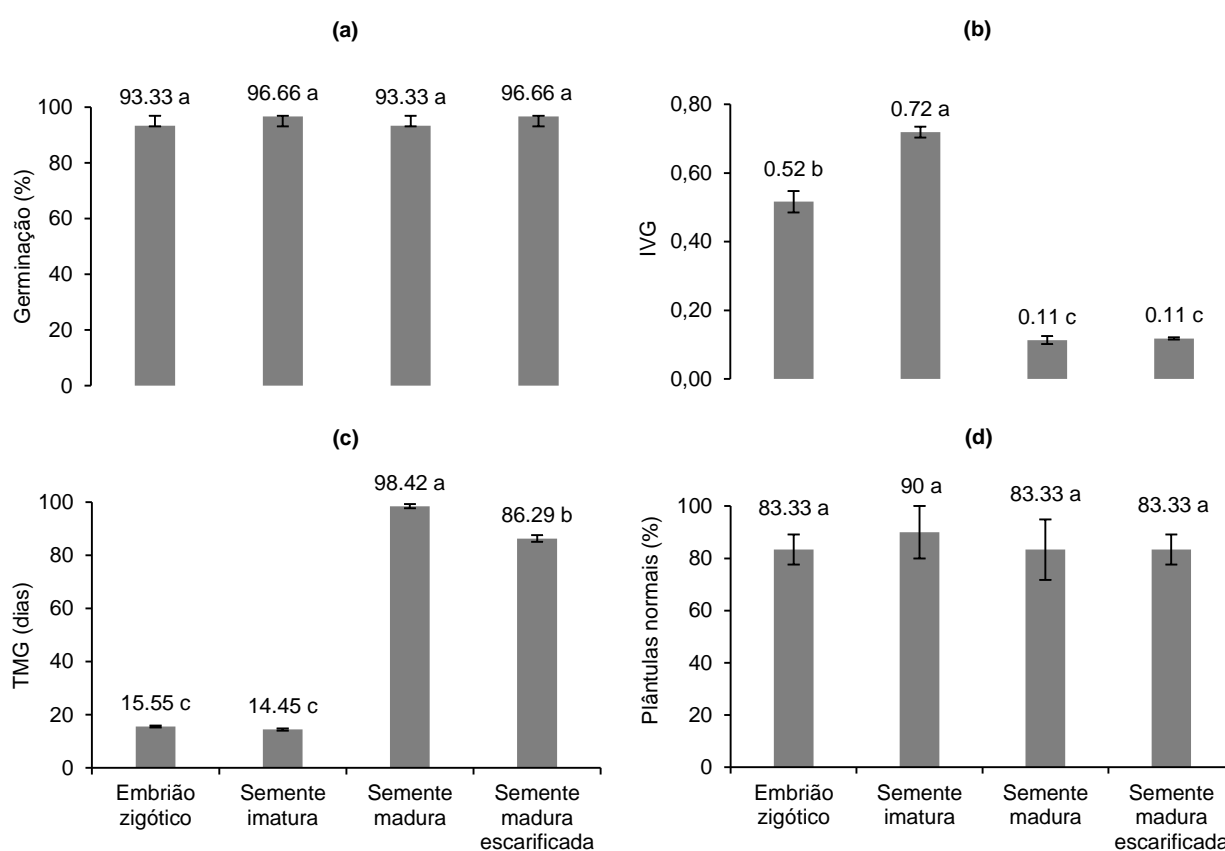


Figura 1. Germinação (%) (a), índice de velocidade de germinação (IVG) (b), tempo médio de germinação (TMG dias) (c) e plântulas normais (%) (d) de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas de *E. edulis*. ¹Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre os explantes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: a autora.

O tratamento com semente madura intacta teve a maior média para o diâmetro do coleto (1,75 mm) (Figura 2d), no entanto a maior relação comprimento de parte

aérea/diâmetro do coleto foi observada para o tratamento semente madura escarificada (5,95) (Figura 2e). Sementes maduras apresentaram maturidade fisiológica completa, consumindo as reservas nutricionais até o esgotamento e, posteriormente, passaram a consumir o meio de cultura, proporcionando crescimento superior das mudas. Resultados que corroboram aqueles observados por Neuburger et al. (2010), em que a maior parte das reservas da semente madura de *E. edulis*, que constitui cerca de 70% de sua massa seca original, é consumida quando as plântulas apresentam a primeira folha fotossintetizante ainda fechada.

Martins-Corder e Saldanha (2006), estudando a qualidade fisiológica das sementes de 15 progênies de *E. edulis* submetidas ao teste de germinação com contagens aos 60, 90, 120, 150 dias e porcentagem de sobrevivência aos 180 e 210 dias após a sementeira, observaram amplitude de variação da porcentagem de germinação de 0 a 4% (60 dias), 0 a 15% (90 dias), 3 a 25% (120 dias) e 14 a 56% (150 dias); e verificaram que sementes que levaram maior tempo para germinar deram origem a plântulas menos vigorosas (aproximadamente 1,70 cm), já sementes que germinaram em um menor tempo deram origem a plântulas mais vigorosas (aproximadamente 2,2 cm de altura).

A palmeira *Astrocaryum acaule* Mart também pertencente a família arecaceae, é uma espécie pouco estudada quanto às características morfológicas e anatômicas, e também apresenta dificuldade no processo germinativo De acordo com Corrêa et al. (2019), que estudaram o processo de emergência de plântulas, observaram ocorrência de germinação desigual com a formação da gema germinativa, variando entre 30 e 130 dias.

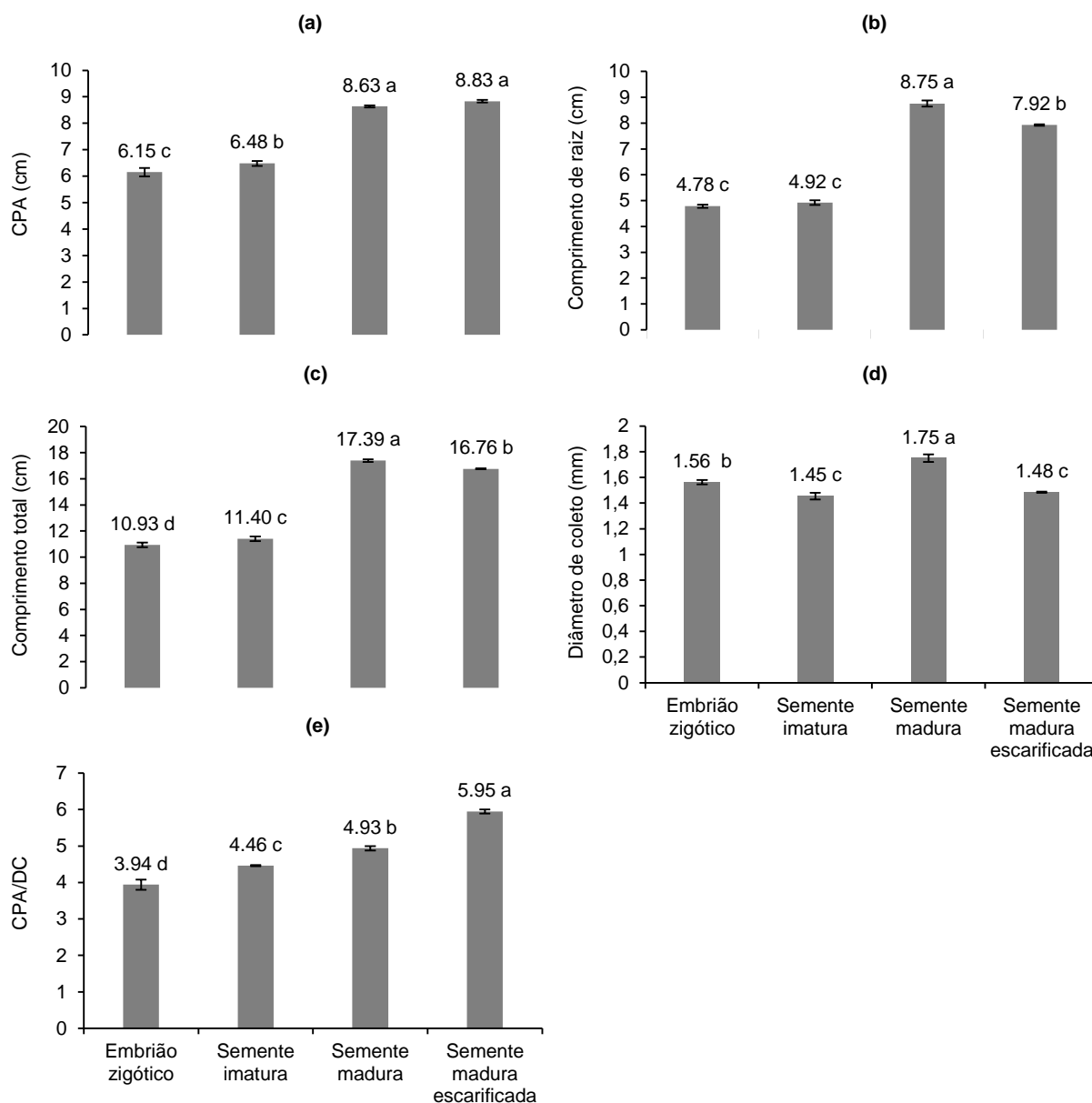


Figura 2. Crescimento *in vitro* de plântulas de *E. edulis* oriundas de embriões zigóticos, sementes imaturas, sementes maduras intactas e escarificadas, analisado pelo comprimento de parte aérea (cm) (a); comprimento de raízes (cm) (b); comprimento total (cm) (c); diâmetro do coleto (mm) (d); comprimento de parte aérea/diâmetro do coleto (e). ¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre explantes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: a autora.

O crescimento total de plântulas oriundas de sementes imaturas foi menor em relação às sementes maduras intactas e sementes maduras escarificadas, com diferença de 5,99 e 5,36 cm, respectivamente (Figura 2c). Esse comportamento está associado à época de colheita das sementes maduras, no ponto de maturidade

fisiológica completa, fase em que apresentavam máximo conteúdo de massa seca, no qual a planta cessa a translocação de assimilados para a semente, além de produzir maiores reservas de nutrientes, enquanto as sementes imaturas podem ter uma composição química desregulada (ELMASRY et al., 2021).

Experimento II: Germinação *in vitro* de sementes e embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* em meio de cultura com GA₃

As características germinação, índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação, porcentagem de plântulas normais e anormais, comprimento de parte aérea, número de raiz, diâmetro do coleto, número de folhas e a CPA/DC não apresentaram diferenças estatísticas entre os dois tipos de explantes estudados (Tabela 1). No entanto, observou-se que a germinação iniciou-se após sete dias para os embriões zigóticos e após 10 dias para as sementes imaturas. Saldanha e Martins-Corder (2012) verificaram que embriões zigóticos após 10 dias em meio de cultura apresentaram sinais de primórdios radiculares e foliares, e após 120 dias houve a formação de plântulas normais.

O embrião zigótico apresentou menor contaminação (0,833%) em relação à semente imatura (7,50%), no entanto houve maior oxidação (17,5%). A maior porcentagem média de oxidação para embriões zigóticos pode ser explicada pela produção de polifenóis no início da germinação, que são liberados ao meio de cultura, e a oxidação destes fenóis pode bloquear a absorção de nutrientes, afetando diretamente os tecidos do explante, podendo retardar o seu desenvolvimento ou levar os explantes à morte (KINGSLEY et al., 2016). Estes autores observaram que embriões zigóticos maduros de *Elaeis guineensis* Jacq. e o meio de cultura que foram cultivados não sofreram mudanças de coloração com a exsudação fenólica, independentemente da suplementação ou não com carvão ativado no meio de cultura.

O maior crescimento de parte aérea (6,270 cm), crescimento total de plântulas (10,737) e relação CPA/CR (1,427) foram observados nas plântulas provenientes de sementes imaturas, porque sementes imaturas possuem endosperma para manter a nutrição durante o processo de crescimento da plântula, além do meio de cultura, que disponibiliza nutrientes para potencializar este crescimento. Além disso, o haustório cotiledonar auxilia na condução de fontes de carbono e nitrogênio da hidrólise das reservas no endosperma, que são transportadas para o desenvolvimento e

crescimento do embrião (Nascimento et al., 2020).

Tabela 1. Germinação e crescimento *in vitro* de plântulas de *E. edulis* oriundas de embrião zigótico e semente imatura

Explantes	C (%)	OXID (%)	G (%)	IVG	TMG (dias)	PN (%)	PA (%)	NF
Embrião zigótico	0.83*	17.50 ^{ns}	65.00 ^{ns}	0.456 ^{ns}	15.61 ^{ns}	52.50 ^{ns}	30.00 ^{ns}	1.210 ^{ns}
Semente imatura	7.50	10.83	59.16	0.419	15.93	50.83	30.83	1.158
Explantes	NR	DC (mm)	CPA (cm)	CR (cm)	CT (cm)	CPA/CR	CPA/DC	
Embrião zigótico	1.496 ^{ns}	1.274 ^{ns}	5.43*	4.506 ^{ns}	9.938*	1.177*	4.288 ^{ns}	
Semente imatura	1.501	1.298	6.27	4.383	10.737	1.427	4.853	

*Significativo em nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$), pelo teste de F; ^{ns}Não significativo.

Abreviações: C. contaminação; OXID. oxidação; G. germinação; IVG. índice de velocidade de velocidade; TMG. tempo médio de germinação; PN. plântulas normais; PA. plântulas anormais; NF. número de folhas; NR. número de raízes; DC. diâmetro de coleto; CPA. comprimento de parte aérea; CR. comprimento de raiz; CT. comprimento total; CPA/CR. comprimento de parte aérea/comprimento de raiz; CPA/DC. comprimento de parte aérea/diâmetro de coleto.

Fonte: a autora.

O GA₃ nas concentrações estudadas não influenciou as características de germinação (%), IVG e plântulas normais (%), pois os maiores valores foram encontrados na ausência deste regulador de crescimento: 90%; 0,62 e 83,33%, respectivamente (Figuras 3a, b e c). As características descritas acima apresentaram modelo quadrático, enquanto para o comprimento de raiz, o modelo foi linear decrescente, com aumento das concentrações, sendo que na concentração de 2 mg L⁻¹ houve acréscimo não significativo de 0,13 cm no crescimento da raiz. A viabilidade das sementes e a disponibilidade de nutrientes, carboidratos, fontes de carbono e outras condições que favorecem o crescimento, proporcionam altas taxas de germinação e formação de plântulas, conforme observado em *Vanda stangeana* (BEMBEMCHA et al., 2016). Além disso, no caso das sementes imaturas, há a presença de substâncias de reservas no endosperma, que sendo degradadas induzem o processo de germinação, ao mesmo tempo em que os nutrientes presentes

no meio de cultura estarão disponibilizados para o crescimento das plântulas.

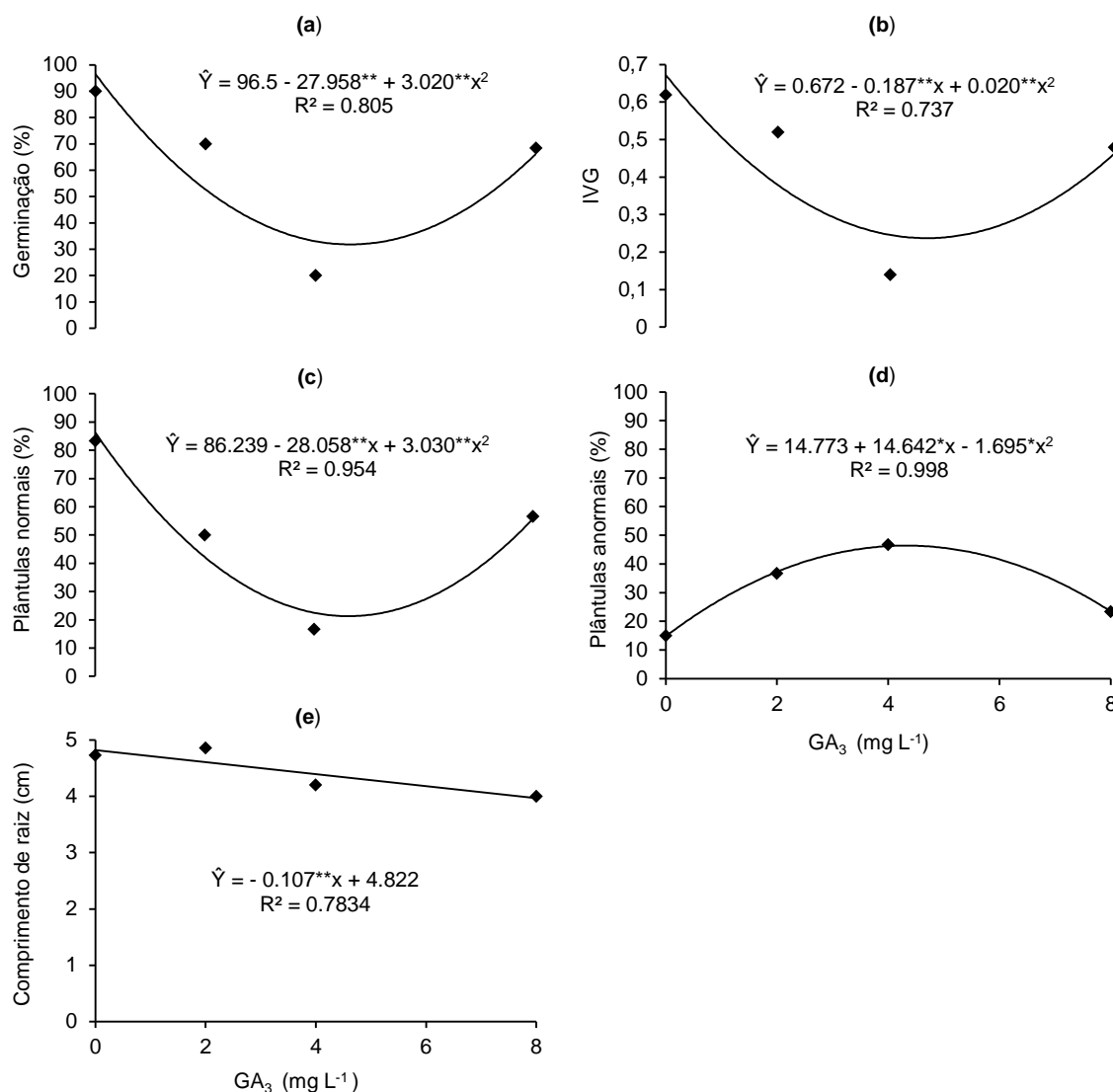


Figura 3. Utilização das concentrações 0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ de GA₃ na germinação (%) (a), IVG (b), plântulas normais (%) (c), plântulas anormais (%) (d), comprimento de raiz (cm) (e) de *E. edulis*. ** e *: significativo em nível de 1 e 5 % de probabilidade.

Fonte: a autora.

Para as sementes imaturas, a oxidação, o comprimento de parte aérea, as relações entre comprimento de parte aérea/comprimento de raiz e o comprimento de parte aérea/diâmetro do coleto apresentou acréscimo com o aumento das concentrações de GA₃ (Figuras 4a, b, d e e, respectivamente). No entanto, para o embrião zigótico, observou-se que a oxidação e a relação comprimento de parte aérea/diâmetro do coleto apresentaram acentuado acréscimo e, ao atingir o ponto de

máxima eficiência técnica (4,608 e 5,175 mg L⁻¹) (Figuras 4a e e), houve decréscimo contínuo.

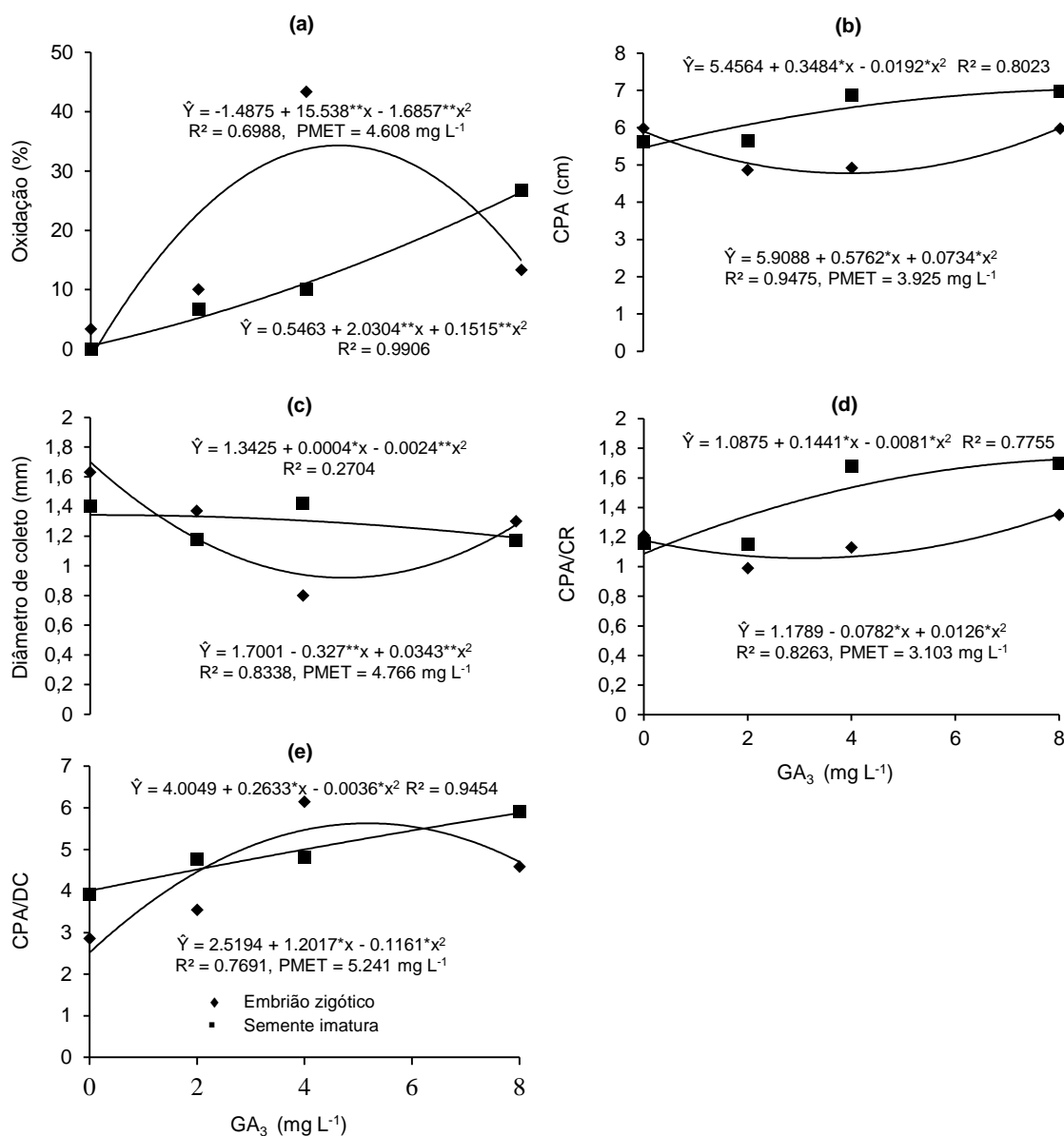


Figura 4. Oxidação (%) (a), comprimento de parte aérea (CPA, cm) (b), diâmetro do coleto (DC, mm) (c), CPA/CR (d), CPA/DC (e) de sementes imaturas e embrião zigótico de *E. edulis* germinados *in vitro* em meio de cultura contendo GA₃. Abreviações. PMET- Ponto de máxima ou mínima eficiência técnica. *: significativo em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: a autora.

Para o diâmetro do coleto (Figura 4c), semente imatura e embrião zigótico houve decréscimo acentuado com o aumento das concentrações de GA₃. Esta

variável é importante para a geração de plântulas de qualidade, que juntamente com a relação comprimento de parte aérea/diâmetro de plântula, durante o crescimento das plântulas *in vitro*, busca o equilíbrio de crescimento, e é observado principalmente quando se tem um maior crescimento radicular, fazendo com que a plântula expresse o seu maior vigor.

O aumento das concentrações de GA₃ (valores superiores a 4,5 mg L⁻¹) resultou em eficiência do crescimento de plântulas oriundas de embrião zigótico, como comprimento de parte aérea e comprimento de parte aérea/crescimento de raiz (Figuras 4b e d). A utilização do GA₃ e a capacidade de absorção pela plântula podem causar alterações fisiológicas, que potencializam o crescimento de plântulas devido à sua atuação na divisão e alongamento celular (TAIZ et al., 2017). Além disso, embriões zigóticos imaturos apresentam menor quantidade de reserva nutricional que as sementes imaturas, que possuem a presença do tecido de armazenamento, o endosperma prontamente disponível. A germinação de embriões zigóticos e sementes imaturas *in vitro* foi superior a 90% sem o uso de regulador de crescimento, resultado este superior aos encontrados por Ribeiro et al. (2015) utilizando sementes maduras de *E. edulis* submetidas a tratamentos pré-germinativos *ex vitro*, no qual a taxa de germinação foi de 74% utilizando GA₃. Similarmente, comprimentos de parte aérea de plântulas oriundas de semente imatura e de embrião zigótico (6,270 e 5,434 cm, respectivamente) foram superiores aos valores observados por Ribeiro et al. (2015) para semente madura de *E. edulis* (2,78 cm), evidenciando que explantes imaturos são mais responsivos, não necessitando de reguladores de crescimento.

Experimento III: Aclimatização de plântulas provenientes do cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *E. edulis* pré-germinadas em diferentes meios de cultura e substrato *ex vitro*

No substrato Carolina Soil® *ex vitro* houve germinação de 97,5% das sementes, no entanto houve menor IVG (0,083) e maior TMG (48,61 dias) (Tabela 2). Nos tratamentos *in vitro*, as sementes apresentaram germinação superior a 60%, evidenciando que sementes imaturas de *E. edulis* podem germinar em diferentes substratos. Além disso, durante o processo de pré-germinação houve redução das reservas nutricionais do endosperma, translocadas para o eixo embrionário, causando redução na massa seca total, que foi utilizada durante o processo respiratório para o

seu crescimento (Tabela 2), resultados que corroboram aqueles observados por Venturi e Paulilo (1998).

Ferreira et al. (2020) realizaram análises histoquímicas durante a germinação de sementes de *E. precatória*, nas quais verificaram a presença de proteínas em diferentes tamanhos e formas na região haustorial e próxima à região do eixo embrionário, e poucos grãos de amido próximo e ao redor da plúmula. Também observaram que após quatro dias houve pequeno consumo de proteínas próximas ao eixo embrionário, e na região central do haustório após oito dias. Além do início da mobilização das reservas de proteínas, houve aumento na quantidade de grãos de amido dentro e ao redor do eixo embrionário. E após 15 dias, houve a protrusão da raiz primária e as reservas proteicas foram quase totalmente consumidas (FERREIRA et al., 2020).

Observou-se que o TMG dos tratamentos *in vitro* foi de 18,08 dias, enquanto o tratamento *ex vitro* foi de 48,61 dias, portanto a utilização do ambiente *in vitro* gerou ganho de aproximadamente 30 dias (Tabela 2). Naturalmente, sementes maduras de *E. edulis* apresentam germinação lenta, iniciando a emergência em substrato de 30 a 170 dias da sementeira (CARVALHO, 2003). No entanto, quando são submetidas ao cultivo *in vitro* utilizando-se sementes imaturas ocorre redução significativa no TMG, tendo a germinação iniciada após aproximadamente 10 dias de cultivo. Comportamento similar foi observado em outras palmeiras, a exemplo de *E. guineenses*, que apresentou germinação *ex vitro* entre 105 e 120 dias, utilizando-se escarificação por calor seco. Contudo, quando submetidas ao cultivo *in vitro* utilizando-se embriões zigóticos maduros, a germinação ocorreu após 14 a 20 dias, apresentando em torno de 90% dos embriões germinados e uniformes (KINGSLEY et al., 2016).

Verificou-se que nos tratamentos MS + sacarose + mio-inositol + ágar e ágar e Carolina Soil® *in vitro* houve médias estatisticamente superiores de IVG (0,969; 1,026 e 1,021, respectivamente), e nos tratamentos MS + sacarose + mio-inositol + ágar e ágar houve menor TMG (16,6 e 15,76 dias, respectivamente, não diferindo estatisticamente).

Plântulas cultivadas em meio de cultura ágar apresentaram maior taxa de sobrevivência em relação aos demais tratamentos (80%) (Figura 5), e a menor porcentagem de contaminação (20%) (Tabela 3). É um método de propagação que se destaca por ser menos oneroso, economizando reagentes e tempo no preparo do

meio (Tabela 1). O ágar é um polissacarídeo estável, empregado como um gelificante ao meio de cultura, e no cultivo *in vitro* de plantas proporciona sustentação para as plântulas. No entanto, dentre as diversas marcas disponibilizadas, há a necessidade de maior grau de pureza para evitar que afete o metabolismo dos tecidos das plântulas (BERUTO et al., 1999). Além disso, o uso de meio de cultura contendo baixos conteúdos de ágar pode facilitar a germinação de algumas sementes, pois o meio menos sólido fornece maior quantidade de água para as sementes, podendo ser um fator determinante para algumas sementes, favorecendo a embebição e ativação do metabolismo das sementes para posterior germinação (GOLLE, 2010).

A cultura de tecidos apresenta como um dos principais problemas o alto custo para obtenção das plântulas, e com o avanço da biotecnologia uma forma de reduzir estes custos é estudar a adaptabilidade das espécies em materiais naturais para aplicações agrícolas. Cao e Li (2021) estudaram a aplicabilidade de um hidrogel de agarose com carvão ativado na germinação de sementes, e verificaram que a adição de carvão ativado melhora as propriedades dos hidrogéis de agarose e, conseqüentemente, melhora a germinação e crescimento das plantas, apresentando percentual de germinação alto (100%) e, além disso, maior comprimento de raiz e parte aérea, e masa fresca e seca em relação a não adição de carvão ativado.

Tabela 2. Germinação, IVG e TMG de sementes imaturas de *E. edulis* em diferentes substratos

Substratos	G (%)	IVG	TMG (dias)
MS + sacarose + mio-inositol + ágar	66.65 b ¹	0.969 a	16.60 a
MS + mio-inositol + ágar	61.50 b	0.820 b	19.15 b
Ágar	63.75 b	1.026 a	15.76 a
Carolina Soil® <i>in vitro</i>	64.90 b	1.021 a	20.84 b
Carolina Soil® <i>ex vitro</i>	97.50 a	0.083 c	48.61 c

¹Médias não seguidas pela mesma letra, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Abreviações: G. germinação (%); IVG. índice de velocidade de germinação; TMG. tempo médio de germinação (dias).

Fonte: a autora.

Observou-se que os tratamentos MS + sacarose + mio-inositol + ágar; MS + mio-inositol + ágar e Carolina Soil® *in vitro* e *ex vitro* apresentaram a menor taxa de sobrevivência (35 e 35; 50,00 e 38,25%) (Figura 5) e, conseqüentemente a maior

contaminação (65,00 e 65,00; 50,00 e 61,75%) (Tabela 3).

A utilização de sacarose no tratamento MS + sacarose + mio-inositol + ágar pode ter auxiliado no processo de germinação como fonte de carboidratos, possibilitando rápida germinação com aproximadamente 16,60 dias (Tabela 2) No entanto, para o processo de aclimatização, o curto período de absorção da sacarose pode ter influenciado negativamente, favorecendo a contaminação dos explantes (65%) (Tabela 3). A presença da sacarose no meio de cultura também pode ter reduzido seu potencial hídrico, bem como a absorção de água pela semente, causando estresse hídrico (SILVEIRA et al., 2016), interferindo posteriormente no processo de aclimatização.

Considerando que a germinação de sementes e o crescimento de plântulas ocorrem por meio de processos de hidrólise e mobilização de reservas, a redução da absorção de água pode retardar a absorção exógena de açúcares e interferir em processos bioquímicos da semente, como no metabolismo dos carboidratos, que são fontes de energia para os processos de diferenciação celular (JACOB et al., 2020). A sacarose é uma fonte de carbono importante para o crescimento das células e tecido vegetais e é o carboidrato mais utilizado na proliferação de brotos e indução de raízes *in vitro* (YASEEN et al., 2013).

Tabela 3. Crescimento de plântulas na aclimatização de *Euterpe edulis* oriundas de sementes imaturas.

Substratos	S (%)	C (%)	NF	NR	DC (mm)	CPA (cm)	CR (cm)
MS + sacarose + mio-inositol + ágar	35.00 b ¹	65.00 a	0.50 b	0.70 b	1.10 d	2.05 d	2.92 d
MS + mio-inositol + ágar	35.00 b	65.00 a	1.25 a	1.50 a	1.31 b	2.90 c	10.55 a
Ágar	80.00 a	20.00 b	1.05 a	1.50 a	2.07 a	3.93 a	6.11 c
Carolina Soil® <i>in vitro</i>	50.00 b	50.00 a	0.55 b	0.95 b	1.21 c	3.32 b	8.41 b
Carolina Soil® <i>ex vitro</i>	38.25 b	61.75 a	0.40 b	0.70 b	1.07 d	2.11 d	5.75 c
Substratos	CT (cm)	CPA/CR	CPA/DC	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	
MS + sacarose + mio-inositol + ágar	4.98 b	0.70 a	1.85 c	0.03 d	0.02 c	0.05 c	
MS + mio-inositol + ágar	13.45 a	0.27 c	2.17 b	0.47 a	0.07 b	0.54 a	
Ágar	10.04 a	0.64 a	1.89 c	0.36 b	0.13 a	0.50 a	
Carolina Soil® <i>in vitro</i>	11.74 a	0.39 b	2.74 a	0.30 bc	0.06 b	0.36 b	

Carolina Soil® <i>ex vitro</i>	7.88 b	0.36 b	1.97 c	0.24 c	0.06 b	0.31 b
--------------------------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

¹Médias não seguidas pela mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Abreviações S. sobrevivência; C. contaminação; NF. número de folhas; NR. número de raízes; DC. diâmetro de coleto; CPA. comprimento de parte aérea; CR. comprimento de raiz; CT. comprimento total; CPA/CR. comprimento de parte aérea/comprimento de raiz; CPA/DC. comprimento de parte aérea/diâmetro de coleto; MSPA. massa seca de parte aérea; MSR. massa seca de raiz; MST. massa seca total.

Fonte: a autora.

Os maiores crescimentos totais (parte aérea e raiz) foram obtidos nos tratamentos MS + mio-inositol + ágar; Carolina Soil® *in vitro* e ágar (13,45 e 11,74 e 10,04 cm, respectivamente). Isso pode ser explicado pelo maior crescimento de raiz em relação à parte aérea, sendo o maior crescimento de raiz observado no tratamento MS + mio-inositol + ágar (10,55 cm) (Tabela 3). Além disso, destaca-se que o maior crescimento de parte aérea (3,93 cm) e diâmetro de coleto (2,07 mm) foram encontrados com o uso do ágar.

Nos tratamentos MS + sacarose + mio-inositol + ágar e ágar, as plântulas apresentaram relação CPA/CR de 0,70 e 0,64 respectivamente, não diferindo estatisticamente, evidenciando que mudas que apresentaram maior relação CPA/CR apresentaram maior equilíbrio e uniformidade de crescimento entre as partes e diâmetro mais espesso. De acordo com Carneiro (1995), o comprimento de parte aérea e o diâmetro de coleto são variáveis morfológicas fáceis de medição e importantes para estimar a qualidade das mudas. Além disso, pode indicar o quociente de robustez por meio da relação entre estes, sugerindo que quanto maior for o seu valor, maior a capacidade de sobrevivência no campo. A presença de raízes nas mudas obtidas *in vitro* não só aumentam características biométricas, mas também as fisiológicas, como os níveis de clorofila *a* e a taxa fotossintética, proporcionando mudas rusticadas e indicando a importância das raízes para a aclimatização (LEITE et al., 2021).

Nos tratamentos MS + mio-inositol + ágar e ágar, as plântulas apresentaram números de folhas (1,25 e 1,05) e número de raízes (1,5 e 1,5), superiores estatisticamente, e massa seca total superior (0,54 e 0,50 g), respectivamente. Moreira et al. (2006) descrevem que mudas com um maior número de folhas apresentam maior pegamento no campo posterior, visto que as folhas realizam fotossíntese por meio da captação de energia, e assim produzem fotoassimilados.

Não obstante, o uso de substratos de qualidade no processo de aclimatização favorece a boa formação de plântulas e o bom crescimento de raízes. Neste estudo, o substrato utilizado era composto a base de esfagno, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK, propiciando boa aeração, e capacidade de retenção de água, o que favoreceu o crescimento das raízes e translocação de água e nutrientes para a parte aérea (NAVROSKI et al., 2016).

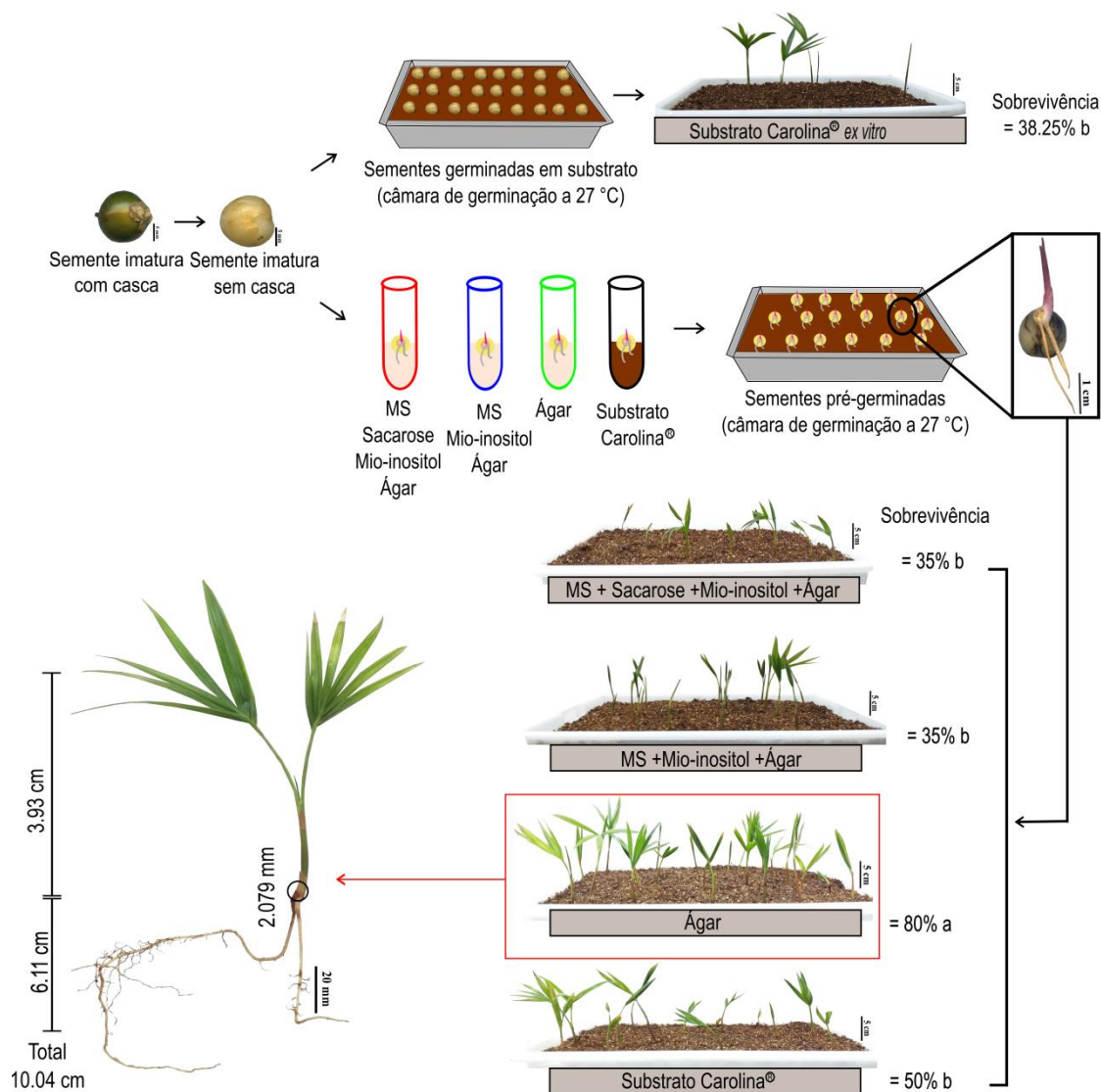


Figura 5. Pré-germinação *in vitro* em diferentes substratos, germinação *ex vitro* de sementes imaturas e crescimento de plântulas de *E. edulis* aclimatizadas *ex vitro*.

Fonte: a autora.

Os resultados inferiores de sobrevivência e crescimento no substrato utilizado *ex vitro* pode ser explicado pelo maior tempo de exposição das sementes imaturas em

um ambiente no qual as sementes adquirem maior umidade com o tempo, tornando-se favorável à contaminação, visto que as sementes pré-germinadas já foram transferidas com formação inicial de raiz e parte aérea, diminuindo este tempo de exposição, sugerindo que esse processo pode ter favorecido o melhor crescimento com formação de novas raízes mais rapidamente, aumentando a taxa de sobrevivência.

A presença de raízes está relacionada à absorção de água e nutrientes e com o desempenho da planta em condições de estresse, desta forma uma estrutura radicular proporciona formação de novas raízes, maior área foliar e número de folhas, assim também maior taxa fotosintética (LEITE et al., 2021).

6. CONCLUSÕES

Sementes imaturas proporcionam plântulas mais vigorosas e seu processo de obtenção é menos oneroso em relação às oriundas de embrião zigótico.

O cultivo *in vitro* de sementes imaturas (180 DAA) apresenta ganho de 130 dias em comparação com sementes maduras (228 DAA).

O GA₃ nas concentrações 0, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ para sementes de *E. edulis* não proporciona a germinação das sementes.

O uso apenas do ágar é uma alternativa menos onerosa para a germinação de sementes de *E. edulis in vitro*, e proporciona menor porcentagem de contaminação, alta taxa de sobrevivência *ex vitro* e maior crescimento de parte aérea e radicular.

7. REFERÊNCIAS

ALHARBY, H. F.; RIZWAN, M.; IFTIKHAR, A.; HUSSAINI, K. M.; REHMAN, M. Z. U.; BAMAGOOS, A. A.; ALHARBI, B. M.; ASRAR, M.; YASMEEN, T.; ALI, S. Effect of gibberellic acid and titanium dioxide nanoparticles on growth, antioxidant defense system and mineral nutrient uptake in wheat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 221, p. 112436, 2021.

ALI, F.; QANMBER, G.; LI, F.; WANG, Z. Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. **Journal of Advanced Research**, v. 35, p. 199-214, 2021.

BAIRU, M.; AREMU, A.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.

BARROSO, M. E. S.; OLIVEIRA, B. G.; PIMENTEL, E. F.; PEREIRA, P. M.; RUAS, F. G.; ANDRADE, T. U.; LENZ, D.; SCHERER, R.; FRONZA, M.; VENTURA, J. A.; VAZ, B. G.; KONDRATYUK, T. P.; ROMÃO, W.; ENDRINGER, D. C. Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius - Juçara palm fruits. **Food Research International**, v. 116, p. 985-993, 2018.

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

BERUTO, M.; CURRIR, P.; DEBERGH, P. Influence of agar on *in vitro* cultures: II. biological performance of ranunculus on media solidified with three different agar brands. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 35, n. 1, p. 94-101, 1999.

BEMBEMCHA, P.; KISHOR, R.; BAI, V. N. *In vitro* immature embryo germination and propagation of *Vanda stangeana* Rchb. f., an orchid endemic to India. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 57, n. 6, p. 615-624, 2016.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILROST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3rd ed., New York: Springer, 2013. 392 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. MAPA/DAS/ACS. 2009. 399 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 443, de 18 de setembro de 2014. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção**. < <https://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-de-especies/fauna-ameacada/flora.html> >.

BRIDGEN, M. P. A review of plant embryo culture. *HortScience*, v. 29, p. 1243-1245, 1994.

CAO, L.; LI, N. Activated-carbon-filled agarose hydrogel as a natural medium for seed germination and seedling growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 383-391, 2021.

CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995. 451 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

CAXAMBÚ, M. G.; GERALDINO, H. C. L.; DETTKE, G. A.; SILVA, A. R.; SANTOS, E. N. Palmeiras (Arecaceae) nativas no município de Campo Mourão, Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, p. 259-270, 2015.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.

CNCFlora. ***Euterpe edulis* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Euterpe edulis](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Euterpe%20edulis)>. Acesso em 3 nov. 2021.

COPETTI, C. L. K.; LUCAS B. R.; ORSSATTO, L. B. R.; DIEFENTHAELER, F.; SILVEIRA, T. T.; SILVA, E. L.; LIZ, S.; MENDES, B. C.; RIEGER, D. K.; VIEIRA, F. G. K.; HINNIG, P. F.; SCHULZ, M. S.; FETT, R.; PIETRO, P. F. Acute effect of juçara juice (*Euterpe edulis* Martius) on oxidative stress biomarkers and fatigue in a high-intensity interval training session: A single-blind cross-over randomized study. **Journal of Functional Foods**, v. 67, p. 103835, 2020.

CORRÊA, M. M.; ARAÚJO, M. G. P.; MENDONÇA, M. S. Morphological and anatomical

characteristics and temporal pattern of initial growth in *Astrocaryum acaule* Mart. **Flora**, v. 253, p. 87-97, 2019.

CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe edulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 134–142, 2014.

ELMASRY, G.; MANDOUR, N.; EJEEZ, H.; DEMILLY, D.; AL-REJAIE, S.; VERDIER, J.; BELIN, E.; ROUSSEAU, D. Multichannel imaging for monitoring chemical composition and germination capacity of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds during development and maturation. **The Crop Journal**, p. 1-20, 2021.

FERREIRA, C. D.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; FERREIRA, J. C. B.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morphostructural and histochemical dynamics of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) germination. **Journal of Plant Research**, v. 133, n. 5, p. 693-713, 2020.

Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 03 nov. 2021.

GALÁN-ACEDO, C.; SPAAN, D.; BICCA-MARQUES, J. C.; AZEVEDO, R. B.; VILLALOBOS, F.; ROSETE-VERGÉS, F. Regional deforestation drives the impact of forest cover and matrix quality on primate species richness. **Biological Conservation**, v. 263, p. 109338, 2021.

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; PEREIRA, C.; ABREU, R. M. V.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BRACHTA, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and biological activities of juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit by-products, a promising underexploited source of high-added value compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 325-332, 2019.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; HANAUER, J. G.; WALDOW, D. A. G. Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. **Revista Árvore**, v. 34, n. 1, p. 39-48, 2010.

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

GUIMARÃES, M. A.; VIDIGAL, D. S.; LOUREIRO, M. E.; DIAS, D. C. F. S.; GUIMARÃES, A. R. Influência de temperatura, luz e giberelina na germinação de sementes de *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl (Brassicaceae). **Revista Ceres**, v. 57, n. 3, p. 372-376, 2010.

HAZARIKA, B.; N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

HOANG, N. N.; KITAYA, Y.; SHIBUYA, T.; ENDO, R. Effects of supporting materials in *in vitro* acclimatization stage on *ex vitro* growth of wasabi plants. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 109042, 2019.

JACOB, P. T.; SIDDIQUI, S. A.; RATHORE, M. S. Seed germination, seedling growth and seedling development associated physiochemical changes in *Salicornia brachiata* (Roxb.) under salinity and osmotic stress. **Aquatic Botany**, v. 166, n. 103272, p. 1-12, 2020.

JOHRI, B. M.; RAO, P.S. **Experimental embryology**. In: JOHRI, B.M. (Ed.) Embryology of angiosperms. Berlin, Springer-Verlag, 1984. p.744-802.

KINGSLEY, T. M.; BRICEA, T. L.; GODSWILL, N. N.; MIR, B. M.; FRANK, N. E. G.; DIEUDONNÉC, N.; CELESTINEC, N.; NAMUENEE, K. S.; EMMANUEL, Y. Mature zygotic embryo rescue improves *in vitro* germination and seedling production in high value oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 445-453, 2016.

LABOURIAU, L. G. **A germinação de sementes**. Washington: OEA, 1983. 174p.

LEAL, A.; BENCHIMOL, M.; FARIA, D.; DODONOV, P.; CAZETTA, E. Landscape-scale forest loss shapes demographic structure of the threatened tropical palm *Euterpe*

edulis Mart. (Arecaceae). **Forest Ecology and Management**, v. 502, 119716, 2021.

LÉDO, A. N.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JUNIOR, J. F. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 989-993, 2007.

LEITE, J. P. V.; XAVIER, A. A.; BATISTA, D. S. Embryo culture, callus induction, and flavonoid profile of *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., an important medicinal species from the Brazilian Cerrado biome. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, n. 3, p. 579-589, 2021.

LEITE, M. S.; PINTO, T. E. F.; CENTOFANTE, A. R.; RUBIO NETO, A.; SILVA, F. G.; SELARI, P. J. R. G.; MARTINS, P. F. Acclimatization of *Pouteria gardeneriana* Radlk micropropagated plantlets: Role of *in vitro* rooting and plant growth-promoting bacteria. **Current Plant Biology**, v. 27, 100209, p. 1-9, 2021.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIYAZAKI, C. M. S.; MIGUEL, O. G.; CÔCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; MIGUEL, M. D. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 321-326, 2012.

LIU, W.; CHEN, X.; LIU, G.; LIANG, Q.; HE, T.; FENG, J. Interspecific hybridization of *Prunus persica* with *P. armeniaca* and *P. salicina* using embryo rescue. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 88, p. 289–299, 2007.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras)**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. Nova Odessa, 2010. 368p.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; NAKAGAWA, J.; MACHADO, C. G. Secagem e armazenamento de sementes de juçara. **Revista Árvore**, v. 33, n. 4, p. 635-642, 2009.

MARTINS-CORDER, M. P.; SALDANHA, C. W. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de diferentes progênies de *Euterpe edulis* Mart. **Revista Árvore**, v. 30, n. 5, p. 693-699, 2006.

MELLO, T.; ROSA, T. L. M.; SIMOES, I. M.; LIMA, P. A. M.; ANJOS, B. B.; ARAUJO, C. P.; HEGEDUS, C. E. N.; SANTOS, H. O.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S.; LOPES, J. C. Reserve mobilization and *in vitro* germination of *Euterpe edulis* (Martius) seeds at different maturation stages. **Trees**, v. 42, e-42461, p. 1-11, 2021.

MENDES, B. C.; COPETTI, C. L. K.; PANZA, V. S. P.; ORSSATTO, L. B. R.; ROSA, J. S.; DIEFENTHAELER, F.; DALMARCO, E. M.; DI PIETRO, P. F.; RIEGER, D. K. Effects of *Euterpe edulis* Martius on inflammatory responses to high-intensity intermittent exercise: Crossover randomized trial. **Nutrition**, v. 91-92, n. 111344, p. 1-9, 2021.

MOREIRA, S. L. S.; PRATES JÚNIOR, P.; FERNANDES, R. B. A.; CUNHA, A. C. M. M.; CAMPOS, A. N. R. Growth and nutrients uptake in *Euterpe edulis* Martius inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 169-176, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, J. R. S.; NETO, D. F.; COUTINHO, I. C.; DOMONT, G. B.; NOGUEIRA, F. C. S.; CAMPOS, F. A. P. Proteome dynamics of the cotyledonary haustorium and endosperm in the course of germination of *Euterpe oleracea* seeds. **Plant Science**, v. 298, 110569, p. 1-24, 2020.

NAVROSKI, M. C.; ARAÚJO, M. M.; CUNHA, F. S.; BERGHETTI, A. L. P.; PEREIRA, M. O. Redução da adubação e melhoria das características do substrato com o uso do hidrogel na produção de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p. 1155-1165, 2016.

NEUBURGER, M.; SOUZA, T. V.; PAULILO, M. T. S. Crescimento inicial de plantas

Euterpe edulis Mart. em diferentes condições de luz, água e nutrientes. **Rodriguésia**, v. 61, n. 2, p. 157-165, 2010.

OLIVEIRA JUNIOR, C. J. F.; NEVES, Y. T. R.; JUNQUEIRA, P. S. População caiçara, Mata Atlântica e situação atual do palmito-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) na região do rio uma da aldeia (Iguape-SP), entorno da estação ecológica Jureia-Itatins. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 1065-1073, 2010.

OLIVEIRA, J.; MORAES, M. C.; CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO-NETO, N. B. Efficient in vitro plantlet development and acclimatization of *Cattleya elongata* Barb. Rodr., a Brazilian endemic and neglected species. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 77-82, 2021.

PANZA, V.; LAÍNEZ, V.; MALDONADO, S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 145, n. 4, p. 445-453, 2004.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.

R CORE TEAM. A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2021.

REES, A. R. High-temperature pre-treatment and the germination of seed of the oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.). **Annals of Botany**, v. 26, n. 4, p. 569-581, 1962.

RIBEIRO, M. S.; STEFFENS, C. A.; OLIVEIRA, L. M.; GARCIA, C.; PIKART, T. G.; SOUZA, G. K. Tratamentos pré-germinativos em sementes de palmitero. **Pesquisa Florestal de Brasileira**, v. 35, n. 84, p. 469-473, 2015.

ROGEZ, H.; POMPEU, D. R.; AKWIE, S. N. T.; LARONDELLE, Y. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **Journal of Food Composition**

and Analysis, v. 24, n. 6, p. 796-800, 2011.

SALDANHA, C. P.; MARTINS-CORDER, M. P. *In vitro* germination and embryogenic competence acquisition of *Euterpe edulis* Martius immature zygotic embryos. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 171-178, 2012.

SAN, B.; YILDIRIM, A. N.; YILDIRIM, F. An *in vitro* germination technique for some stone fruit species: the embryo isolated from cotyledons successfully germinated without cold pre-treatment of seeds. **HortScience**, v. 49, n. 3, p. 294-296, 2014.

SANTOS, J.; VARASSIN, I. G.; MUSCHNER, V. C. Effects of neighborhood on pollination and seed dispersal of a threatened palm. **Acta Oecologica**, v. 92, p. 95-101, 2018.

SCHULZ, M.; BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; NEHRING, P.; ALMEIDA, T. S.; VITALI, L.; SPUDEIT, D. A.; MICKE, G. A.; BORGES, D. L. G.; FETT, R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, n. 2, p. 125–131, 2015.

SCHULZ, M.; BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016.

SCHULZ, M.; GONZAGA, L. V.; SOUZA, V.; FARINA, M.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Neuroprotective effect of juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruits extracts against glutamate-induced oxytosis in HT22 hippocampal cells. **Food Research International**, v. 120, p. 114-123, 2019.

SCHULZ, M.; SERAGLIO, S. K. T.; BRUGNEROTTO, P.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Composition and potential health effects of dark-colored underutilized Brazilian fruits - A review. **Food Research International**, v. 137, 109744, p. 1-28, 2020.

SHAFIQUE, I.; ANDLEEB, S.; AFTAB, M. S.; NAEEM, F.; ALI, S.; YAHYA, S.; AHMED, F.; TABASUM, T.; SULTAN, T.; SHAHID, B.; KHAN, A. H.; ISLAM, G. U.; ABBASI, W. A. Efficiency of cow dung based vermi-compost on seed germination and plant growth parameters of *Tagetes erectus* (Marigold). **Heliyon**, v. 7, n. 1, e05895, 2021.

SHARMA, U.; KATARIA, V.; SHEKHAWAT, N. S. *In vitro* propagation, *ex vitro* rooting and leaf micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: a leguminous tree with medicinal values. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 4, p. 969-977, 2017.

SHIN, K-S.; PARK, S-Y.; PAEK, K-Y. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26-33, 2014.

SILVA, J. Z.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de frutos em *Euterpe edulis* (Martius). **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 295-309, 2018.

SILVA, E. R.; SIMÕES, I. M.; BAPTISTA, J. O.; BIGHI, K. N.; FONTES, M. M. P.; SCHMILDT, E. R.; LOPES, J. C.; CALDEIRA, M. V. W.; ALEXANDRE, R. S. *In vitro* germination of *Melanoxydon brauna* Schott. and evaluation of the toxicity of disinfecting agents in the *Lactuca sativa* L. model plant. **Cerne**, v. 25, n. 4, p.375-385, 2019.

SILVEIRA, S. S.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. *In vitro* seed germination and multiplication of *Calophyllum brasiliense*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 87, p. 185-193, 2016.

SMERTENKO, A.; BOZHKOVA, P. V. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 5, p. 1343-1360, 2014.

SOUZA, F. G.; ARAÚJO, F. F.; FARIAS, D. P.; ZANOTTO, A. W.; NERI-NUMA, I. A.; PASTORE, G. M. Brazilian fruits of Arecaceae family: An overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. **Food**

Research International, v. 138, n. 109690, p. 1-14, 2020.

SOLER-GUILHEN, J. H.; BERNARDES, C. O.; MARÇAL, T. S.; OLIVEIRA, W. B. S.; FERREIRA, M. F. S.; FERREIRA, A. *Euterpe edulis* seed germination parameters and genotype selection. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 42, e42461, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 719p.

TIAN, L.; WANG, Y.; NIU, L.; TANG, D. Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp.: I. In vitro embryo rescue and plant development. **Scientia Horticulture**, v. 117, n. 2, p. 136-141, 2008.

VENTURI, S.; PAILILO, M. T. S. Esgotamento das reservas na semente de *Euterpe edulis* Mart. e efeito da nutrição mineral nas plântulas. **Acta Botanica Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 215-220, 1998.

VERDEIL, J-L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 245-252, 2007.

WU, Y-J.; CANÇÃO, Q-Q.; YUAN, Y.; GUO, F-Q.; WU, K-X.; DONG, M-M. *In vitro* efficiency of embryo rescue of intra- and interspecific hybrid crosses of sweet cherry and Chinese cherry cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 275, n. 109716, p. 1-10, 2021.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011.

XIONG, M.; CHU, L.; LI, Q.; YU, J.; YANG, Y.; ZHOU, P.; ZHOU, Y.; ZHANG, C.; FAN, X.; ZHAO, D.; YAN, C.; LIU, Q. Brassinosteroid and gibberellin coordinate rice seed germination and embryo growth by regulating glutelin mobilization. **The Crop Journal**, v. 9, p. 1039-1048, 2021.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I. A. Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.