



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

**TAMYRIS DE MELLO**

**DESENVOLVIMENTO, MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE  
SEMENTES, E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Euterpe edulis* MARTIUS**

TAMYRIS DE MELLO

**DESENVOLVIMENTO, MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE  
SEMENTES, E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Euterpe edulis* MARTIUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.  
Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.  
Coorientadores: José Carlos Lopes e Adésio Ferreira.

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

---

M527d Mello, Tamyris de, 1993-  
Desenvolvimento, maturação e germinação in vitro de  
sementes, e embriogênese somática de *Euterpe edulis* Martius  
/ Tamyris de Mello. - 2022.  
265 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.  
Coorientadores: José Carlos Lopes, Adésio Ferreira.  
Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e  
Engenharias.

1. Sementes. 2. Germinação. 3. Tecidos vegetais - Cultura e  
meios de cultura. 4. Seleção de plantas - Melhoramento genético.  
5. Sementes - Fisiologia. 6. Plantas - Propagação. I. Alexandre,  
Rodrigo Sobreira. II. Lopes, José Carlos. III. Ferreira, Adésio.  
IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 630\*38

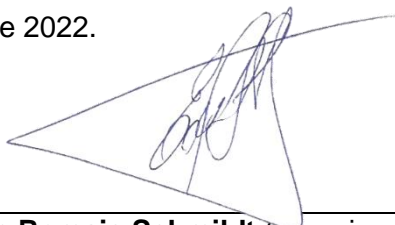
---

**DESENVOLVIMENTO, MATURAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES,  
E EMBRIOGÊNSE SOMÁTICA DE *Euterpe edulis* MARTIUS**

**Tamyris de Mello**

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2022.



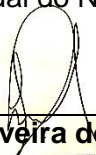
---

**Prof. Dr. Edilson Romais Schmidt** (Examinador externo)  
Universidade Federal do Espírito Santo




---

**Profa. Dra. Virgínia Silva Carvalho** (Examinadora externa)  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro



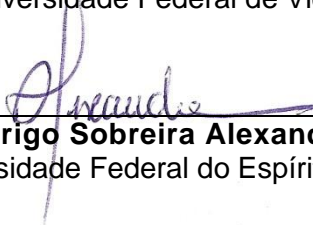
---

**Profa. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos** (Examinadora externa)  
Universidade Federal de Lavras



---

**Prof. Dr. Wagner Campos Otoni** (Examinador externo)  
Universidade Federal de Viçosa



---

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

A Deus e aos meus pais, pela vida,  
por serem meus alicerces, meus  
heróis, meu tudo.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida, minha oportunidade de crescer, de errar, aprender e tentar quantas vezes for necessário para evoluir como ser humano. Por me ouvir e estar ao meu lado, todos os dias, mesmo quando eu não o via. Pela toda força e discernimento, e por cada anjo que colocou em meu caminho.

Aos meus pais, meus verdadeiros heróis, que se dedicaram a vida por mim, pela nossa família, meus maiores exemplos de dedicação, garra e coragem. Obrigada por todo amor, carinho, apoio, educação, compreensão, e por serem a minha base.

Ao Fábio, Simone, Lavínya e Elisa, por todo o amor e carinho, por estarem sempre ao meu lado me tirando sorrisos e fazendo a minha vida mais leve.

Ao Prof. Rodrigo, sempre me faltará palavras suficientes para agradecer e descrever o quão importante foi em minha vida. Como agradecer alguém que não só me orientou em experimentos e desenvolvimento de trabalhos, mas também me ensinou a ser mais humana, a perdoar, a ter mais amor, fé, determinação, persistência, coragem, força, paciência, e até mesmo a estar mais perto de Deus? Sei que cheguei com muitas falhas de conhecimento e de maturidade, mas se hoje sou uma pessoa um pouco melhor, sem dúvida é por tal contribuição. Obrigada, por tanta dedicação e doação de si, e por ter dado o sangue por mim.

Ao Breno, Yanara e Luciano por toda ajuda, paciência, atenção, carinho, por serem meus braços direito e esquerdo quando precisei, por me ouvirem, e principalmente pela amizade.

Aos professores José Carlos Lopes, Heloisa Oliveira dos Santos, Jair Carlos Checon de Freitas, Wagner Campos Otoni, Edilson Romais Schmildt, Adésio Ferreira, Márcia Flores, Fabricio Gomes Gonçalves, Glória Maria de Farias Viégas Aquije, Breno Valentim Nogueira, Patrícia Pinheiro, Antônio Cesar Bozzi, por toda contribuição, disponibilidade, atenção, paciência e ensinamentos.

A Mariana (UFES), Francine (UFES), Antônio (UFLA), Daniel (UFES), Heliane (UFES), Ludmilla (UFV), Tatiane (UFV), que mesmo atarefados sempre

estevem dispostos a ajudar atenciosamente, e por toda paciência e ensinamentos.

Aos técnicos Luciano, Elziane, Gláucia, Sônia, Ramon, Mayara, Tadeu (UFES), e Cláudia (UFV) por toda atenção, disponibilidade, paciência, ensinamento e ajuda.

A toda equipe do Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais, demais laboratórios, e a Universidade Federal do Espírito Santo.

A todos os amigos, de perto ou de longe, que ajudaram direta ou indiretamente, na realização deste trabalho e que me deram forças.

Em especial, gostaria de agradecer a todas as pessoas que encontrei nesse percurso, que me ajudaram sem medir esforços, ajudaram com toda dedicação, carinho e empenho. E que mesmo cheios de outros trabalhos, mergulharam junto comigo na pesquisa e nas análises, contribuindo pelo enriquecimento dessa tese e por tanto ensinamento. Saibam que vocês me encantam!

A caminhada durante esses quatro anos foi árdua, e se não fosse a especial colaboração de cada um para a construção dessa tese, ela não seria o que é hoje, e nem eu. Portanto, a contribuição não foi somente em um trabalho acadêmico, mas também no que me tornei. A cada um, o meu eterno carinho e gratidão, estarão todos guardados para sempre em minhas memórias e no meu coração.

A cada um que, nos bons ou maus momentos, me fizeram sorrir, me deram força, me trouxeram esperança, e me fizeram acreditar que seria possível.

**OBRIGADA!**

*“No tree, it is said, can grow to heaven  
unless its roots reach down to hell.”*

(Carl Gustav Jung)



## RESUMO

DE MELLO, Tamiris. **Desenvolvimento, maturação e germinação *in vitro* de sementes, e embriogênese somática de *Euterpe edulis* Martius.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre. Coorientadores: José Carlos Lopes e Adésio Ferreira.

A espécie *Euterpe edulis* Martius, é uma palmeira pertencente à família Arecaceae, conhecida popularmente como juçara, é amplamente distribuída na Floresta Atlântica. Nas últimas décadas esta palmeira tem sido explorada por causa de seu palmito, e o fato de perfilhar e sua propagação dar-se unicamente por sementes, a espécie é ameaçada de extinção. Suas sementes são recalcitrantes e sua germinação é lenta e desuniforme, fazendo-se necessário o estudo do processo de maturação e de outra técnica de propagação. Portanto, objetivou-se analisar a maturação de sementes, sua geminação e formação de plântulas, alinhado ao desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática. Para isso, foram coletadas sementes ao longo da maturação de diferentes matrizes, analisando em cada estágio características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e físico-química. Para a embriogênese somática, foram utilizados como explantes embriões zigóticos imaturos e segmentos de caulículos de plântulas, em meio de cultura suplementado com diferentes reguladores de crescimento em cada etapa, como ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram), ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético (triclopyr), ácido 3,6-dicloro-piridina-2-carboxílico (clopiralyd), ácido abscísico (ABA), ácido 1-naftalenoacético (ANA), 2-isopenteniladenina (2-iP), em diferentes concentrações. Ao final de cada etapa da embriogênese somática, foram analisadas características quantitativas e qualitativas. O tempo necessário para que ocorra a maturação das sementes de *E. edulis* depende da região e das condições ambientais de cada ano. As sementes possuem reservas suficientes e estrutura físico-químicas que permitem sua máxima germinação *in vitro*, vigor e formação de plântulas normais ainda em estágio imaturo. A indução embriogênica foi eficiente com o uso de picloram (150 µM) ou triclopyr (100 µM) em embriões zigóticos, e o uso de segmentos e caulículo seccionados

longitudinalmente, com ferimento posicionados para cima no meio de cultura, de plântulas de seis meses, e picloram (200  $\mu\text{M}$ ). A maturação de embriões somáticos foi eficaz com o uso de ABA (5  $\mu\text{M}$ ), para os dois tipos de explantes. Portanto, foi possível concluir com o estudo da maturação de sementes o melhor estágio para o uso na germinação *in vitro* e obtenção de plântulas normais, com um ganho de até 126 dias em comparação com o uso do último estágio de maturação. E a técnica de embriogênese somática mostra-se promissora e eficiente na propagação de *E. edulis*.

**Palavras-chave:** sementes, germinação, vigor, cultura de tecidos vegetais, indutores embriogênicos, embriões somáticos.

## ABSTRACT

DE MELLO, Tamiris. **Development, maturation and *in vitro* germination of seeds, and somatic embryogenesis of *Eutepe edulis* Martius.** 2022. Thesis (Doctorate in Forest Sciences) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Rodrigo Sobreira Alexandre. Co-advisors: José Carlos Lopes and Adésio Ferreira.

The species *Eutepe edulis* Martius, is a palm belonging to the Arecaceae family, popularly known as juçara, it is widely distributed in the Atlantic Forest. In recent decades this palm tree has been exploited for its palm heart, and the fact that it grows and propagates solely by seeds, the species is threatened with extinction. Its seeds are recalcitrant and its germination is slow and uneven, making it necessary to study the maturation process and another propagation technique. Therefore, the objective was to analyze seed maturation, twinning and seedling formation, in line with the development of somatic embryogenesis protocols. For this, seeds were collected during the maturation of different matrices, analyzing morphological, physiological, biochemical and physicochemical characteristics at each stage. For somatic embryogenesis, immature zygotic embryos and seedling stem segments were used as explants in a culture medium supplemented with different growth regulators at each stage, such as dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram), 3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid (triclopyr), 3,6-dichloro-pyridine-2-carboxylic acid (clopyralyd), abscisic acid (ABA), 1-naphthaleneacetic acid (ANA), 2-isopentenyladenine (2-iP), in different concentrations. At the end of each stage of somatic embryogenesis, quantitative and qualitative characteristics were analyzed. The time required for the maturation of *E. edulis* seeds depends on the region and the environmental conditions of each year. The seeds have sufficient reserves and physical-chemical structure that allow their maximum *in vitro* germination, vigor and formation of normal seedlings still at an immature stage. Embryogenic induction was efficient with the use of picloram (150 µM) or triclopyr (100 µM) in zygotic embryos, and the use of longitudinally sectioned segments and stems, with the wound positioned upwards in the culture medium, of six-month-old seedlings, and picloram (200 µM). The maturation of somatic embryos

was effective with the use of ABA (5  $\mu$ M) for both types of explants. Therefore, it was possible to conclude with the study of seed maturation the best stage for use in *in vitro* germination and obtaining normal seedlings, with a gain of up to 126 days compared to the use of the last stage of maturation. And the technique of somatic embryogenesis is promising and efficient in the propagation of *E. edulis*.

**Keywords:** seeds, germination, vigor, plant tissue culture, embryogenic inducers, somatic embryos.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1	GERAL .....	19
2.2	ESPECÍFICOS .....	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
3.1	JUÇARA.....	20
3.2	QUALIDADE DE SEMENTES DE <i>Euterpe edulis</i> .....	23
3.3	DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DE SEMENTES.....	32
3.4	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA .....	34
3.5	EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>Euterpe</i> .....	37
3.6	MEIO DE CULTURA .....	39
3.7	INDUTORES EMBRIOGÊNICOS.....	41
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>

### CAPÍTULO I

#### **Seleção de genótipos superiores e qualidade física e fisiológica de sementes de *Euterpe edulis* Martius** .....

**58**

1	INTRODUÇÃO .....	60
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1.	Áreas .....	61
2.2.	Análises físicas e químicas de frutos .....	62
2.3.	Qualidade fisiológica das sementes .....	63
2.4.	Análise estatística.....	63
3	RESULTADOS .....	64
4	DISCUSSÃO .....	69
5	CONCLUSÕES .....	71
6	REFERÊNCIAS.....	72

### CAPÍTULO II

#### **Reserve mobilization and *in vitro* germination of *Euterpe edulis* (Martius) seeds at different maturation stages<sup>1</sup>**.....

**75**

1	INTRODUCTION.....	77
2	MATERIALS AND METHODS .....	79

2.1	Plant material .....	79
2.2	Morphological analysis .....	80
2.3	<i>In vitro</i> germination.....	81
2.4	Biochemical analyses.....	81
2.5	Experimental design .....	83
3	RESULTS.....	83
4	DISCUSSION.....	89
5	CONCLUSION .....	93
6	REFERÊNCIAS.....	94

### CAPÍTULO III

#### Físico-química da maturação de sementes de *Euterpe edulis* Martius: uma espécie de palmeira ameaçada da Mata Atlântica..... 100

1	INTRODUÇÃO .....	102
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1.	Germinação <i>in vitro</i> .....	104
2.2.	Preparo das amostras .....	105
2.3.	Extrativos.....	106
2.4.	Lignina solúvel, insolúvel e carboidratos estruturais .....	106
2.5.	Cinzas .....	108
2.6.	Difração de raio-X .....	108
2.7.	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	108
2.8.	Delineamento experimental .....	109
3	RESULTADOS.....	109
4	DISCUSSÃO .....	117
5	CONCLUSÕES.....	120
6	REFERÊNCIAS.....	120

### CAPÍTULO IV

#### Sistema de defesa antioxidativo na maturação e qualidade fisiológica de sementes *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius ..... 125

1	INTRODUÇÃO .....	127
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	128
2.1	Teor de água das sementes .....	130
2.2	Germinação e vigor das sementes <i>in vitro</i> .....	130
2.3	Análises bioquímicas .....	131
2.4	Delineamento experimental .....	133
3	RESULTADOS.....	133
4	DISCUSSÃO .....	140
5	CONCLUSÕES.....	143

6	REFERÊNCIAS.....	143
---	------------------	-----

## CAPÍTULO V

	<b>Imaginologia e densitometria de raio-X na maturação e qualidade de sementes de <i>Euterpe edulis</i> Martius.....</b>	<b>147</b>
--	--	------------

1	INTRODUÇÃO.....	149
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	150
2.1	<b>Germinação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>151</b>
2.2	<b>GroundEye® e raio-X.....</b>	<b>152</b>
2.3	<b>Densidade.....</b>	<b>152</b>
2.4	<b>Microscopia eletrônica de varredura e detector de energia dispersiva de raios-X (MEV/EDS).....</b>	<b>153</b>
2.5	<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>154</b>
3	RESULTADOS.....	154
4	DISCUSSÃO.....	162
5	CONCLUSÕES.....	165
6	REFERÊNCIAS.....	165

## CAPÍTULO VI

	<b>Indutores auxínicos e análogos ao picloram na embriogênese somática de <i>Euterpe edulis</i> Martius.....</b>	<b>169</b>
--	--	------------

1	INTRODUÇÃO.....	172
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	173
2.1	<b>Coleta e desinfestação.....</b>	<b>173</b>
2.2	<b>Indução.....</b>	<b>173</b>
2.3	<b>Maturação e germinação.....</b>	<b>177</b>
2.4	<b>Crescimento e aclimatização de plântulas somáticas.....</b>	<b>177</b>
3	RESULTADOS.....	178
3.1	<b>Indução.....</b>	<b>178</b>
3.2	<b>Maturação e germinação.....</b>	<b>188</b>
3.3	<b>Crescimento e aclimatização de plântulas somáticas.....</b>	<b>191</b>
4	DISCUSSÃO.....	192
5	CONCLUSÕES.....	195
6	REFERÊNCIAS.....	196

## CAPÍTULO VII

	<b>Picloram na polaridade de segmentos de caulículo de plântulas em diferentes meios de cultura na embriogênese somática direta de <i>Euterpe edulis</i> Martius.....</b>	<b>200</b>
--	---	------------

1	INTRODUÇÃO .....	202
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	203
2.1	<b>Coleta, desinfestação e estabelecimento .....</b>	<b>203</b>
2.2	<b>Indução .....</b>	<b>204</b>
2.3	<b>Maturação .....</b>	<b>206</b>
3	RESULTADOS.....	206
3.1	<b>Indução .....</b>	<b>206</b>
3.2	<b>Maturação .....</b>	<b>208</b>
4	DISCUSSÃO .....	210
5	CONCLUSÕES.....	212
6	REFERÊNCIAS.....	213

## **CAPÍTULO VIII**

**Resposta embriogênica direta de explantes de *Euterpe edulis* Martius mediante lesão e orientação do explante no meio de cultura, cultura em suspensão, e o uso de aminoácidos .....**

1	INTRODUÇÃO .....	218
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	219
2.1	<b>Coleta, desinfestação e estabelecimento .....</b>	<b>219</b>
2.2	<b>Indução .....</b>	<b>220</b>
2.3	<b>Maturação .....</b>	<b>223</b>
3	RESULTADOS.....	224
3.1	<b>Indução embriogênica: ferimentos em caulículo de plântulas de <i>E. edulis</i> em meio sólido com PIC.....</b>	<b>224</b>
3.2	<b>Indução embriogênica: calos friáveis de LWU em meio líquido sob agitação com PIC.....</b>	<b>226</b>
3.3	<b>Indução embriogênica: LWU em meio sólido com aminoácidos</b>	<b>226</b>
3.4	<b>Maturação .....</b>	<b>231</b>
4	DISCUSSÃO .....	232
5	CONCLUSÕES.....	235
6	REFERÊNCIAS.....	235

## **CAPÍTULO IX**

**Idade cronológica a favor da embriogênese somática direta de *Euterpe edulis* Martius .....**

1	INTRODUÇÃO .....	241
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	242
2.1	<b>Coleta, desinfestação e estabelecimento .....</b>	<b>242</b>



2.2	Indução .....	243
2.3	Maturação .....	246
3	RESULTADOS .....	246
3.1	Indução .....	246
3.2	Maturação .....	254
4	DISCUSSÃO .....	255
5	CONCLUSÕES .....	259
6	REFERÊNCIAS .....	259
	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>264</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) é uma palmeira conhecida popularmente como juçara, é amplamente distribuída na Floresta Atlântica (GUERGOLETTTO et al., 2016), principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia (LORENZI, 2006) e Espírito Santo (GUIMARAES et al., 2017).

Esta palmeira é explorada nas últimas décadas por causa da presença de seu palmito (SILVA et al., 2013) que é considerado nobre e com qualidade e sabor superior aos demais pertencentes às espécies do gênero *Euterpe* (BORGES et al., 2011). Além do palmito, a juçara produz frutos que são considerados importante fonte de energia e valor nutricional pela presença de proteínas, açúcares, fibras, ácidos graxos poli-insaturados, ácido oléico e um menor teor de lipídios saturados (GUERGOLETTTO et al., 2016; SCHULZ et al., 2016).

Os frutos desta palmeira possuem também níveis elevados de compostos fenólicos com alta atividade antioxidante, a exemplo de antocianinas (LICHTENTHÄLER et al., 2005; ROSSO; MERCADANTE, 2007; RUFINO et al., 2010), semelhantes aos produzidos pelo açaí (*Euterpe oleracea* Martius e *E. precatoria* Martius), principalmente nos aspectos físicos. No entanto, em relação à sua composição bioativa, os frutos da palmeira juçara mostraram-se mais ricos e com maior potencial antioxidante (RIBEIRO et al., 2018). Rufino et al. (2010) observaram maior teor total de antocianina nos frutos de juçara quando comparado aos de açaí.

A juçara é uma espécie ameaçada de extinção (SILVA et al., 2013), por ser uma das mais exploradas da Floresta Atlântica, o que gera preocupação com a sua preservação, pois não tem capacidade de rebrota após o seu corte para a retirada do palmito (MORTARA; VALERIANO, 2001), o que pode leva-lá à extinção (RIBEIRO et al., 2011; SOUZA; PREVEDELLO, 2020).

Destaque-se que sua propagação se dá unicamente por sementes, normalmente produzidas anualmente. Todavia, sua coleta é dificultada pela altura da palmeira (5-12 m) e pela alta dispersão pela fauna (SCHULZ et al., 2016). Além disso, as sementes são recalcitrantes e sua germinação é lenta e desuniforme, podendo levar de 60 a 90 dias (CURSI; CICERO, 2014), e a

mortalidade das mudas é grande durante os primeiros anos (FANTINI; GURIES, 2007).

Durante o processo de maturação dos frutos ocorrem diversas alterações bioquímicas e metabólicas de compostos primários e secundários (BATISTA-SILVA et al., 2018). E muitos desses fatores podem influenciar nos resultados de germinação e no crescimento das plântulas, fazendo-se necessário pesquisas aprofundadas da formação e mobilização desses compostos.

A não ocorrência de perfilhamento em *E. edulis* e a dificuldade da propagação seminal, indicam a necessidade de se buscar alternativas para contornar tais problemas. Desta forma, a cultura de tecidos, por meio da embriogênese somática surge como alternativa à multiplicação de genótipos de interesse, seja para produzir plantas elites ou acelerar programas de melhoramento (LITZ; GRAY, 1995), e para minimizar os riscos de extinção de diversas espécies, como a juçara. Essa técnica tem sido aplicada a várias outras palmeiras, dentre essas: *Elaeis guineensis* (ALMEIDA et al., 2020), *Euterpe oleracea* (FREITAS et al., 2016), *Phoenix dactylifera* (ALWAEEL; NAIK; AL-KHAYRI, 2017), *Cocos nucifera* (PERERA et al., 2007; 2009a; 2009b), *Euterpe precatoria* (FERREIRA et al., 2022), *Syagrus oleracea* (SILVA-CARDOSO et al., 2020), *Acrocomia aculeata* (MOURA et al., 2009), dentre outras.

Contudo, deve levar em consideração alguns fatores que podem influenciar na formação de embriões somáticos, dentre estes: genótipos, explantes, meios de cultura e reguladores de crescimentos (ASEMOTA et al., 2007; NAMASIVAYAM, 2007; STEINMACHER et al., 2007; GUEYE et al., 2009; PERERA et al., 2009b). A embriogênese somática possibilita a multiplicação em larga escala, em pequeno espaço, de genótipos superiores quanto ao potencial de propagação e teores nutricionais (alimento funcional) e antioxidantes, além de outras características, acelerando programas de melhoramento genético. Para isso, é necessário determinar o melhor explante, meio de cultura, regulador de crescimento e sua concentração para a indução, proliferação, maturação e germinação embriogênica.

Assim, aliado à relevância ecológica da espécie *E. edulis*, sua situação de ameaça de extinção, e alto poder nutricional, justifica a importância de testar diferentes protocolos de embriogênese somática como forma alternativa de

propagar a espécie. Além disso, aliado ao valor econômico, o grande interesse em verificar o potencial de genótipos selecionados, e propagar clones elite.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Analisar e estudar o processo de desenvolvimento, maturação e germinação *in vitro* de sementes, e a formação de plântulas, aliado ao desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática com a espécie *Euterpe edulis*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar genótipos de *E. edulis* de dois locais em diferentes altitudes, e selecionar os melhores indivíduos quanto a qualidade de polpa, e qualidade física e fisiológica de sementes na formação de plântulas.
- Caracterizar a mobilização de reservas durante a maturação das sementes e associá-la à sua qualidade fisiológica e qualidade das mudas.
- Averiguar a germinação *in vitro* e o vigor das sementes, níveis de açúcares e, o papel na estrutura e cristalinidade do endosperma das sementes de *E. edulis* ao longo da maturação.
- Analisar o sistema de defesa antioxidativo no desenvolvimento das sementes associado à germinação e à qualidade de plântulas.
- Estudar o processo de maturação de sementes por meio de análises de imagens e densitometria de raio-X.
- Estudar a responsividade de diferentes indutores embriogênicos do grupo ácido piridinocarboxílicos.
- Analisar a responsividade de explantes de plântulas de *E. edulis* em relação a sua polaridade e, ao tipo e concentração de indutores embriogênicos.
- Averiguar a indução embriogênica em segmentos de plântulas de *E. edulis*, mediante lesões e orientação do explante no meio de cultura, seguido de culturas de suspensão de células, e diferentes fontes de

aminoácidos.

- Examinar a resposta embriogênica de *E. edulis* em virtude do grau de maturidade do explante assoado à concentração do indutor embriogênico.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 JUÇARA

O gênero *Euterpe* pertence à família Areaceae, e esta é constituída por diversas espécies distribuídas nas regiões tropical e subtropical (ZAMBRANA et al., 2007; BARFOD et al., 2011). Dentro da família, o gênero *Euterpe* possui 28 espécies, sendo sete encontradas na América do Sul e Central, e seis no Brasil: *E. edulis* Mart., *E. catinga* Wall., *E. oleracea* Mart., *E. longibracteata* Barb. Rodr., *E. precatória* Mart. e *E. espiritosantensis* Fernandes (MARÇAL et al., 2015). No entanto, este gênero possui duas espécies de grande importância econômica e cultural (GATTI et al., 2011): açaí (*E. oleracea*) e juçara (*E. edulis*) que apresentam potencial para a produção de frutos (FARIAS NETO et al., 2007; PALUDO et al., 2012).

A palmeira juçara amplamente distribuída na Floresta Atlântica (VIEIRA et al., 2013), é conhecida popularmente como juçara, palmito juçara, palmito doce ou içara. Possui estipe única, sem capacidade de rebrota, de crescimento lento, e dependente de florestas bem preservadas, podendo atingir de 8 a 10 m de altura, e diâmetro à altura do peito de 10 a 15 cm (LORENZI et al., 2006). A palmeira juçara produz frutos arredondados não climatéricos que crescem em cachos e possui pericarpo que cobre uma semente dura. As bagas são pequenas com diâmetro de 1 a 1,5 cm e a semente constitui 85% do fruto (BICUDO et al., 2014), com massa de 1000 sementes de 716 g (38% de teor de água) e 1 kg contém em média 1.397 unidades (IOSSI et al., 2016).

As sementes são classificadas como recalcitrantes, possuem embrião pequeno, compreendendo apenas 0,54% da massa da matéria fresca das sementes e com alto grau de hidratação (85% de teor de água) (PANZA et al., 2004). O endosperma maciço compreende cerca de 99% da massa da matéria fresca da semente, tem um teor de água de 48,20% (PANZA et al., 2004).

A rápida redução no teor da água causa a recalcitrância das sementes,

resultando na perda da viabilidade e, conseqüentemente, redução da germinação. Além disso, sua emergência ocorre de forma lenta e desuniforme (BOVI; CARDOSO, 1975), podendo levar de 60 a 90 dias (CURSI; CICERO, 2014).

Desde a década de 1960, essa palmeira tem sido largamente utilizada para a produção de palmito, um dos mais importantes Produtos Florestais Não-Madeiros (PFNMs) brasileiros (TREVISAN et al., 2015). O palmito é considerado nobre e possui sabor e qualidade superiores aos demais das espécies do gênero *Euterpe* (MANTOVANI; MORELLATO, 2000). No entanto, a superexploração levou a entrar para a Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção na categoria vulnerável (BRASIL, 2008, 2014).

No entanto, na última década, uma mudança no uso econômico da espécie pela colheita e processamento de seus frutos para a produção de polpa revolucionou o papel socioeconômico e ecológico dessa palmeira (TREVISAN et al., 2015). É um caso em que uma espécie florestal repentinamente passou da quase extinção para vulnerável e com uma posição de forte potencial para o manejo sustentável em ambientes florestais e em sistemas agroflorestais (TREVISAN et al., 2015). Hoje a juçara compõe a cadeia produtiva de um dos mais importantes PFMNs do mercado brasileiro e internacional.

De acordo com os dados levantados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra de 2018/2019, o valor pago pelo quilograma do fruto de juçara foi em média de R\$ 3,06, no estado de São Paulo. O maior produtor comercial é o estado de Santa Catarina. Em apenas uma das principais distribuidoras de polpas de frutas do litoral catarinense são comercializadas uma média de 50 toneladas de açaí por ano (CONAB, 2019).

Já o estado do Espírito Santo vem buscando ampliar o uso dos frutos de juçara por meio da implantação do Plano de Exploração Sustentável Simplificado para a exploração e extração dos frutos dessa palmeira, dado pela Instrução Normativa nº 03/2013 e por ações de pesquisa e extensão rural (GUIMARÃES; SOUZA, 2017; CONAB, 2019).

Os frutos são constituídos por uma semente de coloração castanho claro e coberta por fina e fibro-carnosa camada de coloração púrpura brilhante e escura, que está relacionado com o alto teor de antocianina presente,

principalmente cianidina 3-rutinosídeo e cianidina 3-glicosídeo (BORGES et al., 2011; CARVALHO et al., 2016). As antocianinas são encontradas em alimentos de origem vegetal e possuem relevância farmacológica e propriedades terapêuticas, representando uma importante classe de antioxidantes, e seu consumo pode trazer diversos benefícios para a saúde (CARVALHO et al., 2016).

Além do alto teor de antocianinas, o fruto de juçara é considerado uma “super-fruta” pelo seu alto valor nutricional, sendo rica em nutrientes (SCHULZ et al., 2015), ácidos oléicos e linoléicos que são os ácidos graxos encontrados em maior proporção, também apresentam alto teor de lipídios (18,45-44,08%), sendo a maior parte ácidos graxos poliinsaturados e baixo teor de lipídios saturados, proteínas de 5,13-8,21% e cinza de 1,55-3,32% (BORGES et al., 2011; CARVALHO et al., 2016).

Portanto, o interesse pelo fruto aumentou pelas suas propriedades antioxidantes, atribuídas ao alto teor de compostos fenólicos presentes, como os ácidos fenólicos, antocianinas e outros flavonóides (DE BRITO et al., 2007; BORGES et al., 2013; BICUDO et al., 2014; CARDOSO et al., 2015). Os compostos fenólicos têm a capacidade de melhorar a atividade antioxidante endógena e protege o corpo contra danos oxidativos causados por radicais livres (SCHULZ et al., 2015). Estes estão associados a menores riscos de doenças crônicas ocasionadas por estresse (GUERGOLETTTO et al., 2016) e na prevenção de doenças degenerativas (OROIAN; ESCRICHE, 2015).

Além disso, o consumo da polpa da juçara exerce papel anti-inflamatório na inflamação subclínica relacionada à obesidade, modulando a via TLR4/NFκBp50, via nos monócitos de indivíduos obesos, destacando-se pela supressão da expressão do gene e proteína de moléculas-chave envolvidas na inflamação, como TLR4 e IL-6. Ademais, a suplementação de juçara poderia modular a energia homeostasia do receptor de leptina, hormônio responsável pelo controle da obesidade (SANTAMARINA et al., 2019).

A polpa do fruto da juçara pode ser consumida na forma de bebidas, sorvetes ou doces, para o seu consumo é necessário que os frutos sejam macerados com água, e separadas das sementes para obter a polpa na coloração roxa (BORGES et al., 2011), esse processo não afeta a qualidade da

semente, podendo ser utilizadas para a produção de mudas.

No entanto, a não ocorrência da propagação por perfilhamento na espécie *E. edulis*, por meio da emissão de brotações na base da planta matriz e pela mesma se propagar única e exclusivamente por sementes, é necessário investigações de novas tecnologias para a produção de mudas em tempo reduzido, em larga escala. Além de se buscar conservação *ex situ*, mediante o uso de explantes assépticos *in vitro* como forma de assegurar um banco de germoplasma de forma mais segura, se comparada à tradicional, a considerar que as sementes desta espécie são recalcitrantes

### 3.2 QUALIDADE DE SEMENTES DE *Euterpe edulis*

A germinação de juçara é do tipo criptocotiledonar, hipógea e ligular adjacente. O cotilédone não se alonga e o desenvolvimento da plântula é adjacente à semente. A raiz primária surge da região inferior da lígula, seguida pelo aparecimento de uma protuberância pontiaguda na região superior da lígula, que corresponde à primeira bainha plumular. Sua germinação foi definida por Queiroz (1986), ocorrendo em dois estádios distintos: (1) protrusão do pecíolo cotiledonar; e (2) crescimento (emergência) da raiz primária e brotação do pecíolo cotiledonar.

A germinação é considerada lenta e desuniforme, podendo levar de 60 a 90 dias (CURSI; CICERO, 2014). Baskin e Baskin (2014a) consideram os embriões de palmeira subdesenvolvidos, sugerindo uma dormência morfológica das sementes, e Alabarce e Dillenburg (2017), associam a lenta e desuniforme germinação de *E. edulis* a um embrião subdesenvolvido, que requer uma quantidade adicional de tempo para atingir tamanho normal após a dispersão e antes da germinação (protrusão da raiz primária).

Muitos fatores podem influenciar nos resultados da germinação de sementes, como o teor de água, luminosidade, temperatura ambiente, genótipo, local e condições ambientais da planta matriz. E, portanto, faz-se necessários estudos para determinar as condições que irão proporcionar às sementes de cada espécie a expressão do seu maior vigor fisiológico.

As sementes de *E. edulis* são classificadas como recalcitrantes, o teor de umidade médio da semente inteira é de 48,5%, 85,3% para embriões isolados e



48,2% para o endosperma (BOVI; CARDOSO, 1975; QUEIROZ; CAVALCANTE, 1986; REIS et al., 1999; MARTINS et al., 2000; ANDRADE, 2001; PANZA et al., 2004). Sementes que possuem teor de água de aproximadamente 45% mantêm a mesma porcentagem de germinação até que o teor de água atinja 35-30%; a viabilidade da semente é perdida quando os valores caem abaixo deste nível. Durante a dessecação contínua, essa espécie apresenta um teor de água letal entre 18% e 24% (ANDRADE, 2001). Outros autores afirmam que abaixo de 20% de umidade as sementes de juçara perdem drasticamente sua capacidade de germinação, podendo ser alcançada com 16 dias de armazenamento das sementes em laboratório, à temperatura e umidade relativa ambiente (ANDRADE; PEREIRA, 1997; REIS et al., 1999).

São sementes que não toleram desidratação, podendo perder somente até 20% de umidade da sua massa de matéria fresca (REIS et al., 1999). Andrade, Malvasi e Costa (1996) estudando graus de umidade em armazenamento de sementes de juçara, verificaram que o armazenamento de sementes até 8 meses com umidade acima de 37% é capaz de germinar pelo menos 61,3%. E Ribeiro et al. (2010) verificaram que é possível armazenar sementes de juçara até 480 dias sob atmosfera modificada, utilizando embalagens de polietileno de baixa densidade com e sem injeção de N<sub>2</sub>, e manter uma germinação de 62,7% com 41% de umidade, e 65,3% com 40,8% de umidade, respectivamente. Possivelmente, tais mudanças na atmosfera, promoveram maior pressão parcial de CO<sub>2</sub> e redução de O<sub>2</sub> no interior das embalagens, o que possibilitou uma redução mais intensa do metabolismo respiratório e, conseqüentemente, retardou a degradação de reservas nas sementes. Além disso, após 480 dias, a condutividade elétrica foi menor nesses tratamentos, confirmando a manutenção do poder germinativo das sementes e da integridade dos sistemas de membranas celulares.

Quanto à luminosidade, as sementes de juçara são consideradas indiferentes à luz (não fotoblásticas) com o mesmo desempenho de germinação tanto na luz, quanto no escuro (ROBERTO; HABERMANN, 2010). Já a temperatura adequada para a obtenção de uma maior porcentagem de germinação foi definida por Salomão et al. (2009) estudando diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C) com sementes com e sem polpa,

as maiores porcentagens de germinação e os menores tempos médios foram observados na temperatura de 25 °C (90% com 39,3 dias, 100% com 37,4 dias). Os autores também identificaram que sementes procedentes de mata de galeria (utilizadas no estudo), apresentaram teores de água (32,4% com polpa e 31,7% sem polpa) diferentes das sementes procedentes de florestas ombrófilas densas de encosta e terra firme das regiões Sul e Sudeste (de 51% a 55% com polpa e de 43% a 50% sem polpa). Além disso, foram mais tolerantes ao dessecamento, tendo como umidade crítica valores  $\leq$  a 23%, enquanto sementes procedentes de florestas ombrófilas densas apresentaram umidade crítica variando de 28% a 44%.

No entanto, essa variação na porcentagem de germinação e também no tempo gasto no processo pode variar de genótipo para genótipo. Diferentes autores encontraram diferentes taxas de germinação para *E. edulis*: Nodari et al. (1998) – 73%, aos 180 dias; Andrade et al. (1999) – 73%, aos 100 dias; Negreiros e Perez (2004) – 44%, aos 160 dias; Martins-Corder e Saldanha (2006) – 38%, aos 150 dias; e Soler-Guilhen et al. (2020) em um estudo de seleção de genótipos, com a germinação variando de 30-90%, com maiores taxas de germinação no 20-30º dia.

Além desses fatores, outros podem influenciar diretamente a germinação e o crescimento das plântulas, como a composição hormonal nas sementes e os tipos e quantidades de metabólitos primários transferidos da planta mãe e que serão utilizados como reserva para o crescimento do embrião (DONOHUE, 2009; BASKIN; BASKIN, 2014b; LI et al., 2017).

Avaliações de perfis hormonais ainda são escassas para sementes de palmeira (BICALHO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015; DIAS et al., 2017). Em *E. edulis*, determinou-se a curva de embebição das sementes com uma absorção inicial de água, e subsequente estabilização da massa da matéria fresca, aproximadamente 12 dias após a semeadura (ROBERTO; HABERMANN, 2010). Para a maioria das sementes ortodoxas, essa nova estabilização de massa indica o início da fase estacionária da curva de embebição (fase II), quando se espera que as atividades metabólicas das sementes recomece (FINKELSTEIN, 2004), e pode representar o melhor momento para o tratamento das sementes, a fim de acelerar sua germinação. As giberelinas podem induzir respostas de

alongamento e divisão de células embrionárias de sementes, enquanto as citocininas podem promover o crescimento embrionário, controlando o ciclo celular e a mitose (FINKELSTEIN, 2004).

A aplicação de 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), aos 12 dias após a semeadura, promoveu maior desempenho germinativo, com maior porcentagem de germinação em menor tempo, em comparação aos outros tratamentos estudados por Roberto e Habermann (2010), enquanto a aplicação de 6-benzilaminopurina (BAP) resultou em menor desempenho germinativo, mesmo quando comparado ao controle. O endosperma de sementes tratadas ou não com GA<sub>3</sub> não apresentou alterações em relação ao conteúdo celular e paredes celulares intactas, após o tratamento, podendo indicar uma falta de mobilização da reserva.

O fato de haver uma embebição inicial de água, com uma estabilização da massa da matéria fresca de sementes 12 dias após o início da embebição, não implica necessariamente que o metabolismo do embrião foi reativado. As sementes recalcitrantes não têm reativação do metabolismo porque suas atividades metabólicas não são desativadas após a dispersão dos frutos (ROBERTO; HABERMANN, 2010). O alto desempenho germinativo das sementes de *E. edulis* após o tratamento com GA<sub>3</sub> por Roberto e Habermann (2010), e confirmado por Roberto e Habermann (2011), não está relacionado à mobilização de reservas de sementes, e sim pelo GA<sub>3</sub> induzir a expansão celular no embrião.

Em estudos com *Butia capitata*, a germinação foi relacionada a aumentos nas razões ácido giberélico/ácido abscísico e conteúdos de citocininas, auxinas e castasterone nos haustórios. A ativação da mobilização de reserva durante a germinação foi associada a aumentos nos conteúdos de zeatina, ácido indol 3-acético e o precursor etileno, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), no endosperma adjacente. Ocorreram diminuições nos níveis hormonais de todas as estruturas após o estabelecimento da zona de digestão do endosperma nas sementes germinadas, além de alterações citológicas (DIAS et al., 2018).

Análises anatômicas de embriões de *E. edulis* revelaram que estes possuem tecidos diferenciados por ocasião da dispersão e possui inúmeras mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e complexos de Golgi, que indicam

que o mesmo se encontra em estado metabolicamente ativo (PANZA et al., 2004). No entanto, o endosperma de *E. edulis* aparece em estado quiescente, com lipídios, proteínas, minerais e mananos armazenados como reservas insolúveis, revelando a falta de remobilização de reservas (PANZA et al., 2004).

As duas áreas de reserva de armazenamento em uma semente de palmeira são o endosperma maciço e duro e o cotilédone do pequeno embrião. Em Arecaceae, o processo de mobilização de reservas é especialmente complexo, pois suas sementes possuem um endosperma rígido estocado, geralmente com grandes quantidades de óleos e levando ao desenvolvimento de um haustório altamente especializado a partir de um embrião diminuto. O cotilédone/haustório, durante a germinação se desenvolve em uma estrutura absorvente, sendo uma característica típica de embriões das Arecaceae, onde são altamente desenvolvidos. A visão predominante sobre o papel do cotilédone/haustório é de absorção de fontes de carbono e nitrogênio resultantes da digestão das reservas armazenadas no endosperma e transferência para as plântulas (OLIVEIRA et al., 2013).

Em juçara, o tamanho das sementes não afeta a sua germinação, no entanto, sementes maiores tem grande efeito no crescimento das plântulas, pois possuem maiores quantidades de reserva e hormônios. As plântulas esgotam as reservas da semente em aproximadamente seis meses, sendo que 70% são passadas ao eixo embrionário, nos primeiros três meses de crescimento (ANDRADE; VENTURI; PAULILO, 1996). O que resulta na perda de massa de matéria seca do endocarpo e tegumento da semente, que ocorre vagorosamente, assim, quando a plântula apresenta duas folhas expandidas (aproximadamente aos seis meses) as reservas da semente já estão completamente exauridas (VENLURI; PAULILO, 1998).

As principais reservas armazenadas no endosperma de juçara são lipídios, proteínas e hemiceluloses. Os lipídios e proteínas estão presentes no citoplasma na forma de corpos proteicos e lipídicos. As hemiceluloses, principalmente mananas, estão na forma de paredes celulares espessadas. No embrião, o cotilédone contém corpos lipídicos e proteicos, principalmente na protoderme, meristema fundamental e procâmbio. Taninos, ráfides e sílica também ocorreram frequentemente nos tecidos embrionários. No entanto, não

há evidência de mobilização de armazenamento, e o endosperma parece estar em um estado inativo, pois os lipídios, proteínas, minerais e mananas são armazenados como reservas insolúveis, e revela a falta de mobilização de reservas do endosperma para o embrião (PANZA et al., 2004).

No endosperma de *E. edulis*, os lipídios totais representam cerca de 0,45% da massa da matéria total do endosperma (base de massa de matéria seca) (PANZA et al., 2009), semelhante aos resultados médios encontrados por Roberto e Habermann (2011), 6 mg g<sup>-1</sup> de semente seca de lipídios totais, ao longo do período de germinação. De acordo com estudos de Panza et al. (2009), no embrião, os lipídios estão presentes em quantidades extremamente baixas. Os ácidos graxos insaturados são predominantes, cuja soma foi de 65% do total de ácidos graxos do endosperma e 60% do embrião. O embrião e endosperma continham predominantemente ácidos linoleico, palmítico e oleico, embora os valores relativos fossem diferentes para cada tecido, no embrião, as concentrações de ácido  $\alpha$ -linolênico e palmitoleico e ácido esteárico foram semelhantes. Já no endosperma, o  $\alpha$ -linolênico e o palmitoleico eram ácidos graxos menores. Traços de outros ácidos graxos de 16, 20, 22 e 24 carbonos também foram detectados em ambos os tecidos. Ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, no endosperma e embrião de *E. edulis*, representavam cerca de 55 e 48%, respectivamente (PANZA et al., 2009).

Os ácidos graxos poli-insaturados são as moléculas presentes nas membranas sensíveis ao oxigênio encontradas na natureza (SPITELLER, 2003). A alta insaturação de ácidos graxos provoca mudanças nas estruturas da membrana, aumentando sua fluidez. Além disso, a insaturação também aumenta a suscetibilidade dos ácidos graxos à degradação como consequência da peroxidação da dupla ligação. A curta longevidade encontrada na semente de *E. edulis* pode ser um reflexo do alto teor relativo de ácidos insaturados encontrados nas sementes (que representaram cerca de 65% e 60% do endosperma total e do ácido graxo do embrião, respectivamente) (PANZA et al., 2009). Esses autores encontraram ácidos graxos com 15-16 carbonos presentes apenas em embriões de *E. edulis*, e ausentes no endosperma. Esses fatos podem explicar o comportamento recalcitrante na espécie, com um espectro de ácidos graxos mais amplo no embrião do que no endosperma.

Já o conteúdo de proteína total de *E. edulis*, representou 5,39% e 2,46% da massa de matéria seca do endosperma e do embrião, respectivamente. As proteínas solúveis totais também foram quantificadas para diferentes frações do endosperma e do embrião, mostrando que as duas principais frações eram albuminas, globulinas e proteínas solúveis em dodecil sulfato de sódio para o endosperma e albuminas e glutelinas para o embrião (PANZA et al., 2009).

Outros autores, também estudando a composição química de sementes de *E. edulis*, confirmam baixas porcentagens de cinzas, lipídios totais e proteínas (abaixo de 6,3%), e altas porcentagens de carboidratos totais (acima de 80%), enquanto a quantidade de amido nas sementes foi considerada indetectável ( $<0,10 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (BORGES et al., 2011; IOSSI et al., 2016). Em *Mauritia flexuosa* as reservas abundantes de carboidratos e proteínas são convertidas em amido, que é depositado em torno do eixo embrionário (MOURA et al., 2019). Além disso, estudos realizados com outras espécies de palmeiras indicaram que o amido é uma substância chave para a mobilização de reservas endospermicas e embrionárias (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017; DIAS et al., 2018). A formação de amido transiente é consequência da mobilização de reservas endospermicas, e as taxas de deposição e consumo dependem do estágio de desenvolvimento da muda (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017).

Durante o crescimento de mudas de *Acrocomia aculeata*, as proteínas armazenadas e os polissacarídeos são os primeiros compostos a serem mobilizados, seguidos pelos lipídios e componentes da parede celular (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017; 2020). Dados semelhantes foram registrados, tanto em estudos histoquímicos quanto bioquímicos, para o embrião e endosperma de *Phoenix dactylifera* (DEMASON et al., 1985), *Washingtonia filifera* (DEMASON, 1988), *Butia capitata* (OLIVEIRA et al., 2013), *Euterpe oleracea* (NASCIMENTO et al., 2020) e *E. precatoria* (FERREIRA et al., 2020). Em geral, a reserva protéica do embrião é inicialmente importante como fonte de energia para o início da germinação, além de fornecer aminoácidos para a biossíntese de novas proteínas ou enzimas estruturais; por outro lado, a reserva de lipídios é essencial durante o crescimento da muda (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2020).

Em *Euterpe precatoria*, análises histoquímicas revelaram a presença de

proteínas, em depósitos de diferentes tamanhos e formas ao longo da região haustorial, principalmente na periferia das vertentes procambiais, e próximo ao eixo embrionário (FERREIRA et al., 2020). Além da proteína, pequenos e poucos grãos de amido também foram identificados dentro e ao redor da plúmula e na extremidade distal. Nesse mesmo estudo, aos 15 dias, com o início da protrusão da raiz, as reservas de proteína foram quase totalmente consumidas, o que resultou na vacuolização celular. Junto com o consumo de proteína, os grãos de amido apareceram nas células do parênquima da região distal (haustorial), na região cortical e na capa da raiz primária em formação. Aos 60 dias, o desenvolvimento foi caracterizado pelo crescimento mais significativo do haustório, com consumo gradual de endosperma e clara delimitação do pecíolo cotiledonar.

No haustório, a mobilização das proteínas armazenadas ocorre durante a embebição e, no endosperma, é iniciada imediatamente após a germinação (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017). A mobilização de lipídios é tardia em comparação com outros tipos de reservas. Este processo é complexo porque envolve a coordenação de várias vias bioquímicas com a ação de enzimas em diferentes níveis subcelulares para converter triacilgliceróis em açúcares solúveis e gerar energia (BEWLEY et al., 2013). As principais reações ocorrem no glioxissoma e na mitocôndria, sendo necessários estudos ultraestruturais para identificar se é necessário mais tempo para a proliferação dessas organelas. No endosperma e no haustório de *A. aculeata*, os lipídios são hidrolisados por lipases, inicialmente presentes nos corpos protéicos e, em estágios posteriores, no citoplasma, que atuam nos corpos lipídicos, sugerindo que há transferência de lipases dos corpos protéicos para o citoplasma. O haustório desempenha um papel importante no controle da mobilização das reservas de sementes e atua como uma estrutura para armazenamento, absorção, conversão de compostos e transporte dos produtos da hidrólise (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017).

Em *Euterpe oleracea*, foi identificado um total de 1965 proteínas, 1538 no cotilédone/haustório e 960 no endosperma, a maioria dessas proteínas estão relacionadas ao desmantelamento da parede celular, principalmente aquelas envolvidas na mobilização de reserva (NASCIMENTO et al., 2020). A principal

reserva em Arecaceae é o manano presente na parede celular, que confere dureza e proteção ao embrião em formação. No entanto, a resistência mecânica exercida pelo manano resulta em um longo período de germinação, pois requer esforços consideráveis de crescimento por parte do embrião (BUCKERIDGE, 2010; MOURA et al., 2019).

Em Arecaceae, no entanto, há evidências de que enzimas digestivas (particularmente endo- $\beta$ -mananase) são armazenadas em células de endosperma e que podem ser ativadas por sinais emitidos pelos embriões (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017; DIAS et al., 2018). A atividade da endo- $\beta$ -mananase, ocorre em associação com a vacuolização, causando a expansão e separação celular, e conseqüentemente, o enfraquecimento da parede celular (DIAS et al., 2018).

A enzima endo- $\beta$ -mananase desempenha papel central no estabelecimento da zona de digestão do endosperma, pois está envolvida na mobilização de reservas de manano. Essa enzima demonstrou estar envolvida na mobilização das reservas de endosperma nas palmas *Phoenix dactylifera* (DEMASON et al., 1985), *Elaeis guineensis* (ALANG et al., 1988), *Acrocomia aculeata* (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017; 2020), *Butia capitata* (DIAS et al., 2018) e *Euterpe oleracea* (NASCIMENTO et al., 2020).

Em *E. oleracea* a porcentagem manana equivale a 80% dos carboidratos nas sementes, neste estudo várias enzimas degradantes de manana, incluindo a endo- $\beta$ -mananase, foram identificadas no cotilédone/haustório e no endosperma. Embora mananas sejam a principal reserva de sementes de *E. oleracea*, uma variedade de carboidratos estruturais, como glicose, galactose, xilose e arabinose também estão presentes. A diversidade de enzimas de processamento de polissacarídeos da parede celular aumenta da mesma forma que as mananases (NASCIMENTO et al., 2020).

Além das mananases, foram identificadas no cotilédone/haustório de *E. oleracea*, o ácido UDP-glucurônico descarboxilase, responsável pela conversão irreversível do ácido UDP-glucurônico em UDP-xilose, doador de xilose para a síntese de xilano e xiloglucano; o UDP-Xil-4-epimerase responsáveis pela conversão de UDP-xilose em UDP-arabinose, usada na biossíntese de pectina; além de xilosidases, poligalacturonases, pectinesterases e pectina



acetilesterases. A identificação dessas enzimas no cotilédone/haustório pode ser casualmente relacionada à remodelação da parede celular necessária para o crescimento, absorção e função secretora do cotilédone/haustório (NASCIMENTO et al., 2020).

Já no endosperma de *E. oleracea* foi identificado, além das proteínas globulina 11S, globulinas 7S, globulina 63 kDa, a proteína oleosina, um dos principais componentes das gotículas lipídicas conhecidas como corpos oleosos, indicando que os lipídios são uma importante reserva de nutrientes no endosperma. Além disso, algumas lipases envolvidas na liberação de ácidos graxos de corpos oleosos foram identificadas no cotilédone/haustório, indicando que os corpos lipídicos armazenados no endosperma são provavelmente mobilizados na zona de digestão. E tanto para o cotilédone/haustório quanto para o endosperma, foram identificadas as enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação (tiolase, acil-CoA oxidase e acil-CoA sintetase) e no ciclo de glioxilato (isocitrato liase, malato sintase), indicando que ambos os tecidos são ativos no catabolismo lipídico adicional à liberação de ácidos graxos de corpos oleosos (NASCIMENTO et al., 2020).

### 3.3 DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DE SEMENTES

O desenvolvimento dos frutos/sementes de *E. edulis* é classificado em três fases, de acordo com a consistência do endosperma: aquoso, gelatinoso e sólido (SILVA; REIS, 2018). Segundo estes autores, o endosperma aquoso inicia-se aos 37 dias após a antese (DAA), com tamanho de fruto pequeno (5 mm) e, duração de 63 dias; o endosperma gelatinoso, com média de 8 mm de diâmetro, com duração de 40 dias; e o endosperma sólido, a partir de 12 mm de diâmetro, porém, ainda imaturos (coloração verde e embrião em desenvolvimento). Após, aproximadamente 204 DAA, os frutos amadurecem e permanecem na planta mãe por mais 47 dias, quando são dispersos totalmente, o tempo de cada fase pode variar 2-6 dias.

No entanto, o período gasto para a maturação dos frutos de cada planta de *E. edulis* pode ser variável em cada período de frutificação. O tempo gasto para a maturação de sementes produzidas pela espécie, foi observado por Mantovani e Morellato (2000) – 226 dias, e Silva e Reis (2018) – 224 dias.

Em outras espécies de *Arecaceae*, como *Elaeis guineensis*, a fase com o endosperma aquoso inicia-se com 35 DAA, indo até os 70 DAA, quando passa para a fase gelatinosa, até a forma sólida madura com 112 DAA (KOK et al., 2013). Em *Acrocomia aculeata* também há três fases distintas de desenvolvimento. A fase I abrange o período entre a antese até cerca de 90 DAA, os tecidos do pericarpo crescem e se diferenciam, e o conteúdo de água permanece alto. Na fase II, a água é substituída por substâncias estruturais e reservas em todas as estruturas dos frutos, indo até a maturidade fisiológica da semente, a partir do qual não há um aumento na massa seca, com cerca de 300 DAA. Na fase III, o mesocarpo amadurece, associado à deposição contínua de reservas metabólicas, processo que progride até a abscisão, com 360 DAA (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2015).

O ciclo de maturação dos frutos/sementes envolve uma sequência de mudanças bioquímicas, fisiológicas e estruturais, como alterações nos níveis hormonais, na atividade respiratória, na atividade enzimática e na organização celular (AWAD, 1993; CHITARRA; CHITARRA, 2005). Tais alterações influenciarão na mudança da cor dos frutos, visto que ocorre destruição dos cloroplastos e quebra da clorofila, formando pigmentos como os carotenoides e antocianinas; no sabor característico, resultante da transformação do amido em açúcares solúveis; na textura, com a solubilização da lamela média e da parede celular; síntese de substâncias voláteis, responsáveis pelo aroma; mudanças químicas nos carboidratos, ácidos orgânicos, proteínas, fenólicos e pectinas (AWAD, 1993; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Alguns estudos de maturação de sementes em *Arecaceae* usaram, como critério de fases a cor do fruto. E as maiores porcentagens de emergência foram obtidas de sementes extraídas de frutos de coloração escura (marrom e preto arroxeadas) por se encontrarem no final do processo de maturação, como em *Phoenix roebelenii* (IOSSI et al., 2007), *Phoenix canariensis* (PIMENTA et al., 2010), e *Copernicia prunifera* (PEREIRA et al., 2014).

O início do ciclo de uma planta a partir da germinação de suas sementes, dependerá dos tipos e quantidades de metabólitos primários transferidos da planta mãe às sementes, durante a maturação (DONOHUE, 2009; BASKIN; BASKIN, 2014b; LI et al., 2017). Geralmente, os carboidratos, proteínas e

lipídeos são em maior quantidade e mais utilizados no processo de germinação (ALENCAR et al., 2012; ZHAO et al., 2018) influenciando na sua porcentagem e velocidade (SORIANO et al., 2014).

Em um estudo com quatro fases de maturação de sementes de *E. edulis* (198, 240, 267 e 280 dias após a abertura da espata), a máxima qualidade fisiológica das sementes sem polpa foi atingida aos 267 dias após abertura da espata, período em que apresentaram máximo acúmulo de massa da matéria seca, maior índice de velocidade de germinação e poder germinativo (GARCIA, 2015). No entanto, não há análises quanto a mobilização das reservas ao longo da maturação.

Em *Elaeis guineensis*, o conteúdo de lipídios e carboidratos totais aumentou significativamente aos 70 DAA, e o conteúdo de proteína acumulou-se gradualmente e permaneceu relativamente constante até o estágio final de desenvolvimento das sementes (KOK et al., 2013). Já em *Acrocomia aculeata*, os compostos de reserva não são armazenados nas fases iniciais do desenvolvimento do fruto, mas, próximo aos 200 DAA, os grãos de amido começam a se depositar, acompanhados de aumentos na massa da matéria seca do fruto e reduções no seu conteúdo de água. O acúmulo de lipídios também se inicia nesta mesma fase, até aproximadamente 260 DAA (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2015).

Nas palmeiras, a mobilização de reservas é especialmente complexa, tanto na maturação, quanto no processo de germinação das sementes. E ainda, são escassos estudos que detalham todo o processo fisiológico e bioquímico, principalmente para *E. edulis*. Os poucos trabalhos com a espécie referem-se a mobilização de reservas de frutos maduros durante a germinação.

### 3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática é o processo em que as células se desdiferenciam para formar embriões, e depois reorganiza a sua configuração epigenética e bioquímica para reiniciar o ciclo celular e formar tecidos em etapas morfológicas semelhantes à embriogênese zigótica (FEHÉR et al., 2002), ou seja, é um processo de diferenciação celular pelo qual uma célula somática altera seu programa genético e se desenvolve em uma célula embrionária

(AGUILAR-HERNÁNDEZ; LOYOLA-VARGAS, 2018). Essa técnica oferece muitas vantagens, como a produção de unidades encapsuláveis ou sementes sintética; e produção ilimitada de clones elite (MUJIB; SAMA, 2006; ASLAM et al., 2011).

A indução de embriogênese somática nas plantas só é possível se as células somáticas recuperarem sua totipotência e adquirirem a competência necessária para responder aos sinais embriogênicos (PASTERNAK et al., 2002), ou seja, a indução de competência embriogênica em células que não são naturalmente embriogênicas. Essas transformações envolvem alterações celulares, bioquímicas, genéticas e epigenéticas coordenadas, produzidas por reguladores de crescimento exógenos ou estresse, que desencadeiam uma expressão maciça de genes em várias ondas de expressão (AGUILAR-HERNÁNDEZ; LOYOLA-VARGAS, 2018). A primeira onda de genes de expressão compreende fatores de transcrição, como AGL15, LEC2, LEC1, BBM, MAD-box e WUS, seguida de uma segunda onda de transcrição envolvendo genes que codificam enzimas envolvidas na homeostase de auxinas e citocininas, bem como outros reguladores de crescimento exógenos (AYIL-GUTIÉRREZ et al., 2013; MÁRQUEZ-LÓPEZ et al., 2018; AGUILAR-HERNÁNDEZ; LOYOLA-VARGAS, 2018).

A embriogênese somática *in vitro* apresenta dois padrões básicos de desenvolvimento de embriões: a direta, na qual os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos de matrizes sem a formação de estádios intermediários de calos; e a indireta, na qual os embriões somáticos se formam a partir de calos, que apresentam células em diferentes estádios de diferenciação (SHARP et al., 1980). Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do zigótico, ou seja, em Liliopsida, a passagem pelos estádios globular, escutelar e coleóptilo (GARCIA et al., 2019).

O progresso no desenvolvimento de sistemas *in vitro* permitiu a indução da embriogênese em muitas plantas economicamente importantes (SANTOS et al., 1997; ZELENÁ, 2000; AOSHIMA, 2005). Um exemplo é a propagação vegetativa do dendê (*Elaeis guineenses* Jacq.), que permitiu a produção de material uniforme para programas de plantio no campo e no melhoramento

genético (LOW et al., 2008; KONAN et al., 2010; BEULÉ et al., 2011).

Este método de propagação é o mais apropriado para serem usadas em palmeiras, pois, normalmente as sementes são seu único meio de propagação natural, com germinação de suas sementes, lenta e irregular (PADILHA, 2013; SILVA et al., 2014), e possui dificuldade de propagar por meio de outras técnicas (LEDO et al., 2002; SANÉ et al., 2006; STEINMACHER et al., 2007).

A embriogênese somática foi descrita pela primeira vez em palmeiras por Staritsky (1970) e depois por Rabechault et al. (1970) com *Elaeis guineenses*. Já foi relatado em 18 espécies de palmeiras e várias cultivares (REE; GUERRA, 2015), como por exemplo: *Chamaedorea costaricana* Oerst. (REYNOLDS; MURASHIGE, 1979); *Bactris gasipaes* Kunth (VALVERDE et al., 1987); *Euterpe edulis* (GUERRA; HANDRO, 1988); *Euterpe oleracea* (LEDO et al., 2002); *Acrocomia aculeata* Jacq. (MOURA et al., 2009).

A indução e o desenvolvimento de embriões somáticos vão depender de alguns fatores como a composição do meio de cultura, tipo de explante, genótipo, tipo de hormônio e da sua concentração, proteínas presentes no meio e dos fatores de estresse (ROSE et al., 2010). Assim, cada tipo de explantes com células diferenciadas ou indiferenciadas tornam-se embriogênicas quando submetidas às condições de estresse, que podem ser ocasionadas de forma artificial pela adição de reguladores de crescimento no meio de cultura (THOMPSON, 2007; VIÑAS; JIMÉNEZ, 2011).

Os embriões zigóticos têm sido o explante mais usados nos estudos de embriogênese somática na maioria das espécies de palmeiras, pois são altamente responsivos e mais rápidos, por possuírem células menos diferenciadas e têm alto grau de uniformidade fisiológica (SILVA et al., 2012). Além disso, possuem muitos genes expressos durante a embriogênese zigótica, que ainda estão ativos (ISAH, 2016), especialmente quando imaturos; são abundantes em muitas espécies, causam pouca ou nenhuma destruição da planta matriz, e geralmente são livres de endófitos e patógenos (REE; GUERRA, 2015). O grau de maturidade dos tecidos utilizados influencia nas respostas embriogênicas de forma que, o potencial de indução e obtenção de um número significativo de embriões somáticos é inversamente proporcional ao grau de maturidade do explante utilizado, principalmente em Liliopsida (FREITAS et al.,

2016; ISAH, 2016).

### 3.5 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Euterpe*

Das 28 espécies do gênero *Euterpe*, apenas três vem sendo estudadas quanto ao desenvolvimento de protocolos de embriogênese somática, *Euterpe oleracea*, *Euterpe precatoria* e *Euterpe edulis*. No primeiro estudo com *E. oleracea* foi possível verificar a expressão de um modelo de embriogênese somática direto, repetitivo e assincrônico em embriões zigóticos maduros cultivados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 339,36  $\mu\text{M}$  de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), e transferidos para meio MS na presença de 0,537  $\mu\text{M}$  de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 12,30  $\mu\text{M}$  de 2-isopenteniladenina (2-iP). A conversão de embriões somáticos em plântulas foi alcançada aos 210 dias transferência das culturas para um terceiro meio com a concentração de sais e sacarose reduzida pela metade e ausência de reguladores de crescimento (LEDO et al., 2002).

Calos embriogênicos foram obtidos a partir de embriões zigóticos imaturos de *E. oleracea*, cultivados em meio MS modificado com 2,4-D e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012). A concentração ideal de picloram para a indução de alta frequência de calos embriogênicos (72%) foi de 225  $\mu\text{M}$ . Os calos embriogênicos foram subcultivados em um meio de diferenciação e maturação composto por meio MS modificado com 2-iP e ANA com subculturas em intervalos de quatro semanas. Os embriões somáticos foram convertidos em plantas em meio MS/2. Os embriões somáticos foram assincrônicos e estudos ontogenéticos confirmaram que as divisões celulares iniciais ocorrem nas regiões epidérmica e subepidérmica dos embriões zigóticos (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

A indução embriogênica de *E. oleracea* mediada por picloram (450  $\mu\text{M}$ ) produziu mais calos embriogênicos (84,7%) (FREITAS et al., 2016). No estágio de diferenciação e maturação, 100% dos explantes que apresentaram formação de calos embriogênicos resultaram em embriões somáticos. A maior taxa de conversão em plântulas (58,7%) foi observada a partir de embriões zigóticos imaturos (80-100 dias, pós-antese) se comparada aos maduros (160-180 dias, pós-antese) no tratamento com um meio de indução contendo picloram (450

$\mu\text{M}$ ).

Já *E. precatória*, o primeiro e único trabalho foi realizado por Ferreira et al. (2022) em que utilizaram como explantes embriões zigóticos maduros em meio MS ou Eeuwens (Y3) suplementado com 2,4-D ou Picloram (0, 6,79, 13,57, 20,36, 27,15  $\mu\text{M}$ ). Como meio de multiplicação, utilizaram 4,14  $\mu\text{M}$  de 2,4-D ou Picloram, associado à 2,46  $\mu\text{M}$  2-iP. E na histodiferenciação e maturação dos embriões somáticos foi em meio Y3 com meia força ou adicionado 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA e 12,3  $\mu\text{M}$  de 2-iP. Os melhores resultados foram obtidos com o meio de cultura Y3 suplementado com 13,57 e 20,36  $\mu\text{M}$  de Picloram, e foram identificados diferentes tipos de calos embriogênicos, embriões somáticos com estruturas tipo suspensor, indicando origem unicelular, bem como embriogênese secundária.

Já para a espécie *E. edulis* o primeiro protocolo de embriogênese somática foi desenvolvido por Guerra e Handro (1988), de forma direta, na qual verificaram a expressão com altas concentrações de 2,4-D (50-100  $\text{mg L}^{-1}$ ). A transferência dos tecidos com aglomerados de embriões foi para o meio com 2-iP (5  $\text{mg L}^{-1}$ ) e ANA (0,5  $\text{mg L}^{-1}$ ), ou sem reguladores de crescimento, ambos induziram o desenvolvimento embrionário em plântulas.

Em outro trabalho, Guerra e Handro (1998) utilizaram como explantes embriões zigóticos, inflorescências jovens e folhas jovens, no mesmo meio de indução do trabalho anterior, mudando a concentração do meio de maturação para 2-iP (2,5  $\text{mg L}^{-1}$ ) e ANA (0,1  $\text{mg L}^{-1}$ ), e para converter embriões a plântulas, as culturas foram transferidas para um terceiro meio cuja sacarose e sais foram reduzidos à metade da força do meio basal, sem reguladores de crescimento. O estudo histológico das culturas embriogênicas revelou que, no caso de embriões zigóticos, os embriões somáticos surgem diretamente da superfície do nó cotiledonar ou de tecidos subepidérmico. Nas inflorescências, um tecido pró-embriogênico é formado na região do primórdio floral, e nas folhas, o primeiro evento morfogênico é a proliferação celular no parênquima vascular.

A indução embriogênica em embriões zigóticos de *E. edulis* foi também investigada por meio de menores concentrações de 2,4-D (0, 30, 35, 40  $\text{mg L}^{-1}$ ) e 2-iP (3  $\text{mg L}^{-1}$ ), além disso, cultivaram bainhas das folhas com picloram (72,3  $\text{mg L}^{-1}$ ) ou 2,4-D (66,3  $\text{mg L}^{-1}$ ), e 2-iP (3  $\text{mg L}^{-1}$ ), variando concentrações de L-

glutamina (0; 0,29; 0,58; 1,17 g L<sup>-1</sup>) (SALDANHA et al., 2006). Diferente dos demais autores, Saldanha et al. (2006) obtiveram embriões somáticos indiretos, induzidos a partir de embriões zigóticos em meio de cultura com 2,4-D (40 mg L<sup>-1</sup>). A maior porcentagem de formação de calos nas bainhas foliares ocorreu com 2,4-D (66,3 mg L<sup>-1</sup>) e L-glutamina (1,17 g L<sup>-1</sup>).

Em um outro trabalho, Saldanha et al. (2012) também testaram a indução de embriogênese somática com diferentes concentrações de cloreto de cálcio e a germinação dos embriões somáticos em meio MS ou MS/2, porém, em ambos os trabalhos, não houve diferenças significativas. O aumento da concentração de Ca<sup>+2</sup> no meio de cultura resultou em uma diminuição no número médio de embriões somáticos cultivada a partir de plântulas de palmeira com 150 dias de idade. Já a germinação de embriões somáticos e conversão em plântulas, no meio MS, a taxa de conversão foi 50% e 40% em MS/2.

Recentemente, Oliveira et al. (2022) desenvolveram um protocolo de embriogênese somática de *E. edulis*, utilizaram com embriões zigóticos como explantes, e testaram os indutores 2,4-D e Picloram em diversas concentrações (25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250; 275; 300 µM L<sup>-1</sup>), Na maturação, utilizaram 2-iP (12,3 µM L<sup>-1</sup>), ANA (0,6 µM L<sup>-1</sup>), polivinilpirrolidona (PVP) (1 g L<sup>-1</sup>) e/ou carvão ativo (CA) (3 g L<sup>-1</sup>). E na germinação, GA<sub>3</sub> (0,5 µM L<sup>-1</sup>), BAP (1 µM L<sup>-1</sup>), com e sem pulso de ANA ou ácido indol-3-butírico (AIB) (2000 mg L<sup>-1</sup>). Na fase de indução o número total de embriões somáticos foi de 44,33 com 2,4-D (175 µM L<sup>-1</sup>) e 76,33 com PIC (300 µM L<sup>-1</sup>). Os autores, sugeriram a utilização de picloram (300 µM L<sup>-1</sup>) na indução embriogênica; 2-iP e ANA associado à CA, na maturação; e BAP e GA<sub>3</sub> sem pulso de auxina na germinação de embriões somáticos de *E. edulis*.

Os resultados obtidos por esses autores, mostram o potencial do uso da embriogênese somática para estabelecer programas de conservação e melhoramento, pois é possível a conversão completa em plântulas. No entanto, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos mais concisos e eficientes.

### 3.6 MEIO DE CULTURA

Um dos fatores do meio de cultura, que influencia diretamente na resposta do tecido vegetal, é a sua consistência. O ágar é um dos agentes gelificantes



mais utilizados nos diferentes meios de cultura, pois não são digeridos por enzimas vegetais e não reage fortemente com os constituintes do meio (GEORGE et al., 2008).

Geralmente, os pesquisadores usam ágar em concentrações entre 5 e 10 g L<sup>-1</sup>. A concentração ideal de ágar deve ser determinada para cada meio de cultura e tipo de explante. Uma concentração muito alta pode levar ao estresse hídrico no tecido, e por outro lado, submergir o explante em um meio líquido estacionário resultará em trocas gasosas reduzidas e, logo, em crescimento deficiente, e até a morte do tecido (BONGA; ADERKAS, 1992). Portanto, a concentração do agente gelificante poderá alterar a disponibilidade de nutrientes, oxigênio, água e o potencial osmótico do meio (COSTA et al., 2012).

Os requisitos nutricionais podem ser supridos por meio líquido, mas o crescimento em meio líquido pode ser afetado pela privação de oxigênio e hiperidratação. A concentração de oxigênio do meio líquido geralmente é insuficiente para atender às necessidades respiratórias das células e tecidos submersos. Porém, essa concentração pode ser aumentada no meio, colocando células ou tecidos em contato direto com o ar, ou colocando o meio em constante agitação (GEORGE et al., 2008).

Um outro problema pode ser o potencial hídrico do meio, que se for maior que o de uma célula, a água flui para o seu interior e o vacúolo se distende. Esse estado fisiológico pode ser chamado de hiperidricidade, em que as células e tecidos apresentam um acúmulo anormal de água no seu interior, resultando em um aspecto translúcido. Calos hiperídricos têm aspecto vítreo e aquoso e, em geral, não possuem capacidade regenerativa. Esses calos são constituídos de células do parênquima sem elementos do xilema (KEVERS et al., 2004).

O potencial hídrico é determinado pelo potencial osmótico dos solutos no meio e, no caso de um meio gelificado, pelo potencial matricial do gel. Reduções na hiperidricidade podem ser obtidas aumentando as concentrações dos solutos e de ágar; ou pela evaporação da água dos tecidos se eles forem colocados em contato com o ar (GEORGE et al., 2008).

O potencial osmótico de um meio pode influenciar na embriogênese somática regulando o desenvolvimento adequado dos embriões. Um baixo potencial osmótico é geralmente favorável, mas dependerá da espécie. A

colocação de tecidos em soluções com alto potencial osmótico fará com que as células se plasmolisem, levando à quebra de interconexões citoplasmáticas entre células adjacentes (plasmodesmata), quando células e grupos celulares são isolados por esse processo, eles se tornam capazes de se desenvolver independentemente e expressar sua totipotência (WETHERELL, 1984). Portanto, é necessário ajustar as concentrações do agente gelificante do meio para elevar o potencial embriogênico dos tecidos vegetais, sem causar problemas.

### 3.7 INDUTORES EMBRIOGÊNICOS

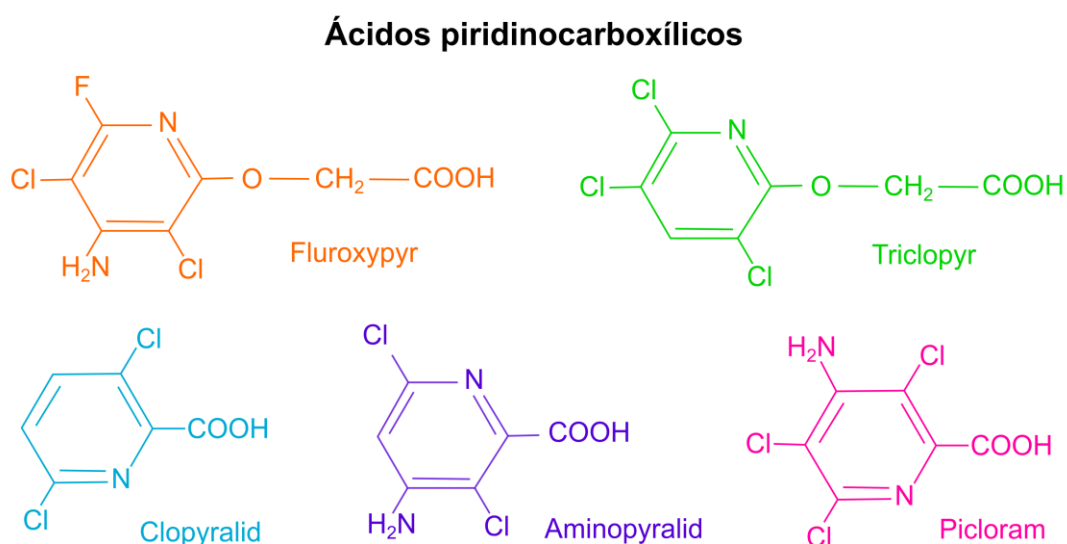
Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que apresentam ação similar aos hormônios vegetais e atuam em vários mecanismos de desenvolvimento das plantas em baixas concentrações, dentre os reguladores existentes os principais são as auxinas e as citocininas (TAIZ; ZEIGER, 2004). As auxinas são importantes na embriogênese somática em inúmeras espécies, pois estão envolvidas na regulação do ciclo e diferenciação celular (JIMÉNEZ, 2005). Dentre as auxinas que já são usadas na embriogênese somática tem-se o picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico).

O picloram é um produto químico orgânico sintético que pertence ao grupo de herbicida ácidos piridinocarboxílicos (MARCO-BROWN et al., 2014), conhecidos como mimetizadores de auxinas. O picloram aparece como uma alternativa de indutor de embriogênese somática pela sua eficácia na absorção e mobilização, bem como à sua rápida metabolização em locais específicos da planta (KARUN et al., 2004), proporcionando bons resultados em palmeiras, como: *Bactris gasipaes* (VALVERDE et al., 1987; STEINMACHER et al., 2007), *Calamus merrillii* Becc. e *C. subinermis* Wendl. ex Becc. (GOH et al., 1999, 2001) e *Euterpe oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

Além do picloram, existem outros herbicidas mimetizadores de auxinas do grupo ácidos piridinocarboxílicos: o fluroxypyr (ácido 4-amino-3,5-dicloro-6-fluoro-2-piridiloxiacético), o triclopyr (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético), o clopyralid (ácido 3,6-dicloro-piridina-2-carboxílico) e o aminopyralid (ácido 4-amino-3,6-dicloropiridina-2-carboxílico). No entanto, são inexistentes pesquisas com essas moléculas na embriogênese somática.

Pouco se sabe do modo de ação como reguladores de crescimentos

desses compostos. O fluroxypyr induz respostas do tipo auxina, interrompe o processo metabólico chave e pode resultar em sintoma letal na planta (MA, 2002), o triclopyr é rapidamente translocado em todas as plantas (GORRELL et al., 1988; LEWER; OWEN, 1990), principalmente pela via simplástica, e se acumula no tecido meristemático (RADOSEVICH; BAYER 1979). O composto clopyralid é facilmente translocado e induz respostas do tipo auxina características em tecidos em crescimento, afetando a respiração e o crescimento das células vegetais (ZHAO et al., 2011). E o aminopyralid é o que possui composição química mais semelhante ao picloram (Figura 1). Portanto, são moléculas em potencial para a indução embriogênica.



**Figura 1.** Estrutura química de cada molécula pertencente ao grupo ácido piridinocarboxílicos: fluroxypyr (ácido 4-amino-3,5-dicloro-6-fluoro-2-piridiloxiacético), o triclopyr (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético), o clopyralid (ácido 3,6-dicloro-piridina-2-carboxílico), aminopyralid (ácido 4-amino-3,6-dicloropiridina-2-carboxílico), e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico).

#### 4 REFERÊNCIAS

- AGUILAR-HERNÁNDEZ, V.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1658, p. 1-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01658>
- ALABARCE, F. S.; DILLENBURG; L. R. Maternal light environment during seed development can affect seed quality of *Euterpe edulis*. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 29, p. 1-11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0083-5>
- ALANG, Z. C.; MOIR, G. F. J.; JONES, L. H. Composition, degradation and

utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Annals of Botany**, v. 61, n. 2, p. 261-268, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087553>

ALENCAR, N. L.; INNECCO, R.; GOMES-FILHO, E.; GALLÃO, M. I.; ALVAREZ-PIZARRO, J. C.; PRISCO, J. T.; OLIVEIRA, A. B. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. *jamacaru* (Cactaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 823-832, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652012000300024>

ALMEIDA, R. F.; MEIRA, F. S.; GOMES, H. T.; BALZON, T. A.; BARTOS, P. M. C.; MEIRA, R. DE O.; DA CUNHA, R. N. V.; LOPES, R.; MEHTA, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. *Pisifera*) from immature leaf tissues. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 229-239, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.026>

ALWAEEL, H. A.; NAIK, P. M.; AL-KHAYRI, J. M. **Synchronization of somatic embryogenesis in date palm suspension culture using abscisic acid**. In: AL-KHAYRI, J.; JAIN, S.; JOHNSON, D. (eds) Date palm biotechnology protocols. Humana Press: New York, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_18)

ANDRADE, A. C. S.; MALAVASI, M. M.; COSTA, F.A. Conservação de palmito (*Euterpe edulis* Mart.): efeito da temperatura de armazenamento e do grau de umidade das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 2, p. 149-155, 1996. DOI: <http://dx.doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v18n2p149-155>

ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 987-991, 1997.

ANDRADE, A. C. S.; VENTURI, S.; PAULILO, M. T. S. Efeito tamanho das sementes de *Euterpe edulis* Mart. sobre a emergência e crescimento inicial. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 18, n. 2, p. 225-231, 1996. DOI: <http://dx.doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v18n2p225-231>

AOSHIMA, Y. Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. **Plant Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 277-280, 2005. DOI: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.22.277>

ASEMOTA, O.; EKE, C. R.; ODEWALE, J. O. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators: sucrose and nitrogen. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 20, p. 2353-2357, 2007. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2369>

ASLAM, J.; KHAN, S. A.; CHERUTH, A. J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P.; SRIVASTAVA, P. S. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy,

histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 369-380, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.06.002>

AYIL-GUTIÉRREZ, B. A.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; PEÑA-CABRERA, E.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 11, p. e26998, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.26998>

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 114 p.

BARFOD, A. S.; HAGEN, M.; BORCHSENIUS, F. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1503-1516, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcr192>

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**, 2nd Edn. San Diego, CA: Elsevier, 2014a. 1600p. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-080260-9.X5000-3>

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. What kind of seed dormancy might palms have? **Seed Science Research**, v. 24, p. 17-22, 2014b. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258513000342>

BEULÉ, T.; CAMPS, C.; DEBIESSE, S.; TRANCHANT, C.; DUSSERT, S.; SABAU, X.; JALIGOT, E.; ALWEE, S. S. R. S.; TREGGAR, J. W. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormally in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, n. 1, p. 169-182, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0323-9>

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer, New York, USA, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>

BICALHO, E. M.; PINTÓ-MARIJUAN, M.; MORALES, M.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S.; GARCIA, Q. S. Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance. **Plant Biology**, v. 17, p. 990-996, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/plb.12332>

BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 142-147, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0406-0>

BONGA, J. M.; ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Boston: kluwer academic publishers, v. 2, 1992, 249p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-015-8058-8>

BORGES, G. DA S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.;

ZAMBLAZI, R. C.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2128-2133, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.006>

BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J.; HELLERM, M. G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 363-369, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.035>

BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Germinação de sementes de palmitheiro (*Euterpe edulis* Mart.). **Bragantia**, v. 34, n. 7, p. 23-29, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87051975000100028>

BRASIL. Instrução Normativa Nº 6. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União de 23 de setembro de 2008**, (Seção 1) 185, p.75-83.

BRASIL. **Portaria MMA Nº 443, de 17 de dezembro de 2014**, seção 1, p. 110-121.

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017-1023, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>

CARDOSO, A. L.; DI PIETRO, P. F.; VIEIRA, F. G. K.; BOAVENTURA, B. C. B.; DE LIZ, S.; BORGES, G. DA S. C.; FETT, R.; ANDRADE D. F. DE; SILVA E. L. Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n. 15, p. 152-162, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.014>

CARVALHO, A. G. S.; MACHADO, M. T. C.; SILVA, V. M.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, R. A. F.; HUBINGER, M. D. Physical properties and morphology of spray dried microparticles containing anthocyanins of jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract. **Powder Technology**, v. 294, n. 44, p. 421-428, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.03.007>

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 783 p.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim da sociobiodiversidade**. v. 3, n. 2, p. 33-37, 2019.

COSTA, A. S.; SILVA, J. H. S.; TORRES, M. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. Composição do meio de cultura na redução da hiperidricidade *in vitro* em híbrido de manjeriço. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. S168-S172, 2012.

CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe dulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p.134-142, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v32n2847>

DE BRITO, E. S.; DE ARAUJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jabolão, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0715020>

DEMASON, D. A. Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera* L.). **Protoplasma**, v. 126, p. 168-177, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01281792>

DEMASON, D. A. Seedling development in *Washingtonia filifera* (Arecaceae). **Botanical Gazette**, v. 149, p. 45-56, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1086/337690>

DIAS, D. S.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; MUNNÉ-BOSCH, S.; GARCIA, Q. S. Hormonal profile and the role of cell expansion in the germination control of Cerrado biome palms seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 188, p. 168-177, 2017. DOI: [10.1016/j.plaphy.2017.06.015](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.015)

DIAS, D. S.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; MELO, G. A.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Haustorium–endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae) seeds. **Annals of Botany**, v. 122, n. 2, p. 267-277, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcy065>

DONOHUE, K. Completing the cycle: material effects as the missing link in plant life histories. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 1059-1074, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0291>

FARIAS NETO, J. T. DE; RESENDE, M. D. V. DE; OLIVEIRA, M. DO S. P. DE; SANTOS, N. S. A. DOS; CANUTO, E. L.; NOGUEIRA, O. L. N.; MULLER, A. A. Avaliação genética de progênies de polinização aberta de açaí (*Euterpe oleracea*) e estimativas de parâmetros genéticos. **Cerne**, v. 13, n. 4, p. 376-383, 2007.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; OTVOS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, v. 57, n. 1, p. 5-12, 2002.

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 precatória* (Arecaceae) germination. **Journal of Plant Research**, v. 133, p. 693-713, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10265-020-01219-7>

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatória* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. x, p. y-y, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>

FINKELSTEIN, R. R. The role of hormones during seed development and germination In: DAVIES, P. J. (ed) **Plant hormones: biosynthesis, signal**

transduction, action Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2004, p. 513-537. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_24)

FREITAS, E. DE O.; MONTEIRO, T. R.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, n. 14, p. 126-135, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.044>

GARCIA, C.; ALMEIDA, A. F. DE; COSTA, M.; BRITTO D.; VALLE, R.; ROYAERT, S.; MARELLI J. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 2, p. 193-212, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>

GARCIA, V. A. **Desenvolvimento e maturação de frutos e sementes de espécies de Arecaceae (*Bactris gasipaes* Kunth., *Euterpe edulis* Mart. e *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman)**. 2015. 118 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, Programa de Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, 2015.

GATTI, M. G.; CAMPANELLO, P. I.; GOLDSTEIN, G. Growth and leaf production in the tropical palm *Euterpe edulis*: Light conditions versus developmental constraints. **Flora**, v. 206, n. 8, p. 742-748, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.04.004>

GEORGE E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3 ed., v. 1, Dordrecht: Springer, 2008. 503p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>

GOH, D. K. S.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; MONTEUUIS, O.; BOM, M-C. Evidence of somatic embryogenesis from root tip explants of the rattan *Calamus manan*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 35, n. 5, p. 424-427, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0060-7>

GOH, D. K. S.; BOM, M-C.; ALIOTTI, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE N.; MONTEUUIS, O. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 37, n. 3, p. 375-381, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0066-2>

GORRELL, R. M.; BINGHAM, S. W.; FOY, C. L. Translocation and fate of dicamba, picloram and triclopyr in horsenettle, *Solanum carolinense*. **Weed Science**, v. 36, p. 447-452, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043174500075184>

GUERGOLETTI, K. B.; COSTABILE, A.; FLORES, G.; GARCIA, S.; GIBSON, G. R. *In vitro* fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v.196, n. 33, p. 251-258, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration



in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 7, p. 550-552, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00272754>

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 65-71. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02507151>

GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; TRANBARGER, T. J.; SANE, D.; TREGEAR, J. W.; BORGEL, A.; VERDEIL, J. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 1, p. 35-45, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9573-3>

GUIMARÃES, L. A. O. P.; SOUZA, R. G. **Palmeira juçara**: patrimônio natural da Mata Atlântica no Espírito Santo. Vitória, ES: Incaper, 2017. 68 p.

IOSSI, E.; MÔRO, F. V.; FERRARI, R. A.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, R. D. Chemical composition, embryo anatomy and viability by tetrazolium test of pyrenes of *Euterpe edulis* Mart. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n.4, p. 310-316, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5039/agraria.v11i4a5399>

IOSSI, E.; SADER, R.; MORO, F. V.; BARBOSA, J. C. Maturação fisiológica de sementes de *Phoenix roebelenii* O'Brien. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 147-154, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222007000100020>

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.38, n. 118, p. 1-22, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2134-6>

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 2-3, p. 91-110, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x>

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v. 86, n. 12, p. 1623-1628, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0109>

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: at typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, n. 2, p. 181-191, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016825.18930.e4>

KOK, S. Y.; NAMASIVAYAM, P.; EE, G. C-L.; ONG-ABDULLAH, M. Biochemical characterisation during seed development of oil palm (*Elaeis guineensis*). **Journal of Plant Research**, v. 126, n. 4, p. 539-457, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10265-013-0560-8>

KONAN, E. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL,

A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0787-y>

LEDO, A. D. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C. D.; OLIVEIRA, M. D. S. P. D.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000300004>

LEWER, P.; OWEN, W. J. Amino acid conjugation of triclopyr by soybean cell suspension cultures. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 33, p. 249-256, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(89\)90123-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(89)90123-5)

LI, R.; CHEN, L. J.; WU, Y. P.; ZHANG, R.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; HU, X. Effects of cultivar and maternal environment on seed quality in *Vicia sativa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01411>

LICHTENTHÄLER, R.; RODRIGUES, R. B.; MAIA, J. G. S.; PAPAGIANNPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleraceae* Mart. (açai) fruit. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 53-64, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/09637480500082082>.

LITZ, R. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 416-425, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00364617>

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 672p.

LOW, E. T.; ALIAS, H.; BOON, S. H.; SHARIFF, E. M.; TAN, C. Y. A.; OOI, L. C. L.; CHEAH, S. C.; RAHA, A. R.; WAN, K. L.; SINGH, R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 62, p. 1-19, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-62>

MA, J. Differential sensitivity to 30 herbicides among populations of two green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 275-281, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001280249>

MANTOVANI, A.; MORELLATO, L. P. C. **Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmito**. In: REIS, A.; REIS, M. S. *Euterpe edulis* Martius: biologia, conservação e manejo sustentado. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000. p. 23-38.

MARÇAL, T. DE S.; FERREIRA, A.; OLIVEIRA, W. B. DOS S.; GUILHEN, J. H. S.; FERREIRA, M. F. DA S. Correlações genéticas e análise de trilha para

caracteres de fruto da palmeira juçara. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 3, p. 692-698, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-163/14>

MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, C. A.; KÚ-GONZÁLEZ, Á.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v. 255, n. 2, p. 695-708, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1181-1>

MARCO-BROWNA, J. L.; ARECOA, M. M.; SÁNCHEZ, R. M. T.; AFONSO, M. S. Adsorption of picloram herbicide on montmorillonite: Kinetic and equilibrium studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 449, n. 14, p.121-128, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.038>

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A.; STANGUERLIM, H. Influência do peso das sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes) na porcentagem e na velocidade de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 47-53, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v22n1p47-53>

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F. Ontogenesis of the pseudomonorous fruits of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits, **Trees**, v. 29, n. 1, p. 199-214, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-014-1104-0>

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. **Protoplasma**, v. 254, p. 1563-1578, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1048-x>

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; PAIVA, E. A. S. Ultrastructural aspects of metabolic pathways and translocation routes during mobilization of seed reserves in *Acrocomia aculeate* (Arecaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 43, p. 589-600, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00622-7>

MORTARA, M. O.; VALERIANO, D. M. Modelagem da distribuição potencial do palmito (*Euterpe edulis* Martius) a partir de variáveis topográficas. In: SBSR, 10, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: INPE, 2001. p. 459-471.

MOURA, A. C. F.; RIBEIRO, L. M.; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y. R. F. Cytological and histochemical evaluations reveal roles of the cotyledonary petiole in the germination and seedling development of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Protoplasma**, v. 256, p. 1299-1316, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01375-1>

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y. Induction of somatic embryogenesis in

immature seeds of guava tree cv. Paluma. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 507-511, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452009000200027>

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENDRELLA, M. C.; SÁ, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 447-454, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.033>

MUJIB, A.; ŠAMAJ, J. (Ed.). **Somatic embryogenesis**. Springer Science & Business Media, 2006, 354 p. DOI: <http://doi.org/10.1007/b136454>

MURASHIGE, T. M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 1, p. 1-8, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9249-9>

NASCIMENTO, J. R. S.; FERREIRA NETO, D.; 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, p. 110569, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110569>

NEGREIROS, G. F.; PEREZ, S. C. J. G. A. Resposta fisiológica de sementes de palmeiras ao envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 4, p. 391-396, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000400013>

NODARI, R. O.; FANTINI, A. C.; GUERRA, M. P.; REIS, M. S.; SCHUCH, O. Conservação de frutos de palmito (*Euterpe edulis* Martius) sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Árvore**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 1998.

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCANDANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F. O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Tress**, v.27, p. 1633-1645, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0910-0>

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, n. 2, p. 10-36, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>

OVERBEEK, J. V.; BLONDEAU, R.; HORNE, V. Difference in activity between 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other auxins, and its significance in herbicidal action. **Plant Physiology**, v. 26, n. 4, p. 687-696, 1951. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.26.4.687>

PADILHA, J. H. D. **Embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. utilizando a técnica do Tcl ("Thin Cell Layer")**. 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná,

Curitiba.

PALUDO, G. F.; SILVA, J. Z.; REIS, M. S. Estimativas de produção de frutos de palmito (*Euterpe edulis* Mart.) a partir da densidade de indivíduos.

**Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 92-102, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.37002/biobrasil.v%25vi%25i.277>

PANZA, V.; LÁINEZ, 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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00293.x>

PANZA, V.; PIGHIN, D.; LÁINEZ, V.; POLLERO, R. J.; MALDONADO, S.

Storage lipids and proteins of *Euterpe edulis* seeds. **Biocell**, v. 33, p. 99-106,

2009. DOI: <https://doi.org/doi:10.32604/biocell.2009.33.099>

PASTERNAK, T. P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS,

G.; ASARD, H.; VAN ONCKELEN, H. Á.; DUDITS D.; FEHÉR, A. The role of

auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf

protoplast derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1807-1819,

2002. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.000810>

PEREIRA, D. S.; SOUZA, J. E. S.; PEREIRA, M. S.; GONÇALVES, N. R.;

BEZERRA, A. M. E. Emergence and initial growth of *Copernicia prunifera*

(Arecaceae) as a function of fruit maturation. **Journal of Seed Science**, v. 36,

n. 1, p. 9-14, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S2317-15372014000100001>

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; DOULBEAU, S.;

YAKANDAWALA, D. M.; WEERAKOON, L. K. Unfertilized ovary: a novel

explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell**

**Reports**, v. 26, p. 21-28, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0216-4>

PERERA, P. I. P.; YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.;

WEERAKOON, L. K. Effect of growth regulators on microspore embryogenesis

in coconut anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 2, p. 171-

180, 2009a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9473-y>

PERERA, P. I. P.; VIDHANAARACHCHI, R. M.; GUNATHILAKE, T. R.;

YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; WEERAKOON, L. K.

Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.).

**Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 1, p. 73-81, 2009b. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s11240-009-9577-z>

PIMENTA, R. S.; LUZ, P. B.; PIVETTA, K. F. L.; CASTRO, A.; PIZETTA, P. U.

C. Efeito da maturação e temperatura na germinação de sementes de *Phoenix*

*canariensis* hort. ex Chabaud – Arecaceae. **Revista Árvore**, v. 34, n. 1, p. 31-

38, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622010000100004>

QUEIROZ, M. H.; CAVALCANTE, M. D. T. H. Efeito do dessecamento das

sementes de palmito na germinação e no armazenamento. **Revista**

**Brasileira de Sementes**, v. 8, n. 3, p.121-125, 1986.

RABECHAU, H.; AHÉE, J.; GUENIN, G. Colonies cellulaires et formes

embryoides obtenuas *in vitro* a partir de culturas d'embryons de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.). **Academy of Sciences**, v. 270, n. 25, p. 3067-3070, 1970.

RADOSEVICH, S. R.; BAYER, D. E. Effect of temperature and photoperiod on triclopyr, picloram and 2,4,5-T translocation. **Weed Science**, n. 27, p. 22-27, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043174500043411>

REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 6, p. 589-602, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9722-9>

REIS, M.S.; REIS, A.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P.; FANTINI, A. C.; ENDER, M.; BASSANI, A. Incremento corrente anual do Palmeiteiro (*Euterpe edulis* Martius) na floresta ombrófila densa. **Ínsula**, v. 19, p. 51-56, 1989.

REYNOLDS, J. F.; MURASHIGE, T. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. **In vitro**, v. 15, n. 5, p. 383-387, 1979. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02616146>

RIBEIRO, M. S.; STEFFENS, C. A.; AMARANTE, C. V. T.; PIKART, T. G.; OLIVEIRA, L. M. Armazenamento de sementes de palmeiteiro sob atmosfera modificada. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 989-994, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052010000400026>

RIBEIRO, T. M.; MARTINS, S. V.; LANA, V. M.; SILVA, K. DE. A. Sobrevivência e crescimento inicial de plântulas de *Euterpe edulis* Mart. transplantadas para clareiras e sub-bosque em uma floresta estacional semidecidual, em Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v. 35, n. 6, p. 1219-1226, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622011000700008>

RIBEIRO, L. M.; GARCIA, Q. S.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Tissue-specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 153, p. 627-642, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppl.12269>

RIBEIRO, L. O.; PEREIRA, R. N. C.; TONON, R. V.; CABRAL, L. M. C.; SANTIAGO, M. C. P. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. C.; MATTA, V. M.; FREITAS, S. P. Antioxidant compounds recovery from juçara residue by thermal assisted extraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 68-73, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0651-0>

ROBERTO, G. G.; HABERMANN, G. Morphological and physiological responses of the recalcitrant *Euterpe edulis* seeds to light, temperature and gibberellins. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 367-378, 2010. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2010.38.2.10>

ROBERTO, G. G.; HABERMANN, G. Water content and GA<sub>3</sub>-induced embryonic cell expansion explain *Euterpe edulis* seed germination, rather than seed reserve mobilization. **Seed Science and Technology**, v. 39, p. 559-571, 2011. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2011.39.3.03>

ROMBERGER, A.; TABOR, C. A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. **American Journal of Botany**, v. 58, n. 2, p. 131-140, 1971. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1971.tb09956.x>

ROSE, R. J.; MANTIRI, F. R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S. K.; WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; SHEAHAN, M. B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: PUA, E. C.; DAVEY, M. R. (eds.). **Plant developmental biology biotechnological perspectives**. Springer-Verlag, Heidelberg, v. 2, p. 3-26, 2010. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_1)

ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 347-352, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.008>

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 228-235, 2006.

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P. *In vitro* germination and embryogenic competence acquisition of *Euterpe edulis* Martius immature zygotic embryos. **Crop Breed Appl Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 171-178, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-70332012000300002>

SALOMÃO, A. N.; LOPES, A. O.; LOPES, G. O.; SCARIOT, A. Comportamento germinativo de sementes de *Euterpe edulis* Mart. Procedentes de mata de galeria. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 51, p. 51-67, 2009.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, n. 2, p. 301-308, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcl104>

SANTAMARINA, A. B.; JAMAR, G.; MENNITTI, L. V.; CESAR, H. DE C.; VASCONCELOS, J. R.; OYAMA, L. M.; ROSSO, V. V. DE; PISANI, L. P. Obesity-related inflammatory modulation by juçara berry (*Euterpe edulis* Mart.) supplementation in Brazilian adults: a double-blind randomized controlled trial. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 318, p. 1-13, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02024-2>

SANTOS, K. G. B.; MUNDSTOCK, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 12, p. 859-864,

1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002990050334>

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, J. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 3, p. 501-508, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0115-z>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; NEHRING, P.; GOIS, J. S. DE; ALMEIDA, T. S. DE; 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.006>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

SHARP, W. R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L. S.; MARAFFA, S. B. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v. 2, n. 5, p. 268-310, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118060759.ch6>

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/pp1.13026>

SILVA, R. DE C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n. 1, p. 59-67, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0170-5>

SILVA, J. Z.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de frutos em *Euterpe edulis* (Martius). **Ciência Florestal**, v. 28, p. 295-309, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509831655>

SILVA, P. P. M.; CARMO, L. F.; SILVA, G. M.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; CASEMIRO, R. C.; SPOTO, M. H. F. Composition of juçara pulp. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 7-13, 2013.

SILVA, R. DE C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n. 1, p. 59-67, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0170-5>

SILVA, R. DE C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Growth Regulation**, v. 72, n. 1, p. 67-80, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9837-0>



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. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.42461>

SORIANO, D.; HUANTE, P.; GAMBOA-DEBUEN, A.; OROZCO-SEGOVI, A. Effects of burial and storage on germination and seed reserves of 18 tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. **Oecologia**, v. 174, p. 33-44, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2753-1>

SOUZA, A. C.; PREVEDELLO, J. A. The importance of protected areas for overexploited plants: Evidence from a biodiversity hotspot. **Biological Conservation**, v. 243, p. 108482, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108482>

SPITELLER, G. The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death. **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 1, p. 5-18, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00097.x>

STARITSKY, G. Tissue culture of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) as a tool for vegetative propagation. **Euphytica**, v. 19, n. 3, p. 288-292, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01904205>

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 15-22, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9207-6>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. **Fisiologia vegetal**, v. 3, p. 309-344, 2004.

THOMPSON, D. S. Space and time in the plant cell wall: relationships between cell type, cell wall rheology and cell function. **Annals of Botany**, v. 101, n. 2, p. 203-211, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcm138>

TREVISAN, A. C. D.; FANTINI, A. C.; SCHMITT-FILHO, A. L.; FARLEY, J. Market for Amazonian açai (*Euterpe oleraceae*) Stimulates Pulp Production from Atlantic Forest juçara Berries (*Euterpe edulis*). **Agroecology and Sustainable Food Systems**, v. 39, n. 7, p. 762-781, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/21683565.2015.1025461>

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* HBK). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, n. 2, p. 149-156, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00035913>

VENTURI, S.; PAULILO, M. T. S. Esgotamento das reservas na semente de *Euterpe edulis* Mart. e efeito da nutrição mineral das plântulas. **Acta Botanica Brasilica**, v.12, n. 3, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33061998000300003>

VIEIRA, G. S.; CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A.; HUBINGER, M. D. Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 2, p. 196-204, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.030>

VIÑAS, M.; JIMÉNEZ, V. M. Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 2, p. 229, 2011.

WETHERELL, D. F. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 3, n. 3, p. 221-227, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00040341>

ZAMBRANA, N. Y. P.; BYG, A.; SVENNING, J. C.; MORAES, M.; GRANDEZ, C.; BALSLEV, H. Diversity of palm uses in the western Amazon. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 10, p. 2771- 2787, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9218-y>

ZELENA, E. The effect of light on metabolism of IAA in maize seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 1, p. 23-29, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1006307519028>

ZHAO, P.; WANG, L.; CHEN, L.; PAN, C. Residue dynamics of clopyralid and picloram in rape plant rapeseed and field soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p. 78-82, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0184-9>

ZHAO, M.; ZHANG, H.; YAN, H.; QIU, L.; BASKIN, C. C. Mobilization and role of starch, protein, and fat reserves during seed germination of six wild grassland species. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00234>

## CAPÍTULO I

### **Seleção de genótipos superiores e qualidade física e fisiológica de sementes de *Euterpe edulis* Martius**

**Resumo:** A exploração predatória da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) para a extração do palmito inseriu a mesma à lista de espécies ameaçadas de extinção, o que diminuiu o banco de sementes da espécie com prejuízos ecológicos incalculáveis. Objetivou-se com este trabalho analisar genótipos de *E. edulis* de dois locais em diferentes altitudes, e selecionar os melhores indivíduos quanto a qualidade de polpa, e qualidade física e fisiológica de sementes na formação de plântulas. O delineamento experimental utilizado, na avaliação dos locais foi o inteiramente casualizado, na qual os tratamentos foram 10 genótipos em Lagoa Seca, Alegre-ES e 10 genótipos em Pedra Menina, Dores do Rio Preto-ES/ Espera Feliz-MG, com quatro repetições de 25 sementes cada. As plantas matrizes foram georeferenciadas e analisadas quanto a: morfologia, produção, análises físicas e químicas dos frutos, qualidade fisiológica das sementes, e qualidade das plântulas. Os genótipos localizados na região de Lagoa Seca estavam em uma altitude variando de 704,3-742,7 m, e os genótipos de Pedra Menina estavam em uma altitude variando de 916-1210 m. Quanto ao rendimento de polpa houve maior aproveitamento para os frutos de Lagoa Seca, comparado aos de Pedra Menina, no entanto, as matrizes de Pedra Menina apresentaram uma diferença de 146% nos teores antocianínicos em relação aos de Lagoa Seca. O G7 de Pedra Menina obteve média de emergência (96,0%) também superior à média máxima encontrada entre os genótipos de Lagoa Seca (94%). O mesmo ocorreu para IVE e TME, em que Pedra Menina destacou-se sobre Lagoa Seca, alcançando IVE máximo de 0,3991 e TME mínimo de 54,5 dias no G10. Os genótipos avaliados de Pedra Menina foram consideravelmente superiores aos de Lagoa Seca para parâmetros relevantes ao consumo dos frutos e vigor de sementes de *E. edulis*.

**Palavras-chave:** juçara, diversidade, antioxidante, flavonoides, antocianinas, rendimento de polpa, vigor de sementes.

**Abstract:** The predatory exploitation of the juçara palm (*Euterpe edulis* Martius) for the extraction of palm hearts has placed it on the list of endangered species, which reduces the seed bank of the species with incalculable ecological damage. The objective of this work was to analyze different genotypes of *E. edulis* from two locations in the state of Espírito Santo/Minas Gerais at different altitudes, and to select the best individuals regarding pulp quality, physical and physiological of seeds for seedling formation. The experimental design used in the evaluation of the sites was completely randomized, in which the treatments were 10 genotypes in Lagoa Seca, Alegre-ES and 10 genotypes in Pedra Menina, Dores do Rio Preto-ES/Espera Feliz-MG, with four replications of 25 seeds each. The mother plants were georeferenced and analyzed in terms of: morphology, production, physical and chemical analysis of the fruits, physiological quality of the seeds, and quality of the seedlings. The genotypes located in the Lagoa Seca region were at an altitude ranging from 704.3-742.7 m, and the Pedra Menina genotypes were at an altitude ranging from 916-1210 m. As for the pulp yield, there was greater use for the fruits of Lagoa Seca, compared to those of Pedra Menina, however, the matrices from Pedra Menina showed a difference of 146% in anthocyanin levels in relation to those from Lagoa Seca. The G7 of Pedra Menina obtained a mean of emergence (96.0%) also higher than the maximum mean found among the genotypes of Lagoa Seca (94%). The same occurred for ESI and AET, in which Pedra Menina stood out over Lagoa Seca, reaching maximum ESI of 0.3991 and minimum AET of 54.5 days in G10. The evaluated genotypes of Pedra Menina were considerably superior to those of Lagoa Seca for parameters relevant to fruit consumption and seed vigor of *E. edulis*.

**Keywords:** juçara, diversity, antioxidant, flavonoids, anthocyanins, pulp yield, seed vigor.

## 1 INTRODUÇÃO

A palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) é uma espécie nativa da Floresta Atlântica, que apesar de enfrentar riscos elevados de extinção na natureza (MMA, 2017), continua sendo muito utilizada para a extração do palmito e na produção do açaí. Trata-se de uma palmeira de estirpe única, reta e fina, podendo chegar até 20 ou 25 m de altura.

A espécie encontra-se na categoria vulnerável na Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008, 2014). No entanto, estudos apontam que *E. edulis* é muito mais vulnerável à extinção do que atualmente é classificado (SOUZA; PREVEDELLO, 2020; LEAL et al., 2021). A perda contínua de Floresta Atlântica é a principal força motriz dos padrões de ocorrência e declínio da abundância de *E. edulis*, além da superexploração de adultos para obtenção do palmito nesses fragmentos florestais, principalmente quando não protegidos (LEAL et al., 2021).

O processo de extração do palmito acarreta a morte da planta, devido ao não perfilhamento, limitando a propagação da espécie a ocorrer única e exclusivamente por meio de sementes, com a necessidade de outros indivíduos para que ocorra a fecundação cruzada (DORNELES et al., 2013). Além disso, as mudanças anuais na produção de sementes, a baixa emergência de novos indivíduos e a alta mortalidade das mudas nos primeiros anos de vida, interfere diretamente na densidade populacional e na viabilidade dessas populações (FANTINI; GURIES, 2007; LEAL et al., 2021).

A espécie produz frutos com cores vivas e intensas com grande importância ecológica e econômica, desempenhando papel em vários mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes; e como alimento para a fauna (LOPES et al., 2007). E, a polpa dos frutos de juçara é utilizada para formulação do açaí, e considerado como “super alimento” devido à atividade antioxidante excepcionalmente alta, com elevada concentração de compostos bioativos (fenólicos e flavonoides), principalmente antocianinas, sendo as mais abundantes a cianidina-3-glicosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo (TEIXEIRA et al., 2008; LIMA et al., 2012; SCHULZ et al., 2016; 2021a).

O potencial antioxidante de *E. edulis* é demonstrado em modelos

celulares e, na maioria dos estudos *in vivo*, observou uma diminuição nos marcadores de peroxidação lipídica e atividade antioxidante enzimática, com a ingestão da polpa do fruto (SCHULZ et al., 2021a). Estudos realizados para avaliar a capacidade antioxidante das antocianinas encontraram efeitos positivos e significantes para promover a vasodilatação, na prevenção da hiperglicemia, estimular a secreção de insulina, diminuir o risco de doenças cardiovasculares (PATRAS et al., 2010), melhorar a adaptação da visão noturna e prevenir a fadiga visual (LIMA et al., 2006). Além de efeitos promissores na inibição da proliferação de células humanas cancerígenas, originadas em diferentes partes do corpo, como estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central (PATRAS et al., 2010), e efeito anti-inflamatório (SILVA et al., 2021).

No entanto, há uma grande variação da concentração desses antioxidantes na polpa dos frutos, a hipótese é que essa variação pode depender de fatores como o genótipo e ambiental da sua localização. Portanto, há a necessidade de estudos quanto a seleção de indivíduos vigorosos, altamente produtivos, com qualidades física do fruto e química da polpa superiores, para alimentação humana, e quanto a composição e qualidade fisiológicas na maturação das sementes e formação de plântulas, já que o método seminífero, é a única forma de propagar a espécie. Assim, objetivou-se com este trabalho analisar genótipos de *E. edulis* de dois locais em diferentes altitudes, e selecionar os melhores indivíduos quanto a qualidade de polpa, e qualidade física e fisiológica de sementes na formação de plântulas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Áreas

Os genótipos de *Euterpe edulis* foram selecionados em duas áreas diferentes, uma localizada no distrito de Lagoa Seca, município de Alegre-ES e a outra no distrito de Pedra Menina, nos municípios de Dores do Rio Preto-ES, e Espera Feliz-MG, próximo ao Parque Nacional do Caparaó. Em cada área foram analisados 10 genótipos quanto ao: diâmetro a altura do peito (DAP = 1,3 m); altura de plantas matrizes (m); e peso do cacho (kg).

## 2.2. Análises físicas e químicas de frutos

Os frutos de *E. edulis* foram analisados quanto ao: diâmetro longitudinal e transversal do fruto (mm); massa de 200 sementes (g), rendimento de polpa (%); determinação do brilho ( $L^*$ ), relação vermelho/verde ( $a^*$ ), relação amarelo/azul ( $b^*$ ), cromaticidade ( $C^*$ ), e ângulo e tonalidade ( $H^*$ ), com auxílio de um colorímetro; sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix, SS); acidez titulável (% ácido cítrico, AT); RATIO (SS/AT); antocianina ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); flavonoides ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ); e fenóis ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ).

Os sólidos solúveis (SS) foram determinados por meio de leituras em um refratômetro analógico manual com resultados expressos em  $^{\circ}$ Brix, seguindo o método n $^{\circ}$  932.12 da AOAC (HORWITZ, 2005). O valor do  $^{\circ}$ Brix foi obtido assumindo-se a seguinte equação:  $\%SS = [(M(\text{amostra}) + M(\text{água}))/M(\text{amostra})] \cdot Li$ , em que M (amostra) = massa de amostra utilizada (g); M (água) = massa de água utilizada na diluição (g); e Li = valor encontrado na leitura do refratômetro (%).

A acidez titulável foi calculada e expressa em % ácido cítrico, seguindo o método n $^{\circ}$  942.15 da AOAC (HORWITZ, 2005), através da seguinte equação:  $AT (\% \text{ ácido cítrico}) = [ ] \cdot V \cdot f \cdot 6.4 / M (\text{amostra})$ , em que: [ ] = concentração molar de NaOH; V = volume de NaOH usado na titulometria (mL); f = fator de correção obtido para padronização do NaOH; e M (amostra) = massa de amostra utilizada (g).

Para a determinação de antocianinas e flavonoides, utilizou-se a metodologia proposta por Lees e Francis (1972) e Francis (1982), pesando-se 0,150 g de amostra em tubos de ensaio, seguido pela adição de 4 mL da solução extratora etanol 96% em HCl  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  (85:15). As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 24 horas em uma câmara escura, com posterior filtragem, e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda 535 nm para antocianina, e 374 nm para flavonoides. Para a quantificação da antocianina, utilizou-se a equação  $ANT (\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}) = \text{absorbância} \times \text{fator de diluição}/98,2$ . E para a quantificação do teor de flavonoides, utilizou-se a equação  $FLAV (\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}) = \text{absorbância} \times \text{fator de diluição}/76,6$ .

Para a determinação do teor de fenóis totais foi adaptado o método

espectrofotômetro de Folin Ciocalteau (SINGLETON et al., 1999), pesando-se 0,25 g de cada amostra em tubos de ensaio, seguindo pela adição de 5 mL de solução extratora de ácido clorídrico (HCl) 2 N. As amostras foram então, levadas para banho Maria a 95 °C 30 min<sup>-1</sup>. Após o resfriamento, as amostras foram filtradas em filtro e deste filtrado foi pipetado em tubos de ensaio 50 µL do extrato e adicionado 2,5 mL de Folin-Ciocalteu 1:10 (v v<sup>-1</sup>). Após 5 min adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 4% (m v<sup>-1</sup>), mantendo as soluções em repouso no escuro por 2 horas. O conteúdo de fenóis totais foi quantificado no comprimento de onda 760 nm, em triplicata, e a curva de calibração utilizada foi  $\hat{Y} = 0,0419+0,7697X$  (R= 0,99), sendo o conteúdo expresso em mg 100 g<sup>-1</sup>.

### **2.3. Qualidade fisiológica das sementes**

As sementes dos genótipos das duas áreas foram analisadas a umidade (%), emergência (%), índice de velocidade de emergência (IVE), tempo médio de emergência (TME - dias), altura de plântulas (cm), comprimento de raiz (cm), massas seca de parte aérea e raiz das plântulas (MSPA e MSR - g).

O teor de água das sementes (umidade), foi determinado pelo método de estufa (Adamo<sup>®</sup>) regulada a 105 ± 3 °C, por 24 horas, com quatro repetições de 25 sementes, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Para a análise de emergência (BRASIL, 2009), IVE (MAGUIRE, 1962) e TME (LABOURIAU, 1983), as sementes foram colocadas para germinar em substrato vermiculita e umedecida com água destilada. E mantidas em incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) regulada na temperatura de 20-30 °C. Aos 150 dias foram analisados a altura de plântulas, comprimento da raiz, MSPA e MSR.

### **2.4. Análise estatística**

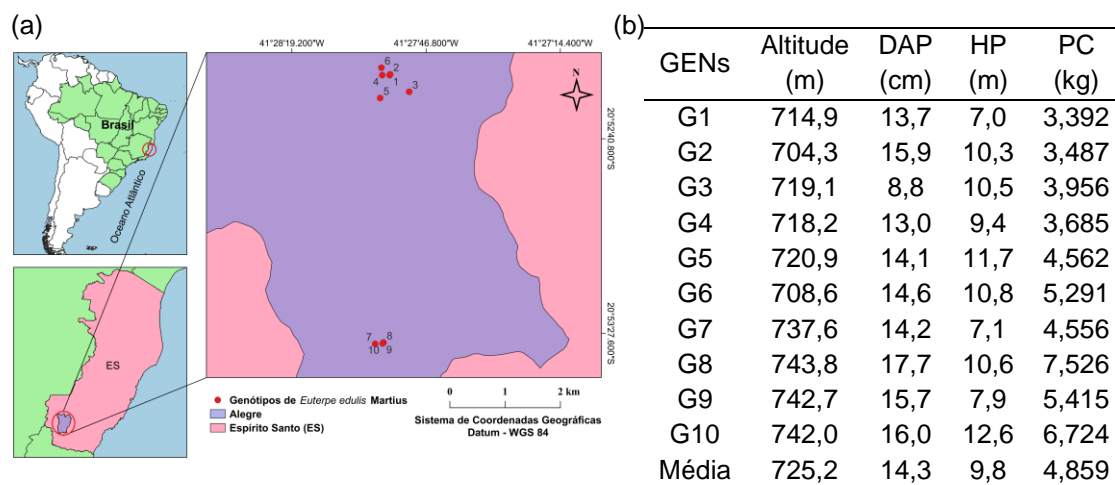
Os dados foram submetidos à análise de variância e teste F (p<0,05), e as médias dos genótipos agrupados pelo teste de Scott-Knott (p<0,05), com o auxílio do software Genes (CRUZ, 2016). Empregou-se a distância generalizada de Mahalanobis como medida de dissimilaridade; a contribuição relativa dos



caracteres físico-químicos para a divergência genética pelo método de Singh (1981); e a correlação fenotípica dessas características.

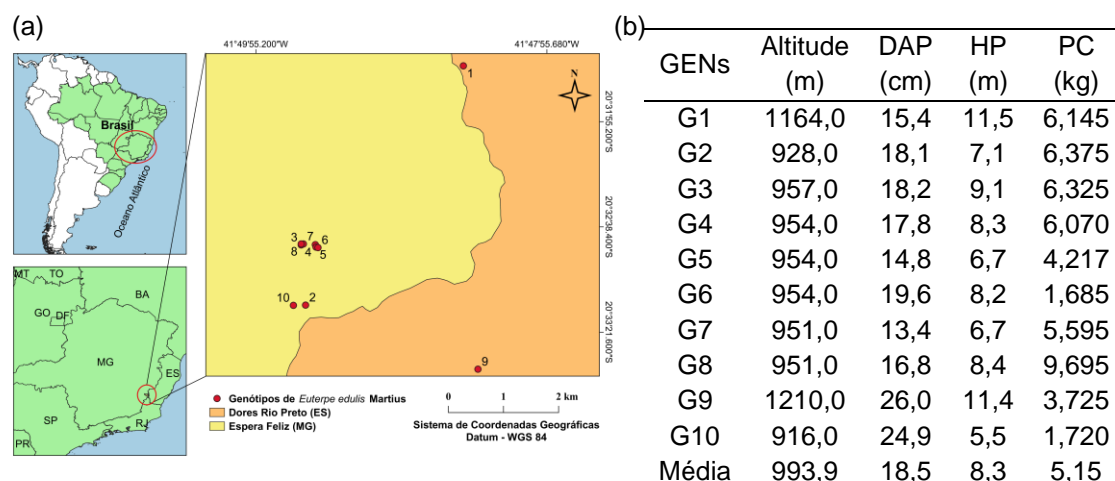
### 3 RESULTADOS

Os genótipos localizados na região de Lagoa Seca (Figura 1a) estavam em uma altitude variando de 704,3-742,7 m, com DAP de 8,8-17,7 cm e altura de plantas (HP) de 7,0-12,6 m (Figura 1b). Os GENs 8, 10, 9 e 6 destacaram-se dos demais quanto ao maior peso de cacho (PC) de 7,526; 6,724; 5,415; e 5,291 kg, respectivamente (Figura 1b).



**Figura 1.** Coordenadas (a) e características dos genótipos (GENs) (b) de *E. edulis* localizados em Lagoa Seca. DAP. diâmetro a altura do peito (1,30 m), HP. altura da planta, e PC. peso do cacho.

Já os genótipos localizados na região de Pedra Menina (Figura 2a) estavam em uma altitude variando de 916-1210 m, com DAP de 13,4-26,0 cm e altura de plantas (HP) de 5,5-11,56 m (Figura 2b). O G8 destacou-se dos demais genótipos quanto ao maior peso de cacho (PC) de 9,695 kg (Figura 2b)



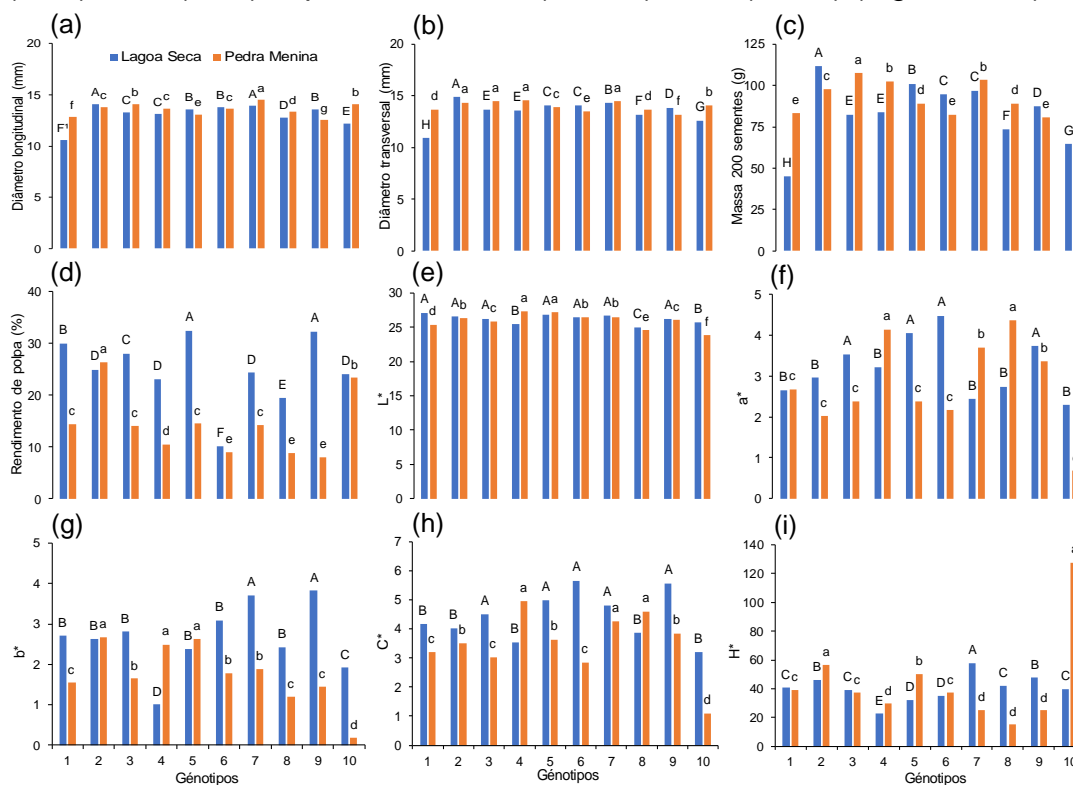
**Figura 2.** Coordenadas (a) e características dos genótipos (GENs) (b) de *E. edulis* localizados em Pedra Menina. DAP. diâmetro a altura do peito (1,30 m), HP. altura da planta, e PC. peso do cacho.

Para os genótipos de Lagoa Seca, as maiores médias de diâmetro longitudinal dos frutos foram nos G2 (14,07 mm) e G7 (13,94 mm), os quais não diferiram estatisticamente entre si (Figura 3a). Já o diâmetro transversal e a massa de 200 sementes, o G2 possui média superior aos demais genótipos (14,86 mm e 111,47 g, respectivamente) (Figuras 3b, c). Enquanto o rendimento de polpa obteve médias maiores para o G5 e G9 (32,49 e 32,25%, respectivamente) (Figura 3d).

Na colorimetria dos frutos de Lagoa Seca, as maiores médias de brilho ( $L^*$ ) foram encontrados nos GENs 1, 5, 7, 2, 6, 3 e 9 (27,14; 26,83; 26,72; 26,62; 26,50; 26,28 e 26,23, respectivamente), os quais não diferiram estatisticamente entre si. Para a relação vermelho/verde ( $a^*$ ) as maiores médias foram encontrados para os GENs 6, 5, 9 e 3 (4,48; 4,05; 3,74 e 3,53, respectivamente), e para a relação amarelo/azul ( $b^*$ ) foram obtidos no G9 (3,85) e G7 (3,70). Já a cromaticidade ( $C^*$ ), as maiores médias foram obtidos nos GENs 6, 9, 5, 7 e 3 (5,64, 5,55, 4,97, 4,80 e 4,51, respectivamente), e o ângulo de tonalidade ( $H^*$ ) no G7 (58,03) (Figuras 3e-i).

Nos genótipos de Pedra Menina, a maior média de diâmetro longitudinal dos frutos foi no G7 (14,52 mm), e para o diâmetro transversal no G4 (14,52 mm), 7 (14,46 mm), G3 (14,45 mm) e G2 (14,33 mm) (Figuras 3a, b). Já a massa de 200 sementes, o G3 apresentou média superior aos demais genótipos

(107,48 g), e o G2 o maior rendimento de polpa (26,41 %) (Figuras 3c, d). Para os parâmetros de colorimetria, as maiores médias obtidas para  $L^*$  foram encontrados nos G4 (27,29) e G5 (27,18), para o parâmetro  $a^*$ , no G8 (4,37) e 4 (4,13), para  $b^*$  no G2 (2,67), G5 (2,62) e G4 (2,49), para  $C^*$  no G4 (4,94), G8 (4,54) e G7 (4,24), e para  $H^*$  no G10 (162,61) e G2 (56,48) (Figuras 3e-i).

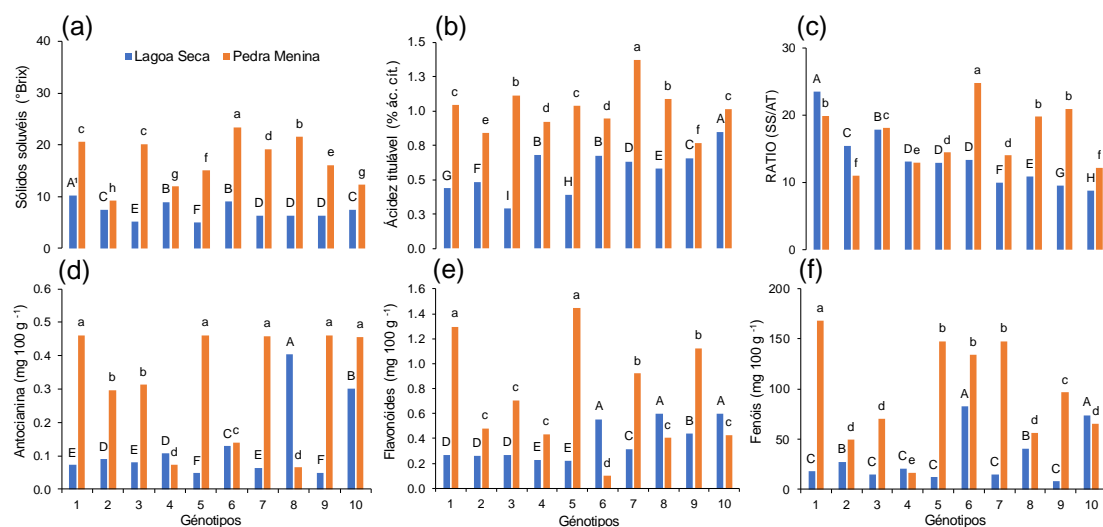


**Figura 3.** Diâmetro longitudinal - mm (a), diâmetro transversal - mm (b), massa de 200 sementes - g (c), rendimento de polpa - % (d),  $L^*$  (e),  $a^*$  (f),  $b^*$  (g),  $C^*$  (h),  $H^*$  (i) de sementes de genótipos de *E. edulis*. <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra (maiúscula - Lagoa Seca, minúscula - Pedra Menina) diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Nas análises químicas dos frutos de Lagoa Seca, as maiores médias encontradas de sólidos solúveis foram no G1 (10,24 °Brix), de acidez titulável no G10 (0,845% ácido cítrico), da relação RATIO no G1 (23,51 SST/ATT), de antocianina no G8 (0,403 mg 100 g<sup>-1</sup>), flavonoide no G8 (0,598 mg 100 g<sup>-1</sup>), G10 (0,596 mg 100 g<sup>-1</sup>), e G6 (0,555 mg 100 g<sup>-1</sup>), e fenóis no G6 (83,60 mg 100 g<sup>-1</sup>) e G10 (74,00 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Figuras 4a-f).

Nos frutos de Pedra Menina as maiores médias encontradas de SS foram no G6 (23,36 ° Brix), de AT no G7 (1,37% ácido cítrico), para relação RATIO no G6 (24,78 SST/ATT), antocianina no G1, G5, G9 com 0,461 mg 100 g<sup>-1</sup>, G7 com 0,459 mg 100 g<sup>-1</sup>, e G10 com 0,455 mg 100 g<sup>-1</sup>, flavonoides no G5 (1,449 mg

100 g<sup>-1</sup>) e G1 (1,298 mg 100 g<sup>-1</sup>), e fenóis no G1 (168,04 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Figuras 4a-f).

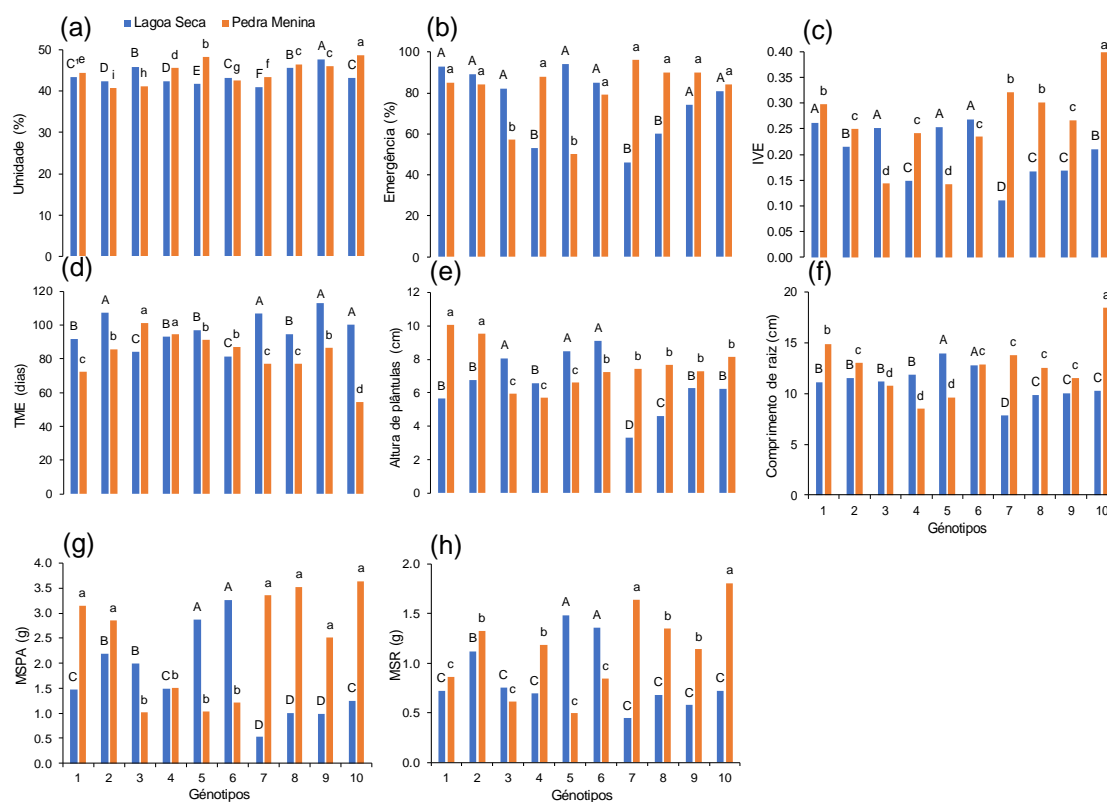


**Figura 4.** Sólidos solúveis - °Brix (a), acidez titulável - % ácido cítrico (b), RATIO - SS/AT (c), antocianina - mg 100 g<sup>-1</sup> (d), flavonoides - mg 100 g<sup>-1</sup> (e), e fenóis - mg 100 g<sup>-1</sup> (f) de sementes de genótipos de *E. edulis*. <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra (maiúscula - Lagoa Seca, minúscula - Pedra Menina) diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Quanto a análise fisiológica das sementes de Lagoa Seca, a média de umidade das sementes variou de 47,72-40,93%, sendo a maior no G9 e a menor no G7 (Figura 5a). A maior média de emergência ocorreu nos GENs 5, 1, 2, 6, 3, 10 e 9 (94, 93, 89, 85, 82, 81, 74%, respectivamente), entre os quais não houve diferença significativa estatisticamente (Figura 5b). O maior IVE foram nos GENs 6, 1, 5 e 3 (0,2681; 0,2623; 0,2524; e 0,2518) e os menores TME no G3 (84,4 dias) e G6 (81,5 dias) (Figuras 5c, d). As maiores médias de altura de plântulas foram no G6, G5 e G3 (9,09, 8,48 e 8,06 cm, respectivamente), de comprimento de raiz no G5 e G6 (13,93 e 12,78 cm, respectivamente), MSPA no G6 e G5 (3,27 e 2,87 g, respectivamente), e de MSR no G5 e G6 (1,480 e 1,357 g, respectivamente) (Figuras 5e-h).

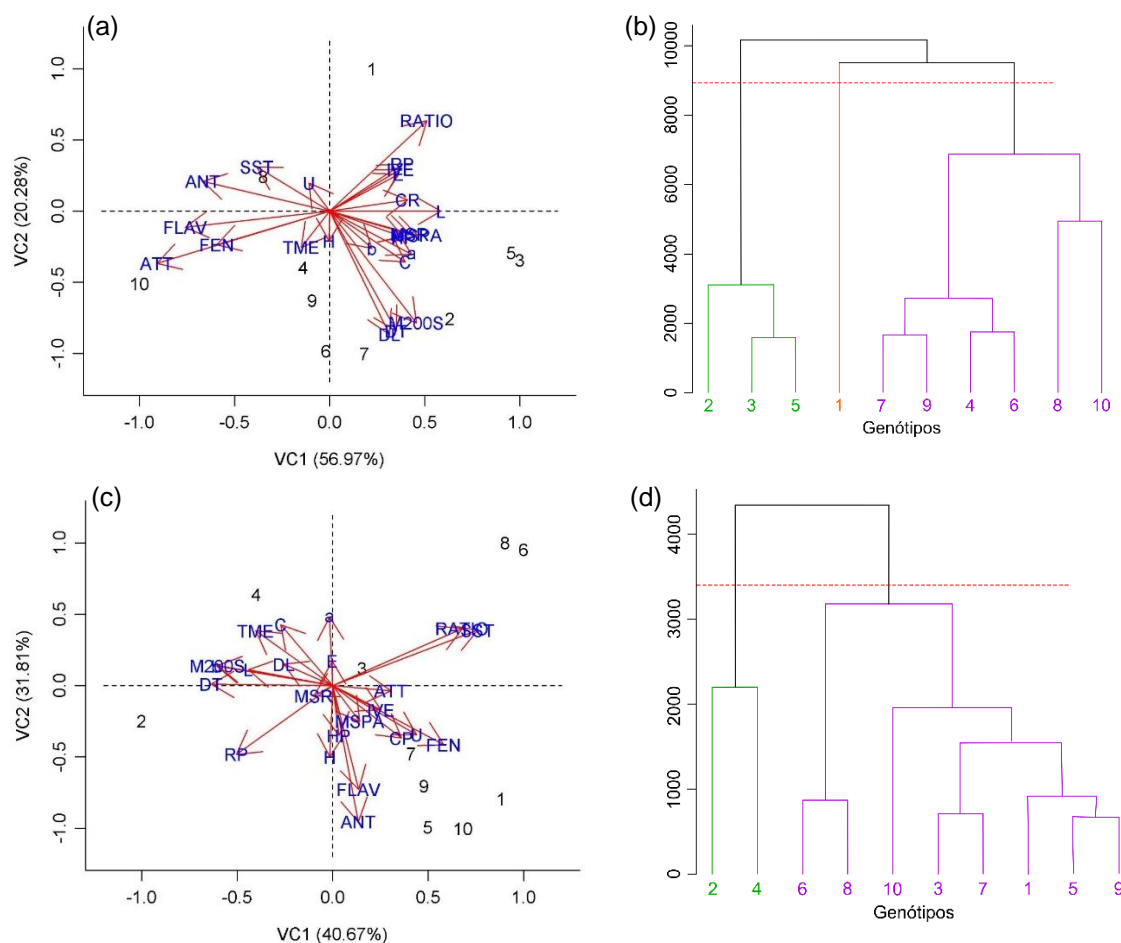
Nas sementes de Pedra Menina, a umidade variou de 48,77-40,65% (G10 e G2) (Figura 5a). A maior média de emergência ocorreu no G7 (96,0 %), G8 e G9 (90,0%), G4 (88,0 %), G1 (85,0 %), G2 e G10 (84,0 %) e G6 (79,0 %), entre os quais não houve diferença significativa estatisticamente (Figura 5b). O maior IVE (0,3991) e o menor TME (54,50 dias) ocorreu no G10 (Figuras 5c, d). As maiores médias de altura de plântulas foram no G1 e G2 (10,08 e 9,52 cm,

respectivamente), de comprimento de raiz no G10 (18,50 cm), MSPA nos GENs 10, 8, 7, 1, 2 e 9 (3,64, 3,52, 3,35, 3,15, 2,85, 2,51, respectivamente), e MSR no G10 e G7 (1,80 e 1,63 g, respectivamente) (Figuras 5e-h).



**Figura 5.** Umidade - % (a), emergência - % (b), índice de velocidade de emergência - IVE (c), tempo médio de emergência - TME, dias (d), altura de plântulas - cm (e), comprimento de raiz - cm (f), massa seca de parte aérea - MSPA, g (g), e massa seca de raiz – MSR, g (h) de sementes de genótipos de *E. edulis*. <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra (maiúscula - Lagoa Seca, minúscula - Pedra Menina) diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

As variáveis canônicas explicam cerca de 77% da variabilidade dos genótipos de Lagoa Seca e 72% de Pedra Menina (Figura 6a, c). Para os genótipos de Lagoa Seca foi gerado três grupos: i) GENs 2, 3 e 5; ii) G1; e iii) GENs 7, 9, 4, 6, 8 e 10 (Figura 6b); com uma estimativa de correlação cofenética de 0,59. O agrupamento gerado para os genótipos de Pedra Menina dividiu-se em 2 grupos: i) G2 e G4; e ii) GENs 6, 8, 10, 3, 7, 1, 5, e 9 (Figura 6d); com uma estimativa de correlação cofenética de 0,78.



**Figura 6.** Variáveis canônicas e dendrograma dos genótipos de *E. edulis* de Lagoa Seca (a, b) e Pedra Menina (c, d) ( $p < 0,001$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

A médias encontradas para os diâmetros longitudinais e transversal influenciaram diretamente no resultado do parâmetro massa de 200 sementes, em que um dos genótipos com maiores diâmetros também apresentou maior massa de sementes (G2 - Lagoa Seca, e G3 - Pedra Menina), enquanto o genótipo com menores diâmetros (G1 - Lagoa Seca, e G9 - Pedra Menina) resultou na menor massa de sementes.

Quanto ao rendimento de polpa houve maior aproveitamento para os frutos de Lagoa Seca, pois os genótipos com maior rendimento para a localidade alcançaram os valores de 32,49 e 32,25% (G5 e G9, respectivamente), enquanto o genótipo com maior rendimento para Pedra Menina chegou a apenas 26,41% (G2). O rendimento máximo de polpa dos frutos de Lagoa Seca assemelha-se aos valores encontrados por Borges (2013), os quais variaram de 25,67 a

36,69%.

Os resultados encontrados para os parâmetros de colorimetria ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $H^*$ ) dos frutos de Lagoa Seca indicaram que todos os genótipos estavam em estágio de maturação, sendo o G8 um dos mais escuros. Nos frutos de Pedra Menina os parâmetros indicaram o grau de maturação em todos os genótipos, no entanto, em estágio de maturação mais avançado em relação aos genótipos de Lagoa Seca.

A maior média de SS (10,24° Brix) para o G1 de Lagoa Seca provavelmente associa-se ao grau de maturação do mesmo, pois durante a fase de maturação dos frutos ocorre aumento no teor de açúcares, apresentando menor valor de AT (0,44% ácido cítrico), gerando uma relação SS/AT (RATIO) de 23,51. As médias de SS, AT também foram superiores para os genótipos de Pedra Menina em relação à Lagoa Seca, alcançando valor máximo de 23,36 °Brix (G6) e 1,37% ácido cítrico (G7). Durante o amadurecimento dos frutos ocorrem diversas reações metabólicas que resultam, principalmente, em alterações na composição química e nas propriedades sensoriais. Geralmente os frutos são mais doces e menos ácidos ao final do processo de amadurecimento, no entanto, em frutos de *E. edulis* ocorre o aumento da acidez nos estádios de maturação mais tardios, enquanto o teor de açúcares diminui (SCHULZ et al., 2021b).

As matrizes de Pedra Menina apresentaram teores antociânicos mais elevados que em Lagoa Seca, diferença de 146%. Frutos de *E. edulis* apresentam alta capacidade antioxidante e que pode variar em cada genótipo, como exemplo, Barroso et al. (2018) encontraram dois genótipos (J2, J5) que apresentaram maiores teores de antocianinas. A antocianina dominante em polpa de frutos de *E. edulis* é a cianidina-3-O-rutinosídeo, representando cerca de 73% do teor total de compostos fenólicos, além de cianidina-3-glucosídeo e perlagonidina-3-glucosídeo (VIEIRA et al., 2017). Já Barroso et al. (2018) identificaram na polpa de frutos de *E. edulis*, além da cianidina-3-rutinosídeo, a antocianina malvidina-glicosídeo.

No presente trabalho, em 80% dos genótipos verificou-se superioridade no conteúdo fenólico da polpa dos frutos de Pedra Menina em relação a de Lagoa Seca. Estes resultados podem estar relacionados aos materiais genéticos

e a condições edafoclimática, a considerar que, os superiores (GENs 1; 5; 9; 7; e 10) pertenceram ao mesmo grupo genético (Figuras 4 e 6), e a altitude que Pedra Menina está (916-1210 m), diferencia-se em média de 268 m de Lagoa Seca (704-743 m). Barroso et al. (2018) identificaram altos teores de polifenóis nos frutos dos genótipos J1 e J4. E Schulz et al. (2016) informaram que a polpa de *E. edulis* apresenta praticamente o dobro de fenóis que a de *E. oleraceae*.

Quanto a umidade da semente, o G9 apresenta maior porcentagem entre os genótipos de Lagoa Seca (47,72%), e o G10 entre os de Pedra Menina (48,77%). Tais médias, superiores ao encontrado por Negreiros e Perez (2004), que constataram que sementes viáveis de *E. edulis* recém-coletadas possuíam 37% de umidade.

O G7 de Pedra Menina obteve média de emergência (96,0%) também superior à média máxima encontrada entre os genótipos de Lagoa Seca (94%). O mesmo ocorreu para IVE e TME, em que Pedra Menina destacou-se sobre Lagoa Seca, alcançando IVE máximo de 0,3991 e TME mínimo de 54,5 dias no G10. Juntos, estas três variáveis indicam um vigor consideravelmente maior para os genótipos de Pedra Menina.

As variáveis altura de plântulas e comprimento de raiz relacionaram-se diretamente com massas secas de ambas as partes, visto que, os genótipos com maiores partes aéreas e raízes (G6 e G5 - Lagoa Seca, G1 e G2 - Pedra Menina) também apresentaram maior massa seca.

## 5 CONCLUSÕES

Os genótipos avaliados de Pedra Menina foram consideravelmente superiores aos de Lagoa Seca para parâmetros relevantes ao consumo dos frutos de *E. edulis*, sendo possível a partir destes alcançar o consumo desejável de antioxidantes.

Os genótipos avaliados em Pedra Menina também indicam um vigor de sementes consideravelmente maior, comparado aos de Lagoa Seca, com destaque o G7 e G10.



## 6 REFERÊNCIAS

- BARROSO, M. E. S.; OLIVEIRA, B. G.; PIMENTEL, E. F.; PEREIRA, P. M.; RUAS, F. G.; ANDRADE, T. U.; LENS, 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. 11, p. 985-993, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.036>
- BORGES, G. S. C. **Determinação de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante das diferentes frações dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados no estado de Santa Catarina**. 2013. 165 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- BRASIL. Instrução Normativa Nº 6. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União de 23 de setembro de 2008**, (Seção 1) 185, p.75-83.
- BRASIL. **Portaria MMA Nº 443, de 17 de dezembro de 2014**, seção 1, p. 110-121.
- DORNELES, L. L.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; PADILHA, M. T. S. Biologia da polinização de *Euterpe edulis* Martius (*Arecaceae*) e associação com abelhas sociais (Apidae: Apini) em sistema agroflorestral na Ilha de Santa Catarina. **Iheringia**, v. 68, p. 47-57, 2013.
- FANTINIA, A. C.; GURIES, R. P. Forest structure and productivity of palmeiteiro (*Euterpe edulis* Martius) in the Brazilian Mata Atlântica. **Forest Ecology and Management**, v. 242, n. 2-3, p. 185-194, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.01.005>
- HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2005. 1260 p.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 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, p. 119716, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119716>
- LIMA, V. L. A. G.; PINHEIRO, I. O.; NASCIMENTO, M. S.; GOMES, P. B.; GUERRA, N. B. Identificação de antocianidinas em acerolas do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 927-935, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400033>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200011>

LOPES, T. F.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. Disponível em: <[www.mma.gov.br/biodiversidade/especies-ameacadas-de-extincao.atualizacao-das-listas-de-especies-ameacadas](http://www.mma.gov.br/biodiversidade/especies-ameacadas-de-extincao.atualizacao-das-listas-de-especies-ameacadas)>. Acesso em: 07 de julho de 2017.

NEGREIROS, G. F.; PEREZ, S. C. J. G. A. Resposta fisiológica de sementes de palmeiras ao envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 4, p. 391-396, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000400013>

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 3-11, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

SCHULZ, M.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Antioxidant and juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius): Potential applications in toxicology. *In*: PATEL, V. B.; PREEDY, V. R. **Toxicology**: oxidative stress and dietary antioxidants. London: Academic Press (Elsevier). 2021a. p. 329-336. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819092-0.00032-7>

SCHULZ, M.; BRUGNEROTTO, P.; SERAGLIO, S. K. T.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. S. C.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Aliphatic organic acids and sugars in seven edible ripening stages of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103683, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103683>

SILVA, F. P.; MIRANDA, D. A.; CARNIER, M.; MAZA, P. K.; BOLDARINE, V. T.; SILVA RISCHITELI, A. B.; AVILA, F.; PONTES, L. P. P.; HACHUL, A. C. L.; NETO, N. I. P.; RIBEIRO, E. B.; NASCIMENTO, C. M. O.; ROSSO, V. V.; OYAMA, L. M. Low dose of Juçara pulp (*Euterpe edulis* Mart.) minimizes the colon inflammatory milieu promoted by hypercaloric and hyperlipidic diet in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 77, p. 104343, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104343>

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

SOUZA, A. C.; PREVEDELLO, J. A. The importance of protected areas for overexploited plants: Evidence from a biodiversity hotspot. **Biological Conservation**, v. 243, p. 108482, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108482>

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

VIEIRA, G. S.; MARQUES, A. S. F.; MACHADO, M. T. C.; SILVA, V. M.; HUBINGER, M. D. Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS) in jussara (*Euterpe edulis*) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 2135-2144, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2653-1>

## CAPÍTULO II

### **Reserve mobilization and *in vitro* germination of *Euterpe edulis* (Martius) seeds at different maturation stages<sup>1</sup>**

**Abstract:** *Euterpe edulis* (Arecaceae) is a typical palm of the Atlantic Forest with great ecological and economic value. Its seeds are characterized by hard coats, as well as recalcitrant, slow, and uneven germination, which hinder efficient seedling production. Given its risk of extinction, the objective of this study was to investigate reserve mobilization and how this impacted on the quality of maturing *E. edulis* seeds. Seven maturation stages separated by 20-day intervals, were assessed from 108 to 228 d after anthesis. The morphological characteristics, germination, vigor, and biochemical properties of *in vitro* germinated seeds, as well as the quality of the seedlings from each maturation stage were assessed. Four replications with ten seeds were evaluated at each stage. Over the experimental period, total relative growth rate of the fruits was  $0.0037 \text{ mm day}^{-1}$ , while moisture content decreased from 79.49 to 46.59%. The concentrations of phenols, soluble sugar, proteins, and starch decrease significantly during maturation, while there is an increase in lipids and fibers. Most variables displayed a positive correlation, except moisture, phenols, soluble sugar, proteins, and starch. *E. edulis* seeds possessed sufficient reserves to allow for normally developed embryos 148 days after anthesis, their 100% germination, and formation of 100% normal seedlings.

**Keywords:** Arecaceae, biochemical characterization, juçara, palm tree, propagation.

<sup>1</sup>Publicado na **Trees**, v. 36, p. 415-426, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02216-6>

**Resumo:** *Euterpe edulis* (Arecaceae) é uma palmeira típica da Mata Atlântica com grande valor ecológico e econômico. Suas sementes são caracterizadas por tegumento duro, germinação recalcitrante, lenta e desigual, o que dificulta a produção eficiente de mudas. Dado o risco de extinção, o objetivo deste estudo foi investigar a mobilização de reservas e como isso impacta na qualidade das sementes de *E. edulis* em maturação. Sete estágios de maturação separados por intervalos de 20 dias, foram avaliados de 108 a 228 dias após a antese. Foram avaliadas as características morfológicas, germinação, vigor e propriedades bioquímicas das sementes germinadas *in vitro*, bem como a qualidade das plântulas de cada estágio de maturação. Foram avaliadas quatro repetições com dez sementes em cada estágio. Ao longo do período experimental, a taxa de crescimento relativo total dos frutos foi de 0,0037 mm dia<sup>-1</sup>, enquanto o teor de umidade diminuiu de 79,49 para 46,59%. As concentrações de fenóis, açúcar solúvel, proteínas e amido diminuem significativamente durante a maturação, enquanto há aumento de lipídios e fibras. A maioria das variáveis apresentou correlação positiva, exceto umidade, fenóis, açúcar solúvel, proteínas e amido. As sementes de *E. edulis* possuíam reservas suficientes para permitir a formação de embriões normalmente desenvolvidos 148 dias após a antese, sua germinação de 100% e a formação de plântulas 100% normais.

**Palavras-chave:** Arecaceae, caracterização bioquímica, juçara, palmeira, propagação.

## 1 INTRODUCTION

*Euterpe edulis* (Martius), known as juçara, is a native species from the Atlantic Forest, found mainly in the south and southeast regions of Brazil along the Atlantic coast and down to Argentina (SCHULZ et al., 2016). The main product obtained from this species is the heart of palm, whose widespread consumption adds to the economic importance of this palm tree. Unlike other palms of the same genus, *E. edulis* is renowned for its quality and flavor (BORGES et al., 2013). However, overexploitation, lack of regrowth, and slow growth have led to the inclusion of *E. edulis* in the Brazilian List of Endangered Species (BRASIL 2008; 2014). Illegal extraction of this species is still common throughout the Atlantic Forest, in addition, populations outside protected areas can decrease to extinction 2.4 times faster, compared to populations within protected areas (SOUZA; PREVEDELLO, 2020).

Another by product of this species is its fruit, which weighs about 1 g and acquires a dark purple hue when ripe, resembling those of *Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart. used in the production of açai (SCHULZ et al. 2017). The bioactive composition of juçara fruits has revealed elevated antioxidant content in the pulp (RIBEIRO et al. 2018).

Harvesting and processing of *E. edulis* fruits for the production of pulp has revolutionized the socioeconomic and ecological role of this palm (TREVISAN et al., 2015). As a unique case, this forest species suddenly went from almost extinction to a position of strong potential for sustainable management in forest environments and agroforestry systems, with lasting profits for farmers, in which, the harvesting of fruits maximizes both conservation and financial results (TREVISAN et al., 2015; CHAGAS et al., 2021). Indeed, juçara is now at the heart of one of the most important non-timber forest production chains in the Brazilian and international markets. However, the absence of natural propagation by tillering, whereby shoots are emitted from the base of the plant, in favor of seed-only propagation has limited the generation of seedlings.

A single palm tree is estimated to produce 800 seeds per kilogram of fruits, each fruit has a single seed (CARPINÉ et al., 2019). The seeds consist of a hard almond, with a small embryo and abundant endosperm (PANZA et al., 2004). Despite their large number, the seeds suffer from a rapid reduction in moisture,

with consequent loss of viability, as well as slow and uneven germination and/or emergence (BOVI; CARDOSO, 1975). As a result, germination can take from 60 to 90 days (CURSI; CICERO, 2014).

The growth cycle of a plant begins with the germination of its seeds (DONOHUE et al., 2010; NONOGAKI et al., 2010; LAI et al., 2015). Thus, the type and quantity of primary metabolites transferred from the mother plant have a direct bearing on germination (DONOHUE, 2009; BASKIN; BASKIN, 2014a; LI et al., 2017). Soluble sugar, proteins, and lipids are the most abundant components and also the most critical for development (ALENCAR et al., 2012; ZHAO et al., 2018); hence, their amount strongly influences the speed and success of germination (SORIANO et al., 2014), as well as the quality of seedlings.

Few studies have analyzed the main nutritional reserves of seeds in the genus *Euterpe*, and existing reports are limited to mature seeds of *E. edulis* (PANZA et al., 2004), *E. oleracea* (NASCIMENTO et al., 2020), and *E. precatoria* (FERREIRA et al., 2020). Despite the relevance of the species, little is known about juçara fruits, the only studies were on its pulp (INADA et al. 2015; SCHULZ et al., 2015; 2021). This is the first study to characterize the mobilization of reserves during seed maturation and link it to the physiological quality of seeds and seedlings of *E. edulis*.

The present study is the basis for other works regarding the degree of maturation of *E. edulis* seeds, and even for other palm species, with enzymatic investigations (eg, late embryogenesis accumulated (LEA)), reactive oxygen species (ROS)), hormones, reserve polysaccharides (glucose, mannose, galactose and galactomannans) and others such as malondialdehyde (MDA), in addition to ultrastructural analyses, with the natural aging of seeds. In addition, the *in vitro* germination of seeds at different stages of maturation in this study, allows further work in plant tissue culture, with the use of zygotic embryos and seedlings, tissues that are more responsive to somatic embryogenesis and which will give direction to future work with adult explants of selected superior genotypes, contributing to the improvement of the species.

## 2 MATERIALS AND METHODS

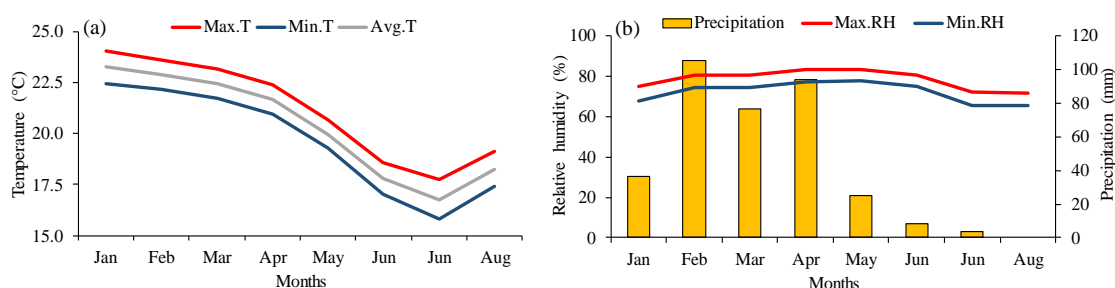
### 2.1 Plant material

One thousand fruits/seeds of *E. edulis* from ten wild matrix plants were harvested for each stage of maturation (200 seeds per matrix plants), located in the district of Pedra Menina, in the municipality of Dores do Rio Preto, Espírito Santo, Brazil, around the Caparaó National Park (Table 1). The maximum temperature during the study period was 24 °C in January and the minimum was 15.8 °C in June, with a maximum precipitation of 105 mm in February and a maximum relative humidity of 83% in April and May (Fig. 1).

**Table 1.** Coordinates and characteristics of the matrix plants

Matrix	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	DBH* (cm)	High (m)
1	20°31'32.3"	41°48'30.0"	1164.0	15.4	11.56
2	20°33'10.5"	41°49'34.8"	928.0	18.1	7.11
3	20°32'45.8"	41°49'36.6"	957.0	18.2	9.14
4	20°32'45.7"	41°49'30.8"	954.0	17.8	8.29
5	20°32'46.7"	41°49'30.5"	954.0	14.8	6.71
6	20°32'46.9"	41°49'29.7"	954.0	19.6	8.24
7	20°32'45.4"	41°49'35.7"	951.0	13.4	6.70
8	20°32'45.4"	41°49'36.6"	951.0	16.8	8.39
9	20°33'36.8"	41°48'24.0"	1210.0	26.0	11.43
10	20°33'10.6"	41°49'39.8"	916.0	24.9	5.50

\*DBH. diameter at breast height of 1.30 m.

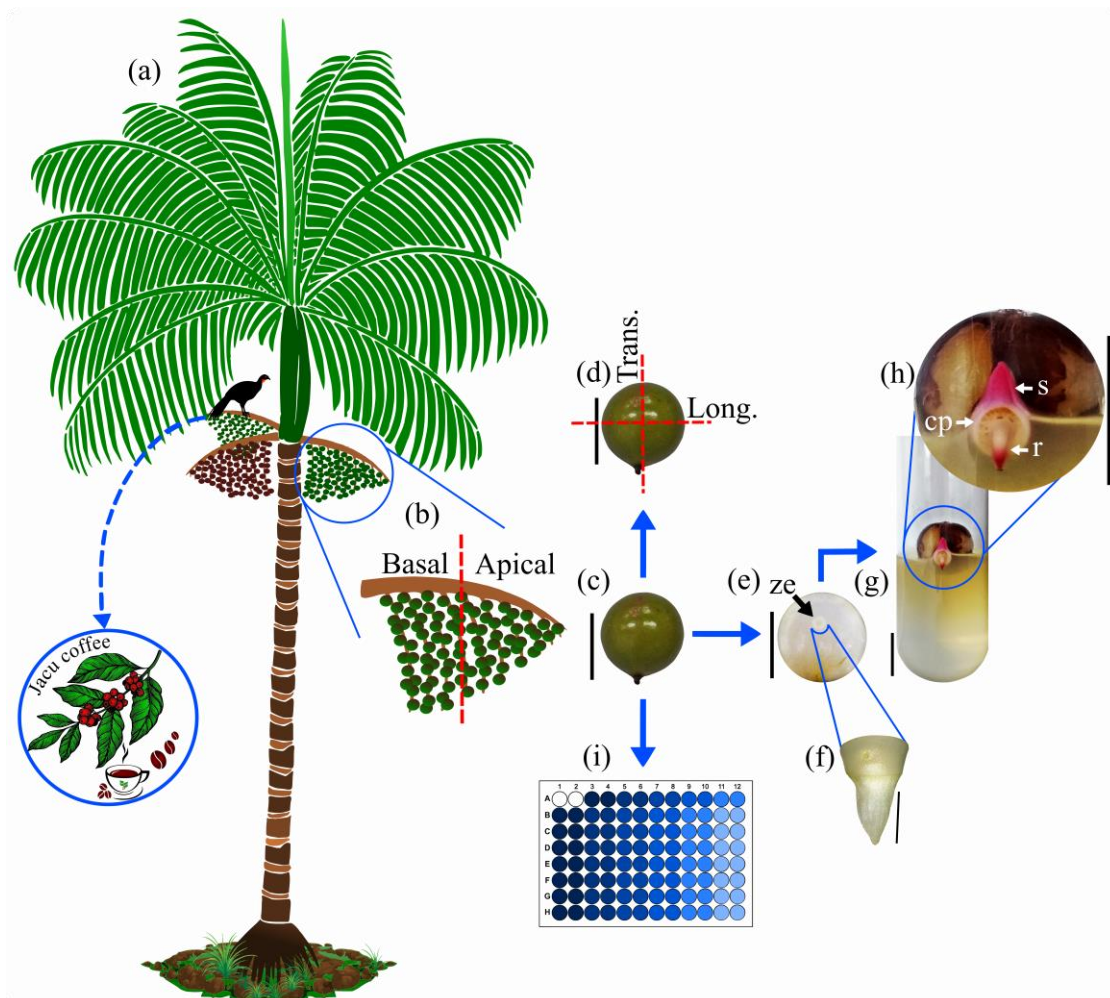


**Fig. 1** Environmental parameters in the region where the *Euterpe edulis* matrix used in this study was located. (a) Maximum (Max.T), average (Avg.T), and minimum (Min.T) temperature. (b) Maximum (Max.RH) and minimum (Min.RH) relative humidity, and precipitation. Values were recorded in 2019 from flowering to the end of the fruit harvest period. Data were provided by INMET (National Institute of Meteorology).

Fruits were harvested manually at 108, 128, 148, 168, 188, 208, and 228 days after anthesis (DAA), with the aid of pruning shears to avoid mechanical



damage. Immediately after harvesting, the samples of the fruits of the ten matrixes were mixed and packed in thermal boxes and sent for processing and analysis (Fig. 2).



**Fig. 2** Overview of the *Euterpe edulis* palm and seeds, together with a schematic representation of the procedures applied in the present study. (a) Illustration of the *E. edulis* palm with the seed-dispersing jacu (*Penelope obscura* Humboldt). After feeding on juçara fruits, the jacu may move to feed on coffee beans, producing specialty coffee. (b) Bunch with immature fruits, showing the basal and apical regions. (c) Immature fruit. (d) Morphological evaluation of the fruit, showing the longitudinal and transversal regions. (e) *In vitro* germination showing the seed without tegument and (f) the zygotic embryo (ze). (g) Protrusion of the primary root and (h) germinated seed (cp, cotyledonar petiole; s, sprouting; r, radicle). (i) Biochemical analysis, represented by an ELISA plate. Bar: 1.0 cm (c, d, e, g, h), 2 mm (f).

## 2.2 Morphological analysis

The longitudinal, transversal and average diameters of the fruits (mm), as well as fresh and dry seed mass (g) were measured manually. The relative growth

rate (RGR), by period and total, were obtained by the formula:  $RGR = (\ln(\text{average diameter}_{\text{final}}) - \ln(\text{average diameter}_{\text{initial}})) / (\text{DAA}_{\text{final}} - \text{DAA}_{\text{initial}})$  (mm day<sup>-1</sup>). The volume (cm<sup>3</sup>) was measured by the displacement of water in a 100 mL beaker; whereas moisture (%) was assessed in an oven at 105 °C (BRASIL, 2009).

### 2.3 *In vitro* germination

After cleaning the fruits, the tegument was removed, and the fruits were immersed in a 2% ascorbic acid solution to prevent the oxidation of phenols.

Using a laminar flow chamber, seeds were immersed in 70% ethyl alcohol for 60 s, 2.5% sodium hypochlorite (Candura<sup>®</sup>) for 10 min, and amoxicillin solution (Germed<sup>®</sup>) at 3 g L<sup>-1</sup> for 10 min. A triple wash in distilled, autoclaved water was performed after each step. Following disinfection, the seeds were placed in test tubes (25 × 150 mm) containing 10-mL aliquots of MS culture medium (Murashige and Skoog 1962) (Sigma<sup>®</sup>) supplemented with 1 g L<sup>-1</sup> polyvinylpyrrolidone (Synth), 30 g L<sup>-1</sup> sucrose (Dinâmica<sup>®</sup>), 0.1 g L<sup>-1</sup> myo-inositol (Sigma<sup>®</sup>), and 6 g L<sup>-1</sup> agar (Kasvi<sup>®</sup>). The pH of the medium was adjusted to 5.7 ± 0.1 with 1.0 N KOH (Alphatec<sup>®</sup>) and/or HCl (Vetec<sup>®</sup>). The tubes were capped with rigid polypropylene lids (Sigma<sup>®</sup>). The medium was autoclaved at 120 °C and 108 kPa for 20 min.

Cultures were maintained in a growth room at 27 ± 2 °C and a 16-h light photoperiod, under irradiance of 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provided by two fluorescent lamps (Empalux<sup>®</sup>) until seedlings were obtained. During this period, germination (%) (BRASIL, 2009), relative frequency of germination (RFG), germination speed index (GSI) (MAGUIRE, 1962), and mean germination time (MGT, days) (LABORIAU, 1983) were recorded. After 150 days, normal and abnormal seedlings (%), seedling height (cm), stem diameter (mm), root length (cm), number of roots, dry mass of shoots, roots, and total seedlings (DMS, DMR, and DMT, g), as well as the Dickson quality index (DQI) (DICKSON et al., 1960) were calculated.

### 2.4 Biochemical analyses

Compounds were extracted from *E. edulis* seeds using the modified

methodology of Bligh and Dyer (1959). Freshly harvested seeds without tegument were dehydrated in an oven at 40 °C until constant mass was achieved. They were then crushed in a knife mill (Wyllie Micro–TE 650, Tecnal) and sieved via 60-mesh granulometry. Four aliquots of 250 mg were subjected to extraction in decreasing ethanolic series (98, 80, and 50%).

After the plant material was homogenized with each of the ethanolic solutions (2000 µL), the tubes were incubated for 20 min at 80 °C, centrifuged at 10 000 rpm for 10 min, and the supernatant was collected. The pellet was resuspended in 1500 µL of chloroform. Distilled water (2000 µL) was added to induce separation into a hydrophilic upper phase and a hydrophobic lower phase.

Total lipids were obtained using the gravimetric method of Bligh and Dyer (1959), whereby the hydrophobic phase was transferred to microtubes and evaporated in a forced-circulation oven at 60 °C for 48 h. Total lipids were then determined on an analytical scale (0.000 1 g) using three replicates.

Total soluble phenols were quantified with the Folin-Ciocalteu method (SWAIN; HILLS, 1959) based on a standard curve of tannic acid. Briefly, 11 µL of the hydrophilic phase extract was added to a microtube together with 189 µL of 80% ethanol, 800 µL of 4% sodium carbonate, and 1000 µL of Folin-Ciocalteu reagent. After 30 min in the dark, the samples were read on a spectrophotometer at 760 nm using four replicates.

Total soluble sugar were determined using the anthrone method (YEMM; WILLIS, 1954) based on a standard glucose curve. Briefly, 10 µL of hydrophilic phase extract was added to a microtube together with 490 µL of 80% ethanol and 1000 µL of 0.2% anthrone. The mixture was incubated at 90 °C for 10 min, after which absorbance of three replicates was read on a spectrophotometer at 620 nm. The concentrations were determined based on a standard curve made with glucose.

Total protein content was determined using the Bradford method (BRADFORD, 1976) based on a standard bovine serum albumin curve. The pellet resulting from the extraction of soluble compounds was mixed with 4000 µL of 0.2 M KOH, incubated at 80 °C for 1.5 h, and centrifuged at 4000 rpm for 20 min. Finally, 20 µL of the extract, 180 µL of 0.2 M KOH, and 1000 µL of Bradford reagent were mixed in a microtube, incubated for 10 min, and absorbance was

read on a spectrophotometer at 595 nm.

After extracting the total protein, the dry pellet was placed in a test tube, resuspended in 2000  $\mu\text{L}$  of 3% HCl, incubated at 80 °C for 3 h, and centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The supernatant was collected for starch determination using a standard curve of soluble starch. Aliquots of 2  $\mu\text{L}$  were transferred to test microtubes, mixed with 298  $\mu\text{L}$  of 3% HCl and 1000  $\mu\text{L}$  of 0.2% anthrone reagent, incubated in a water bath at 97 °C for 15 min, and absorbance was read on a spectrophotometer at 620 nm using four replicates.

For fiber analysis, the pellet obtained after starch extraction was dried in a forced-circulation oven at 60 °C until constant weight was achieved. Ashes were made using 2-g samples, packed in crucibles, and placed in a muffle for 2 h at 600 °C (CABRERA-BOSQUET et al., 2009) using four replicates.

## 2.5 Experimental design

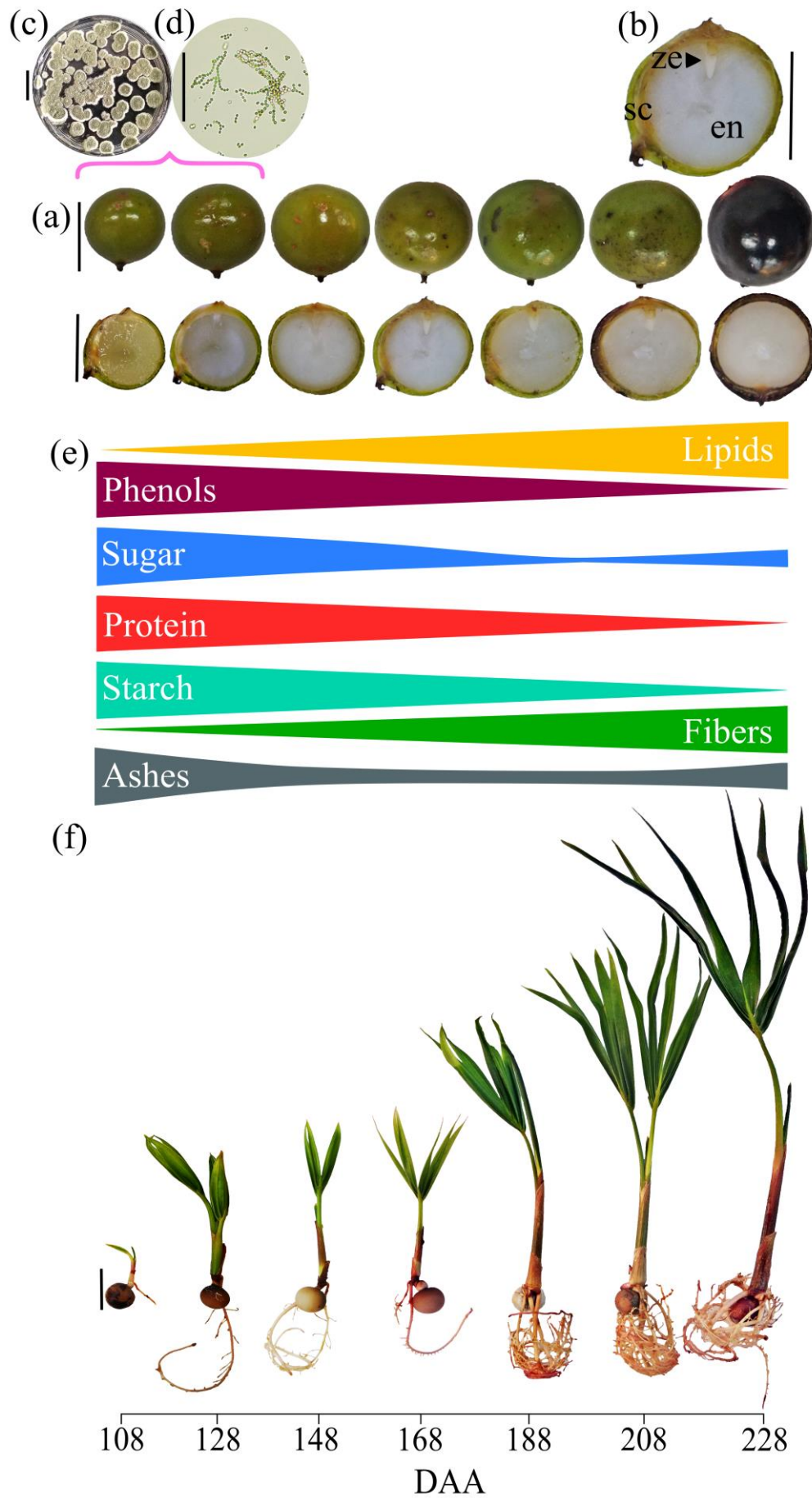
The design was completely randomized, consisting of seven treatments (maturation phases) and four replications with 10 seeds each, for morphological, biochemical, and *in vitro* germination analyses. Data were submitted to analysis of variance, regression, and Pearson's correlation using R software (R Core Team 2020).

## 3 RESULTS

The matrices produced an average of four clusters with 172 rachis per bunch, consisting of an average of 58.42 fruits per cluster in the basal portion and 33.25 in the apical portion (Fig. 2b). This amounted to a total of, on average, 7883.62 fruits per bunch.

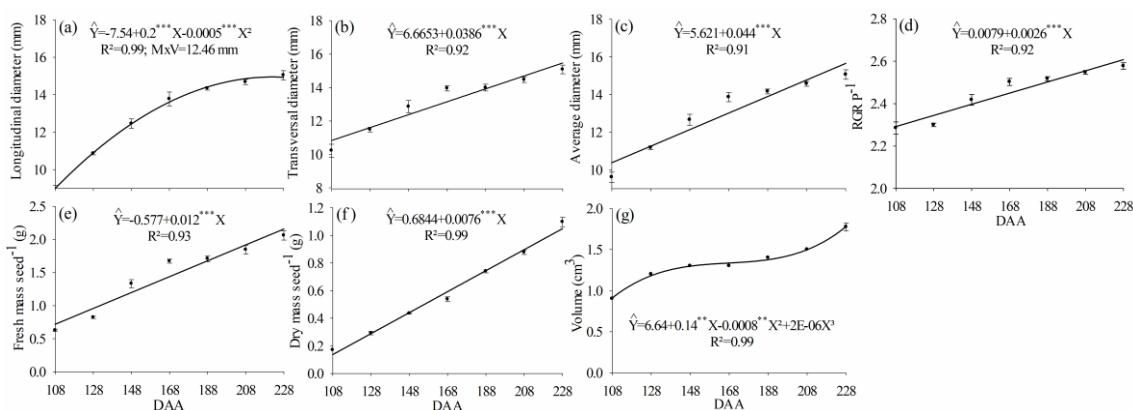
The endosperm of the seeds remained aqueous until 108 DAA, when it changed to a gelatinous consistency and the zygotic embryo became visible. At approximately 148 DAA, the endosperm became solid (Figs. 3a, b). The point of physiological maturity occurred at approximately 228 DAA, when the seeds presented 46.71% moisture, and reached maximum germination plus accumulation of fresh and dry mass. After this point, the fruits came off the bunch naturally. Fungal contamination (*Penicillium* spp.) was observed in 31% (108

DAA) and 10% (128 DAA) of the seeds (Figs. 3c, d); after that, incidence of this microorganism was not verified. Seed reserves showed a different degree of mobilization during maturation (Fig. 3e); whereas seedlings exhibited different size in accordance with the seed maturation phase (Fig. 3f).



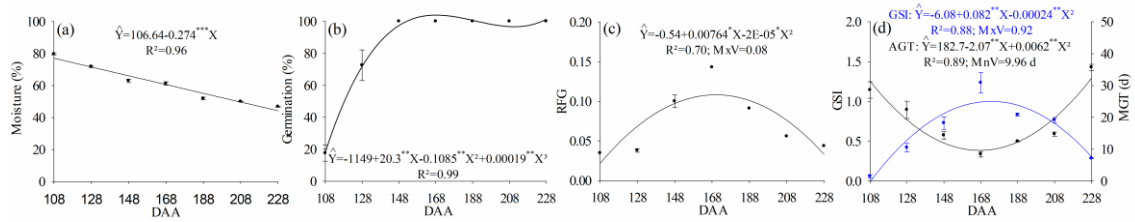
**Fig. 3** Qualitative summary of the morphological and biochemical changes occurring during *Euterpe edulis* maturation and seedling production. (a) External and internal morphological changes of *E. edulis* fruits during ripening. (b) Internal seed details, seed with 168 DAA (ze, zygotic embryo; en, endosperm; sc, tegument). (c) *Penicillium* spp. present during *in vitro* germination. (d) Spores of the fungus *Penicillium* spp. (e) Mobilization of seed reserves during maturation. (f) Seedling quality with 150 days of each *E. edulis* seed maturation stage. DAA – days after anthesis. Bar: 1.0 cm (a, b); 2.0 cm (c, f); 0.5 nm (d).

The longitudinal diameter showed a quadratic growth, with a maximum value of 12.46 mm at 200 DAA (Fig. 4a). In comparison, the transversal and average diameters, and fresh and dry weight of the fruits displayed linear ascendancy, reaching 15.08 mm, 15.06 mm, 2.06 g, and 1.10 g at 228 DAA, respectively (Figs. 4b, c, e, f). The relative growth rate per period displayed linear decreasing (Fig. 4d), with an average total rate of 0.0037 mm day<sup>-1</sup>. And the volume followed a cubic model, with maximal values at the beginning and at the end of maturation (Fig. 4g).



**Fig. 4** Physical parameters of *Euterpe edulis* seeds during maturation (days after anthesis – DAA). (a) Longitudinal diameter, (b) transversal diameter, (c) average diameter, (d) relative growth rate period<sup>-1</sup> (RGR P<sup>-1</sup>) (mm day<sup>-1</sup>), (e) fresh mass seed<sup>-1</sup>, (f) dry mass seed<sup>-1</sup>, (g) volume; \*\*\*p < 0.0001 and \*\*p < 0.001. MxV, maximum value. Bar: standard deviation of the mean.

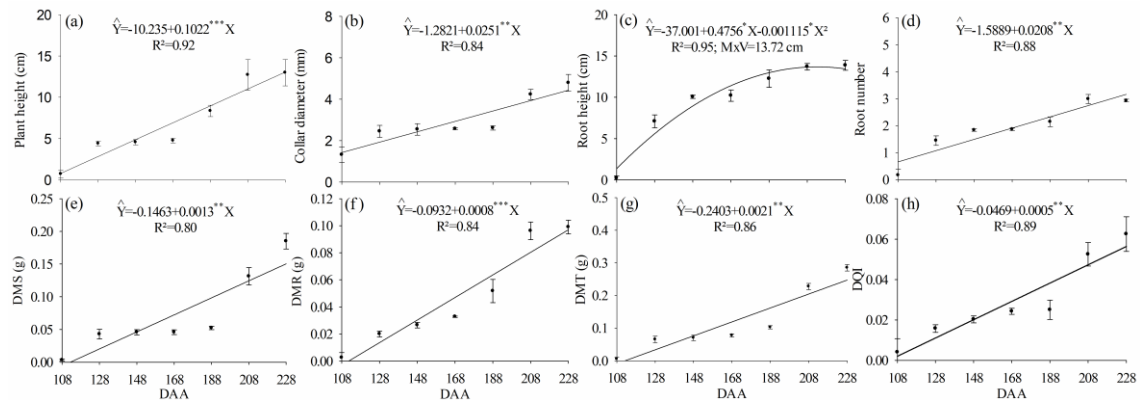
Between 108 and 228 DAA, moisture content decreased from 79.49 to 46.59% (Fig. 5a). Germination was maximal from 148 DAA, with the highest RFG (0.08) at 162.55 DAA (Figs. 5b, c). The maximum GSI (0.92) and minimum MGT (9.96 days) occurred at approximately 170 DAA (Fig. 5d). Only seeds germinated 108 DAA (17.5%) and 128 DAA (72.5%) developed abnormal seedlings (average of 15% for both); after that, maximum germination and formation of normal seedlings were observed.



**Fig. 5** Moisture content and germination parameters of *Euterpe edulis* seeds during maturation (days after anthesis – DAA). (a) Moisture, (b) germination, (c) relative frequency of germination (RFG), (d) germination speed index (GSI) and mean germination time (MGT); \*\*\*p < 0.0001, \*\*p < 0.001, and \*p < 0.01. MxV, maximum value; MnV, minimum value. Bar: standard deviation of the mean.

The height and diameter of seedlings obtained from the germination of seeds 108 and 228 DAA, and following another 150 days of *in vitro* cultivation, were 12.26 cm (0.72-12.98 cm) and 3.47 mm (1.32-4.79 mm), respectively (Figs. 6a, b). Root length showed quadratic growth, with a maximum value of 13.72 cm at 213.27 DAA (Fig. 6c); whereas the number of roots increased until 228 DAA, with an average of 2.93 roots per seedling (Fig. 6d).

Other seedling parameters, including DMS, DMR, DMT, and DQI, increased linearly throughout seed maturation, reaching maximum values of 0.185 g, 0.099 g, 0.285 g, and 0.0625 at 228 DAA, respectively (Figs. 6e–h).



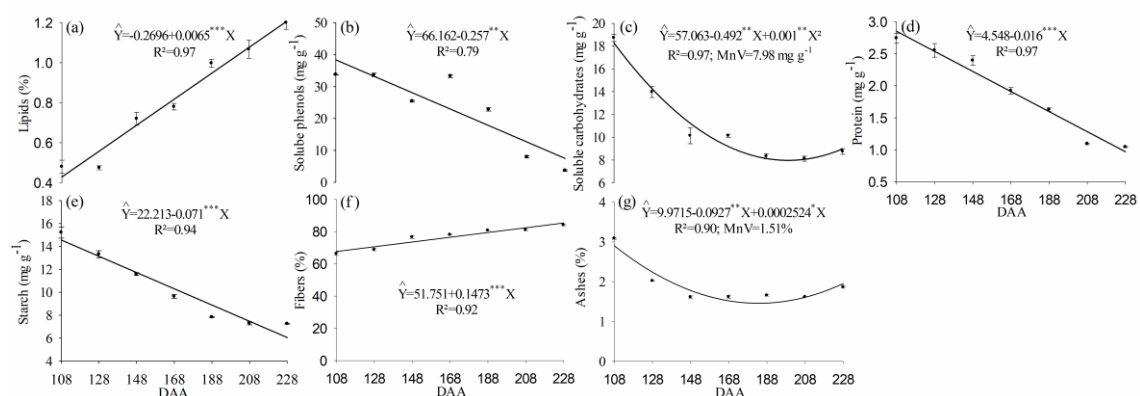
**Fig. 6** Physical parameters of *Euterpe edulis* seedlings obtained after different seed maturation periods (days after anthesis – DAA). (a) Seedling height, (b) collar diameter, (c) root length, (d) number of roots, (e) dry mass of shoots (DMS), (f) dry mass of roots (DMR), (g) dry mass of total seedlings (DMT), (h) Dickson quality index (DQI); \*\*\*p < 0.0001, \*\*p < 0.001, and \*p < 0.01. MxV, maximum value. Bar: standard deviation of the mean.

The percentage of lipids in the seeds increased linearly from 0.48 to 1.20%



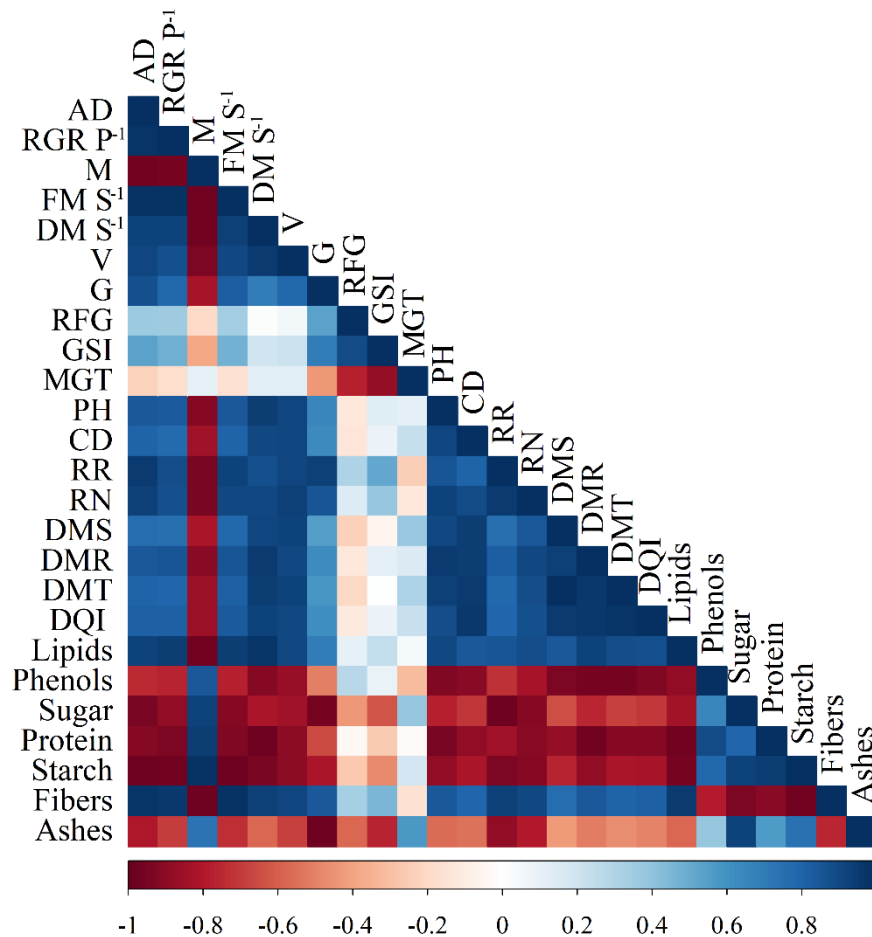
(108 to 228 DAA), whereas soluble phenols decreased from 33.65 to 3.69 mg g<sup>-1</sup> over the same period (Figs. 7a, b). Soluble sugar, instead, followed a quadratic model, decreasing during seed maturation and then rebounding towards the end, marking an overall change from 18.73 to 8.76 mg g<sup>-1</sup> (Fig. 7c).

Proteins and starch showed a behavior similar to that of soluble phenols, decreasing from 2.74 to 1.04 mg g<sup>-1</sup> and from 15.21 to 7.25 mg g<sup>-1</sup> (108 to 228 DAA), respectively (Figs. 7d, e). Fiber content increased from 66.17 to 83.16% (Fig. 7f). The minimum percentage of ash was 1.51% at approximately 183 DAA (Fig. 7g).



**Fig. 7** Biochemical composition of *Euterpe edulis* seeds during maturation (days after anthesis – DAA). (a) Lipids, (b) soluble phenols, (c) soluble sugar, (d) proteins, (e) starch, (f) fibers, (g) ashes; \*\*\*p < 0.0001 \*\*p < 0.001, and \*p < 0.01. MnV, minimum value. Bar: standard deviation of the mean.

Most studied variables displayed a positive correlation; only relative growth rate period-1 (RGR P-1), moisture, phenols, soluble sugar, proteins, and starch exhibited a negative correlation. Finally, correlations were not significant between RFG, GSI, and MGT with respect to other variables (Fig. 8).



**Fig. 8** Pearson's correlation of different variables from *Euterpe edulis* seeds during maturation. Mean diameter (AD), relative growth rate period<sup>-1</sup> (RGR P<sup>-1</sup>), moisture content (M), fresh mass seed<sup>-1</sup> (FM S<sup>-1</sup>), dry mass seed<sup>-1</sup> (DM S<sup>-1</sup>), volume (V), germination (G), relative frequency of germination (RFG), germination speed index (GSI), mean germination time (MGT), plants height (PH), collar diameter (CD), root length (RR), root number (RN), dry mass of shoots (DMS), dry mass of roots (DMR), dry mass of total seedlings (DMT), Dickson quality index (DQI), lipids, phenols, soluble sugar, proteins, starch, fibers, and ashes;  $p < 0.05$ .

#### 4 DISCUSSION

The time required for fruit ripening, as well as the number of bunches and seeds produced by each *E. edulis* plant, can vary greatly. Mantovani and Morellato (2000) reported a period of 226 days for maturation, and 2728 fruits per bunch. Dorneles et al. (2013) observed 2.3 clusters, with 103 rachis, totaling 2100 fruits. Finally, Silva and Reis (2018) calculated a maturation period of 224 days, with an average of one cluster per palm and 2175 fruits.

Climatic factors during the flowering period can influence parameters related to subsequent fruit production. For example, high rainfall and relative

humidity can decrease the incidence of pollinators and cause mechanical damage to the flowers, preventing pollen grains from forming and diluting the concentration of sugars in the nectar (DORNELES et al., 2013). Conversely, low rainfall can reduce the availability of pollen grains by increasing their sterility, decreasing their germination and pollen tube growth, reducing the fertility of megagametophytes, inhibiting the differentiation of microspores, decreasing the number of dehiscent anthers, and eventually leading to fewer seeds (ALQUDAH et al., 2011).

Development of immature fruits of *E. edulis* is classified into three phases based on the consistency of the endosperm: aqueous, gelatinous, and solid (SILVA; REIS, 2018). In the present study, it took 108 days from anthesis to the end of the aqueous phase, which is eight days more than reported by Silva and Reis (2018). The gelatinous phase lasted 40 days, but was characterized by larger fruits (9.61-11.18 mm). The consistency of the endosperm during this phase explains the occurrence of fungal contamination (*Penicillium* spp.) on seeds placed to germinate *in vitro* 108 and 128 DAA. The phase comprising solid endosperm lasted 60 days and fruits were ripe over a period of 40 days.

In the study by Silva and Reis (2018), the aqueous endosperm began at 37 DAA, with small fruit size (5 mm) and duration of 63 days; the gelatinous endosperm, averaging 8 mm in diameter, lasted 40 days; and the solid endosperm, from 12 mm in diameter, took until 204 DAA to become mature. The fruits ripened and remained in the mother plant for another 47 days, when they were finally completely dispersed. Generally, the duration of each phase can vary by 2-6 days.

The morphological variables (longitudinal, transversal, and average diameters of the fruits, fresh and dry mass per seed, and volume) increased during maturation up to 228 DAA. The accumulation of fibers exhibited a high positive correlation with time ( $>0.92$ ). The plant cell wall consists of three main fibers: cellulose, hemicellulose, and lignin. Hemicelluloses, which are constituted mainly of mannans, are present in seed endosperm as thick cell walls (PANZA et al., 2004); they are formed during maturation concomitantly with the increase in collar diameter, fresh and dry mass, and seed volume.

Seed mass is an important qualitative variable. Here, the accumulation of

dry mass seed<sup>-1</sup> (0.2-1.1 g) exhibited a positive correlation (>0.87) with seedling height, stem diameter, length and number of roots, DMS, DMR, DMT, and DQI (Fig. 8), indicating that larger seeds tend to produce more vigorous seedlings (ALABARCE; DILLENBURG, 2017).

Dry mass of mature seeds (0.09 g) was higher than that reported previously by Andrade (2001). This discrepancy can be explained by differences in environmental conditions during the seed maturation process. The availability of light, water, and nutrients has been shown to influence seed mass and quality, as it affects photosynthesis in the mother plant and, consequently, the provision of resources for the seeds (ALABARCE; DILLENBURG, 2017).

Fruit ripening was accompanied by a decrease in moisture content, soluble sugars, proteins, and starch. *E. edulis* seeds present a subcellular structure associated with extremely recalcitrant behavior, characterized by highly vacuolated tissues, virtually no storage reserves, abundant endomembranes, and ergastic substances (PANZA et al., 2004). The observed results corroborate previous studies of mature *E. edulis* seeds, in which moisture content of 43-47% and average of 48.5% have been associated with a decline in seed viability to below 35-30%, and total loss of germination at 24-18% moisture (MARTINS et al., 2000; ANDRADE, 2001; PANZA et al., 2004).

According to Queiroz (1986), the germination of mature seeds (last stage of maturation) in *E. edulis* occurs in two distinct stages: (1) protrusion of the cotyledonary petiole; and (2) root growth (emergence) and budding of the cotyledonary petiole, which is completed 42 days after the first stage. However, removal of an immature seed coat at 168 DAA caused the first stage to begin on the second day and the second stage to end after 11 days (Fig. 2h).

In this study, the immature embryo exhibited 100% germination capacity at 148 DAA (Fig. 5b), maximum germination speed (0.92) at 170 DAA, minimum MGT (9.96 days) at approximately 166 DAA (Fig. 5d), and 100% normal seedlings in all these cases (BRASIL, 2009). The germination rate of *E. edulis* seeds is likely related to the deposition of small branched galactomannans (called pure mannans), which provide the endosperm the necessary hardness during maturation. This may protect the embryo from mechanical damage and alterations in water availability because the higher is the degree of branching, the

more soluble is the polysaccharide (BUCKERIDGE et al., 2000). Baskin and Baskin (2014b) suggested that underdeveloped palm embryos indicated morphophysiological dormancy of the mature seeds. As well as, Alabarce and Dillenburg (2017) associated the slow and uneven germination of *E. edulis* (three to six months – *ex vitro*) with the embryo being underdeveloped and needing an additional amount of time to reach a normal size, after dispersion and before germination (protrusion of the primary root).

Each genotype may have a different germination rate, as suggested by Soler-Guilhen et al. (2020), whose study of various *E. edulis* genotypes revealed germination rates *ex vitro* varying between 30 and 90% (mature fruits), augmenting at 20-30 days, before decreasing and remaining constant thereafter. However, with the use of seeds from an early maturation stage (148 DAA), in the present work, produced a total gain of 101 days, in comparison with the use of ripe fruits (228 DAA). The seeds obtained 108 and 128 DAA are not recommended for use due to a lower germination percentage and higher proportion of abnormal seedlings likely caused by underdeveloped embryos and insufficient reserves.

The two reserve tissues in palm seeds are cotyledons and endosperm. The cotyledon contains limited reserves of lipid bodies and closed globoid protein crystals. In the endosperm, the main reserves are proteins, lipids, and hemicelluloses. Most proteins are present in the seeds' outermost cells (PANZA et al., 2004). In *E. precatória*, histochemical analyses revealed the presence of differently sized and shaped protein deposits along the haustorial region, mainly on the periphery of the procambial slopes, and close to the embryonic axis. Small and sparse grains of starch have been identified in and around the plumule and at the distal end (FERREIRA et al., 2020).

The negative correlation (-0.96) between lipids and starch (Fig. 8) is associated with a reduction in the latter and an increase in the former during seed maturation. It can be explained by the requirement for lipids in maintaining membrane integrity (SCHWEMBER; BRADFORD, 2010) and as an energy reserve for germination (GUERIN et al., 2020). The latter is proven with the positive correlation (> 0.84) of the lipids variable with the morphological variables of the seedlings, produced during the maturation of the seeds. This finding

corroborates the observations made in *Acrocomia aculeata* (Lacq.) Lodd. ex Mart., whereby starch was converted into intermediate trioses, which were readily used in the synthesis of fatty acids (MONTROYA et al., 2016).

The high positive correlation (0.93) between soluble sugar and moisture (Fig. 8) is attributed to the concomitant maximum carbohydrate and water content in seeds. Soluble sugars are consumed during seed maturation and act as strong osmoregulators, facilitating the ingestion and expansion of water (MONTROYA et al., 2016).

The observed reduction in phenol content with advancing maturation can be attributed to the seeds getting ready for germination. Phenols can interfere with germination by sequestering the oxygen necessary for the respiratory process (PINOL; PALAZÓN, 1993).

Besides germination and morphological variables, the chemical composition, content of bioactive compounds, fatty acids profiles, and antioxidant activity of *E. edulis* fruits can vary according to the environmental conditions and region of growth (BORGES et al., 2011). Long-term availability of endospermic resources in the seeds favors the establishment of seedlings and their adaptation to different environments (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017).

The present study is the first work that elucidates the maturation of *E. edulis* seeds and highlights that it is possible to use these seeds in the immature stage (148 DAA = condition that provides maximum germination and vigor) for the production of seedlings. It should be considered that mature seeds have tegumentary and endosperm hardness, which causes mechanical resistance to embryo germination, and consequently, a greater time and variation in the germination process. In addition, immature seeds provide time savings, not needing to reach the physiological maturity point. Another advantage of using immature seeds is obtaining *in vitro* aseptic seedlings, which can be used in plant tissue culture, accelerating production and genetic improvement processes.

## 5 CONCLUSION

*E. edulis* seeds have sufficient reserves to allow embryo development at 148 DAA with 100% normal seedlings *in vitro*.

The concentrations of lipids and fibers have a high positive correlation with the morphophysiological variables during seed maturation and seedling production, while phenols, soluble sugars, proteins, and starch have a high negative correlation.

The *in vitro* seedling production of *E. edulis* showed a gain of 101 days when using seeds of 148 DAA (immature seeds - seeds with green shell color) compared to seeds of 228 DAA (mature seeds - seeds with black shell color). Therefore, such results can contribute to a reduction in seedling production time.

## 6 REFERÊNCIAS

ALABARCE, F. S.; DILLENBURG; L. R. Maternal light environment during seed development can affect seed quality of *Euterpe edulis*. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 29, p. 1-11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0083-5>

ALENCAR, N. L.; INNECCO, R.; GOMES-FILHO, E.; GALLÃO, M. I.; ALVAREZ-PIZARRO, J. C.; PRISCO, J. T.; OLIVEIRA, A. B. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. *jamacaru* (Cactaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 823-832, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000300024>

ALQUDAH, A. M.; SAMARAH, N. H.; MULLEN, R. E. Drought stress effect on crop pollination, seed set, yield and quality. In: LICHTFOUSE, E. **Alternative farming systems, biotechnology, drought stress and ecological fertilization**. Dordrecht: Springer, 2011. p. 193-213.

ANDRADE, A. C. S. The effect of moisture content and temperature on the longevity of heart of palm seeds (*Euterpe edulis*). **Seed Science Technology**, v. 29, p. 171-182, 2001.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination**, 2nd Edn. San Diego, CA: Elsevier, 2014a. 1600p.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. What kind of seed dormancy might palms have? **Seed Science Research**, v. 24, p. 17-22, 2014b. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258513000342>

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1139/o59-099>

BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 4, p. 2128-2133, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.006>

BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J.; HELLER, M.; MICKE, G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 363-369, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.035>

BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Germinação de sementes de palmiteiro (*Euterpe edulis* Mart.). **Bragantia**, v. 34, p. 23-29, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87051975000100028>

BRASIL. Instrução Normativa Nº 6. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial da União de 23 de setembro de 2008**, (Seção 1) 185, p. 75-83.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. MAPA/DAS/ACS. 395p. 2009.

BRASIL. **Portaria MMA Nº 443, de 17 de dezembro de 2014**, seção 1, p. 110-121.

BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 137-162, 2000.

CABRERA-BOSQUET, L.; SANCHEZ, C.; ARAUS, J. L. How yield relates to ash content, D13C and D18O in maize grown under different water regimes. **Annals of Botany**, v. 104, p. 1207-1216, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcp229>

CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J. L. A.; MAZON, E.; BARBI, R. C. T.; ALVES, F. E. S. B.; CHAIMSOHN, F. P.; RIBANI, R. H. Valorization of *Euterpe edulis* Mart. agroindustrial residues (pomace and seeds) as sources of unconventional starch and bioactive compounds. **Journal of Food Science**, v. 85, p. 96-104, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14978>

CHAGAS, G.; SALK, C. F.; VIDAL, E. J.; SOUZA, S. E. X. F.; BRANCALION, P. H. S. Exploiting fruits of a threatened palm to trigger restoration of Brazil's Atlantic Forest. **Restoration Ecology**, v. 29, p. e13294, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/rec.13294>

CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe dulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, p. 134-142, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v32n2847>

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce



and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960. DOI: <https://doi.org/10.5558/tfc36010-1>

DONOHUE, K. Completing the cycle: material effects as the missing link in plant life histories. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 1059-1074, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0291>

DONOHUE, K.; DE CASAS, R. R.; BURGHARDT, L.; KOVACH, K.; WILLIS, C. G. Germination, postgermination, adaptation, and species ecological ranges. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 41, p. 293-319, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144715>

DORNELES, L. L.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J.; PADILHA, M. T. S. Biologia da polinização de *Euterpe edulis* Martius (*Arecaceae*) e associação com abelhas sociais (Apidae: Apini) em sistema agroflorestal na Ilha de Santa Catarina. **Iheringia**, v. 68, p. 47-57, 2013.

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, p. 693-713, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01219-7>

GUERIN, C.; SERRET, J.; MONTÚFAR, R.; VAISSAYRE, V.; BASTOS-SIQUEIRA, A.; DURAND-GASSELIN, T.; TREGGAR, J.; MORCILLO, F.; DUSSERT, S. Palm seed and fruit lipid composition: phylogenetic and ecological perspectives. **Annals of Botany**, v. 125, p. 157-172, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcz175>

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.

LAI, L. M.; TIAN, Y.; WANG, Y. J.; ZHAO, X. C.; JIANG, L. H.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C.; ZHENG, Y. Distribution of three congeneric shrub species along an aridity gradient is related to seed germination and seedling emergence. **AoB Plants**, v. 7, p. plv071, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv071>

LI, R.; CHEN, L. J.; WU, Y. P.; ZHANG, R.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; HU, X. Effects of cultivar and maternal environment on seed quality in *Vicia sativa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01411>

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

- MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. Fenologia da floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral. In: REIS, A.; REIS, M. S. ***Euterpe edulis Martius***: biologia, conservação e manejo sustentado. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000. p. 23-38.
- MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; ALVES BOVI, M. L. Desiccation tolerance of four seed lots from *Euterpe edulis* Mart. **Seed Science Technology**, v. 28, p. 101-113, 2000.
- MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. **Protoplasma**, v. 254, p. 1563-1578, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1048-x>
- MONTOYA, S. G.; MOTOIKE, S. Y.; KUKI, K. N.; COUTO, A. D. Fruit development, growth, and stored reserves in macauba palm (*Acrocomia aculeata*), an alternative bioenergy crop. **Planta**, v. 244, p. 927-938, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2558-7>
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- NASCIMENTO, J. R. S.; MÉLO 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, p. 110569, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110569>
- NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination - still a mystery. **Plant Science**, v. 179, p. 574-581, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>
- PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MALDONADO, S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 145, p. 445-453, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00293.x>
- PINOL, M. T.; PALAZÓN, J. **Fisiología y bioquímica vegetal**. 1ed. Madrid: McGrawHill, 1993, 581p.
- QUEIROZ, M. H. Botão germinativo do palmitheiro como indicador de germinação. **Journal of Seed Science**, v. 8, p. 55-59, 1986.
- R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- RIBEIRO, L. O.; PEREIRA, R. N. C.; TONON, R. V.; CABRAL, L. M. C.; SANTIAGO, M. C. P. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. C.; MATTA, V. M.; FREITAS, S. P. Antioxidant compounds recovery from juçara residue by thermal assisted extraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, p. 68-73,

2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0651-0>

SCHWEMBER, A. R.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storage conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 4423-4436, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erq248>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; NEHRING, P.; GOIS, J. S.; 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, p. 125-131. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.006>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

SCHULZ, M.; BILUCA, F. C.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. D. S. C.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; GOIS, J. S.; ALMEIDA, T. S.; BORGES, D. L.; MILLER, P. R.; COSTA, A. C.; FETT, R. Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius) subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 228, p. 447-454, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.038>

SCHULZ, M.; BRUGNEROTTO, P.; SERAGLIO, S. K. T.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. S. C.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Aliphatic organic acids and sugars in seven edible ripening stages of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103683, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103683>

SILVA, J. Z.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de frutos em *Euterpe edulis* (Martius). **Ciência Florestal**, v. 28, p. 295-309, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509831655>

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. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.42461>

SORIANO, D.; HUANTE, P.; GAMBOA-DEBUEN, A.; OROZCO-SEGOVI, A. Effects of burial and storage on germination and seed reserves of 18 tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. **Oecologia**, v. 174, p. 33-44, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2753-1>

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I quantitative analysis of phenolics constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, n. 1, p. 63-68, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>

TREVISAN, A. C. D.; FANTINI, A. C.; SCHMITT-FILHO, A. L.; FARLEY, J.

Market for Amazonian açai (*Euterpe oleraceae*) stimulates pulp production from Atlantic Forest juçara berries (*Euterpe edulis*). **Agroecology and Sustainable Food Systems**, v. 39, p. 762-781, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/21683565.2015.1025461>

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj0570508>

ZHAO, M.; ZHANG, H.; YAN, H.; QIU, L., BASKIN, C. C. Mobilization and role of starch, protein, and fat reserves during seed germination of six wild grassland species. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.002347>

### CAPÍTULO III

#### **Físico-química da maturação de sementes de *Euterpe edulis* Martius: uma espécie de palmeira ameaçada da Mata Atlântica**

**Resumo:** *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) é uma espécie de palmeira nativa da Mata Atlântica, monocaule, e que se propaga unicamente por sementes que são recalcitrantes, e ameaçada de extinção por sua ampla exploração. O principal constituinte de reserva das sementes em Arecaceae é a manana presente na parede celular, que confere dureza e proteção ao embrião em formação. Porém, pouco se sabe da constituição físico-química das sementes em diferentes estágios de maturação. Portanto, objetivou-se analisar a germinação *in vitro* e o vigor das sementes, níveis de açúcares e, o papel na estrutura e cristalinidade do endosperma das sementes de *E. edulis* ao longo da maturação. Para isso, foram colhidas sementes desde 108 até 262 dias após a antese (DAA) e analisadas características morfológicas, germinação, vigor e normalidade de plântulas *in vitro*. Bem ainda, as características físico-químicas: lignina solúvel, insolúvel, cinzas, carboidratos estruturais, e a cristalinidade ao longo da maturação. As sementes cresceram linearmente até atingir a máxima massa seca aos 255 DAA, enquanto a umidade. A máxima germinação, vigor e plântulas normais ocorreu aos 164 DAA. Observou-se uma diminuição nos teores de lignina solúvel e insolúvel, cinzas, glicanos e galactanos com o avanço do estágio de maturação. E ocorreu o aumento de mananas, sendo o principal carboidrato estrutural presente no endosperma, com o aumento também da sua cristalinidade, apresentando um padrão de difração típico da manana I. Portanto, os melhores resultados fisiológicos das sementes aos 164 DAA, gera um ganho de 98 dias em relação ao uso de sementes no último estágio (262 DAA). E as análises físico-químicas demonstram que nos primeiros estágios de maturação formam compostos com estruturas de baixo ordenamento estrutural, e com a evolução da maturação ocorre aumento no teor de mananas e a formação da estrutura cristalina da manana I.

**Palavras-chave:** açúcares, glicanos, galactanos, mananas, lignina, cristalinidade, juçara.

**Abstract:** *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) is a native species of the Atlantic Forest, which propagates solely by seeds that are recalcitrant, possessing non-tillered stems, and high harvesting rates of heart palms, leading to an endangered status. The understanding of developmental phases of seeds represents an important achievement. The main constituent of seed reserve in Arecaceae is mannan present in the cell wall, which gives hardness and protection to the developing embryo. However, little is known about the physical-chemical constitution of seeds at different stages of maturation. Therefore, the objective was to analyze *in vitro* germination and seed vigor, sugar levels and the role in the structure and crystallinity of the endosperm of *E. edulis* seeds throughout maturation. For this, seeds were collected from 108 to 262 days after anthesis (DAA) and morphological characteristics, germination, vigor and normality of seedlings were analyzed *in vitro*. And the physicochemical characteristics: soluble and insoluble lignin, ash, structural carbohydrates, and crystallinity during maturation. Seeds grew linearly until reaching the maximum dry mass at 255 DAA, while moisture decreased during maturation. Maximum germination, vigor and normal seedlings occurred at 164 DAA. A decrease was observed in the contents of soluble and insoluble lignin, ash, glycans and galactans with the advancement of the maturation stage. And there was an increase in mannans, being the main structural carbohydrate present in the endosperm, with an increase in its crystallinity, presenting a diffraction pattern typical of mannan I. Therefore, the best physiological results of the seeds at 164 DAA, generates a gain of 98 days in relation to the use of seeds in the last stage (262 DAA). And the physical-chemical analyzes show that in the first stages of maturation they form compounds with structures of low structural order, and with the evolution of maturation there is an increase in the mannan content and the formation of the crystalline structure of mannan I.

**Keywords:** sugars, glycans, galactans, mannans, lignin, crystallinity, juçara.

## 1 INTRODUÇÃO

*Euterpe edulis* Martius é uma espécie nativa da Mata Atlântica, conhecida como juçara, é encontrada nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul. Esta palmeira monocaule pode atingir até 15 m de altura, e devido ao não perfilhamento, a extração do seu palmito implica no corte da planta e conseqüentemente sua morte, o que faz com que a espécie tenha sido incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção (RIBEIRO et al., 2018).

Seus frutos são semelhantes aos produzidos pelo *Euterpe oleracea* Martius e *Euterpe precatoria* Martius, que produzem o açaí (GARCIA et al., 2019). No entanto, a polpa produzida pelo *E. edulis* possui uma composição bioativa superior, com um alto potencial antioxidante e rica composição nutricional (BORGES et al., 2011; 2013; SCHULZ et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018).

O consumo de sua polpa tem grande importância na nutrição humana, pelo seu rico conteúdo em nutrientes essenciais que incluem ácidos graxos, proteínas, minerais, vitaminas e fibra alimentar, e com grande variedade de compostos fenólicos (GARCIA et al., 2019). Assim, seus frutos ganharam mais atenção e se tornaram alternativa econômica e sustentável, contribuindo para a conservação da biodiversidade.

Os frutos são pequenos com um diâmetro de 1 a 1,5 cm e a semente constitui 85% do fruto (BICUDO et al., 2014), com um embrião pequeno, compreendendo apenas 0,54% do peso fresco das sementes, e o endosperma maciço compreende cerca de 99% (PANZA et al., 2004). A germinação é considerada lenta e desuniforme, podendo levar de 60 a 90 dias (CURSI; CICERO, 2014), e a mortalidade das mudas é grande durante os primeiros anos (FANTINI; GURIES, 2007).

Muitos fatores podem influenciar nos resultados da germinação de sementes e o crescimento das plântulas, como os tipos e quantidades de metabólitos primários transferidos da planta mãe e que serão utilizados como reserva para o crescimento do embrião (BASKIN; BASKIN, 2014; LI et al., 2017). A principal reserva em Arecaceae é a manana presente na parede celular, que confere dureza e proteção ao embrião em formação. No entanto, a resistência mecânica exercida pelo manana resulta em um longo período de germinação,

pois requer esforços consideráveis de crescimento por parte do embrião (BUCKERIDGE, 2010; MOURA et al., 2019).

Os açúcares e ácidos orgânicos são os principais constituintes solúveis dos frutos e estão envolvidos na rota biossintética de compostos como aminoácidos, vitaminas e compostos voláteis (BATISTA-SILVA et al., 2018). A hipótese é que, o teor desses açúcares, principalmente mananas, aumente no decorrer da maturação dos frutos/sementes. Apesar da relevância dos açúcares, poucos estudos avaliaram o teor desses compostos em polpas de frutos de juçara (INADA et al., 2015; SCHULZ et al., 2015; 2021). Todavia, nenhum deles avaliou tais características nas sementes em diferentes estádios de maturação associado à propagação, justificando a importância desse estudo. Nesse contexto, objetivou-se analisar a germinação *in vitro* e o vigor das sementes, níveis de açúcares e, o papel na estrutura e cristalinidade do endosperma das sementes de *E. edulis* ao longo da maturação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

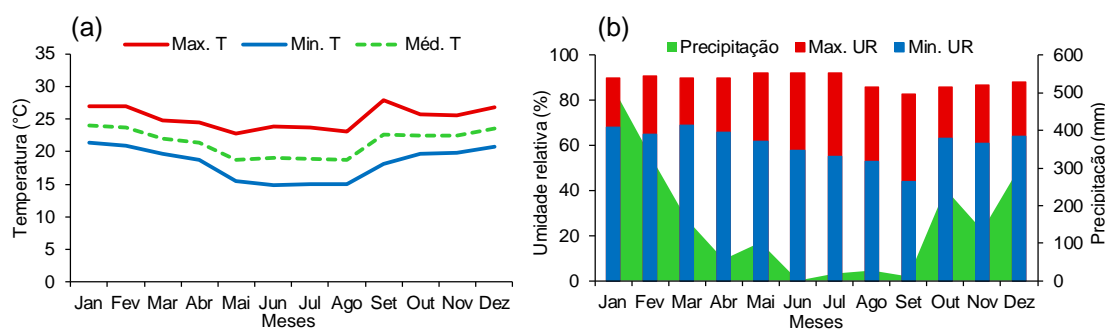
Os frutos de *E. edulis* foram colhidos de plantas matrizes, localizada no distrito de Pedra Menina, no município de Dores do Rio Preto, Espírito Santo, Brasil próximo ao Parque Nacional do Caparaó (Tabela 1). A temperatura máxima durante o período estudado foi de 28 °C em setembro e mínima de 14,9 °C em junho, com precipitação máxima de 514,4 mm em janeiro, e umidade relativa máxima de 92% em maio e junho (Figura 1).



**Tabela 1.** Coordenadas e características das plantas matrizes

Matrizes	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)	DAP* (cm)	Altura (m)
1	20°31'32,3"	41°48'30,0"	1164,0	15,4	11,56
2	20°33'10,5"	41°49'34,8"	928,0	18,1	7,11
3	20°32'45,8"	41°49'36,6"	957,0	18,2	9,14
4	20°32'45,7"	41°49'30,8"	954,0	17,8	8,29
5	20°32'46,7"	41°49'30,5"	954,0	14,8	6,71
6	20°32'46,9"	41°49'29,7"	954,0	19,6	8,24
7	20°32'45,4"	41°49'35,7"	951,0	13,4	6,70
8	20°32'45,4"	41°49'36,6"	951,0	16,8	8,39
9	20°33'36,8"	41°48'24,0"	1210,0	26,0	11,43
10	20°33'10,6"	41°49'39,8"	916,0	24,9	5,50

\* DAP. Diâmetro na altura do peito (1.30 m).



**Figura 1.** Temperaturas máxima (Max. T), média (Méd. T) e mínima (Min. T) (a), umidade relativa máxima (Max. RH), mínima (Min. RH) e precipitação (b) do início da floração ao final da colheita dos frutos na região onde está localizada a matrizes de *E. edulis*, em 2020. Dados fornecidos pelo INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), Brasil.

A colheita dos frutos foi iniciada aos 108 e estenderam-se até os 262 dias após a antese (DAA), em intervalos de sete dias, totalizando 23 estádios. Os frutos foram colhidos manualmente, e encaminhados ao Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), para avaliações de umidade (%), em estufa a  $105 \pm 3$  °C (BRASIL, 2009); massa seca semente<sup>-1</sup> (g), germinação (%), vigor, e secagem das sementes a 40 °C, para as análises físico-químicas.

## 2.1. Germinação *in vitro*

No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, após a limpeza dos frutos,

foi retirado o tegumento, e em seguida, os mesmos foram imersos em solução de ácido ascórbico à 2%, para impedir a oxidação fenólica dos tecidos vegetais.

Na câmara de fluxo laminar, as sementes de *E. edulis* foram imersas em álcool etílico a 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (Candura<sup>®</sup>) a 2,5% por 10 minutos e em solução de amoxicilina (Germed<sup>®</sup>) a 3 g L<sup>-1</sup> por 10 minutos, realizando-se a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada após cada etapa. Após desinfestação, as sementes foram dispostas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma<sup>®</sup>), suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) (Synth<sup>®</sup>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica<sup>®</sup>), 0,1 g L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma<sup>®</sup>), e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Kasvi<sup>®</sup>). O pH do meio foi ajustado para 5,7±0,1 com hidróxido de potássio (KOH) (Alphatec<sup>®</sup>) e/ou ácido clorídrico (HCl) (Vetec<sup>®</sup>) a 1,0 N, antes da autoclavagem.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 8/16 horas luz/escuro, intensidade luminosa de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> até a obtenção de plântulas. Durante esse período, foram obtidos os dados de porcentagem de germinação (%) (BRASIL, 2009), índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962), e tempo médio de germinação (dias) (LABOURIAU, 1983). E após 150 dias, plântulas normais, anormais, e sementes não geminadas (%), altura das plântulas (cm), comprimento de raízes (cm), diâmetro do coleto (mm), massa seca da parte aérea, raízes e total de plântulas (g).

## 2.2. Preparo das amostras

Após colheita de cada estágio, foram retirados o pericarpo dos frutos e as sementes, sem tegumento, foram secas até massa constante a 40 °C em estufa, e armazenadas em freezer, até a obtenção de todos os estádios. E então, as sementes foram trituradas em moinho de facas (Wyllie Micro–TE 650, Tecnal) e peneiradas na granulometria de 20 mesh para cinzas, e 60 mesh para as demais análises.

### 2.3. Extrativos

Os extratos foram obtidos em aparelho Soxhlet e uma sequência de solventes (hexano, água e etanol), determinada de acordo com o procedimento analítico recomendado pelo NREL/TP-510-42619 (SLUITER et al., 2008), e adaptada para o gênero *Euterpe* (LIMA et al., 2019; BURATTO et al., 2021).

Um cadinho de extração de porosidade 2 foi colocado em Soxhlet, com 4,0 g amostra, e adicionado 150 mL de hexano (Neon®), permanecendo em refluxo por 6 horas, 4 ciclos/h. O hexano foi evaporado em equipamento de evaporação a vácuo e o cadinho foi colocado em uma estufa a 50 °C até atingir a massa constante.

Em seguida, o cadinho com a amostra foi colocado novamente em Soxhlet com 150 mL de água destilada, permanecendo em refluxo por 12 h, 4 ciclos/h. O procedimento foi repetido com etanol (Neon®). Ambos os extratos foram secos em evaporador a vácuo, e o cadinho foi colocado em uma estufa a 50 °C até atingir a massa constante.

### 2.4. Lignina solúvel, insolúvel e carboidratos estruturais

Para caracterizar a lignina solúvel, insolúvel e carboidratos estruturais de acordo com o procedimento analítico recomendado pelo NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2011), foi adicionado em um tubo de vidro resistente, 300 mg de amostra sem extrativos (conforme descrito na seção 2.3) com 3 mL de ácido sulfúrico (72% m/m) (Neon®), e incubados por 60 min/30 °C, agitado a cada 5 min. Após o tempo de incubação, as amostras foram diluídas com 84 mL de água tipo I, e autoclavadas a 121 °C/1h.

O conteúdo autoclavado foi filtrado a vácuo em cadinho de vidro sinterizado, previamente preparado com uma camada de aproximadamente 3 mm de espessura de fibra de óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), e secos em estufa a 105±2 °C e massa conhecida. Após a filtração, os cadinhos foram novamente secos em estufa a 105±2 °C até massa constante, e registrada a sua massa com o resíduo, a qual foi usada para calcular a porcentagem de lignina insolúvel.

O filtrado foi recuperado para determinação dos teores de lignina solúvel (LS) e carboidratos estruturais. A lignina solúvel foi medida por espectrofotômetro UV-vis (UV-2550, Shimadzu®) a 215 e 280 nm, diluída na

proporção 1:5 (extrato:água destilada) (Equação 1).

$$\%LS = \frac{(4,53 \times |215|) - (|280| \times 100)}{300 \times 0,3} \quad \text{Equação 1}$$

Para determinar os carboidratos estruturais, 20 mL do filtrado foram tratados com carbonato de cálcio para correção do pH entre 5 e 6 e, em seguida, filtradas em filtro de seringa e transferidas para *vials* de 2 mL. Posteriormente, os *vials* analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A análise por CLAE foi realizada em um sistema Shimadzu Prominence equipado com detector de índice de refração (RID-20A). Os carboidratos foram separados em uma coluna Rezex RPM Monossacarídeo Pb<sup>+2</sup> (8%) (100 mm × 7,8 mm, tamanho de partícula de 8 µm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Uma coluna guarda de mesmo material foi usada antes da coluna cromatográfica. Água tipo I foi usada como a fase móvel com uma taxa de fluxo de 0,8 ml min<sup>-1</sup> e a temperatura do forno da coluna foi mantida em 80 °C. O volume de injeção da amostra foi de 10 µL.

As concentrações obtidas por CLAE são medidas na forma de monômeros, porém, os carboidratos que constituem a amostra encontram-se ligados na forma de polissacarídeos. Portanto, os valores precisam ser relatados na forma polimérica. A união entre dois monômeros de forma a obter um polímero, ocorre com a perda de um próton e uma hidroxila, totalizando 18 g mol<sup>-1</sup> de massa perdida, ou seja, uma molécula de H<sub>2</sub>O. O fator de correção anidro para as hexoses é de 0,90 (162/180), já para as pentoses o valor é de 0,88 (132/150) (ROCHA et al., 2015).

As concentrações dos carboidratos nas amostras foram calculadas utilizando as Equações 2 e 3, conforme o procedimento NREL (SLUITER et al., 2008).

$$C_{x.corrigido} = C_{CLAE} \times \text{Correçãoanidro} \quad \text{Equação 2}$$

$$\%Carboidratos = \frac{C_{x.corrigido} \times V_f \times \frac{1g}{100mg}}{m} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

em que *m* é a massa da amostra em gramas sem extrativos, base massa seca,

$V_f$  é o volume do filtrado em mL e o subíndice  $x$  representa os diferentes carboidratos analisados.

## 2.5. Cinzas

Para a determinação das cinzas, foram utilizadas amostras de 1 g, em triplicatas, acondicionadas em cadinhos de porcelana, e colocadas em mufla por duas horas a 600 °C (CABRERA-BOSQUET et al., 2009).

## 2.6. Difração de raio-X

Experimentos de difração de raios-X (DRX) foram realizados em um equipamento da Shimadzu XRD-6000 com radiação  $Cu - K\alpha$  ( $\lambda = 1,5418\text{\AA}$ ), com ângulo de difração  $2\theta$  variando de 10 a 50°, passo de 0,02° e velocidade de varredura de 1° min<sup>-1</sup>. Todos os difratogramas foram tratados usando um filtro de transformada de Fourier com uma janela de 10 pontos, a fim de reduzir o ruído.

## 2.7. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear, foram realizadas em temperatura ambiente, em um espectrômetro Varian-Agilent 400 MHz, operando em um campo magnético de 9,4 T, o que equivale a uma frequência de ressonância de 100,52 MHz para núcleos de <sup>13</sup>C. Foi utilizada uma sonda de tripla ressonância, apropriada para experimentos de alta resolução em sólidos, com rotores de zircônia de 4 mm de diâmetro. Os espectros foram obtidos após a transformada de Fourier do decaimento livre de indução (FID, do inglês *Free Induction Decay*), obtido por meio de experimentos de polarização cruzada (CP, do inglês *Cross Polarization*) com rotação em torno do ângulo mágico (MAS, do inglês *Magic Angle Spinning*). Foi utilizada uma frequência de MAS de 10 kHz. Após um tempo de repetição de 5 s, foi aplicado um pulso  $\pi/2$  (<sup>1</sup>H) de 3,6  $\mu$ s, seguido por um tempo de contato de 1 ms. O tempo de aquisição do FID foi de 40,96 ms, em uma janela espectral de 50 kHz, com acumulação de 700 transientes. Durante a aquisição, foi utilizado desacoplamento SPINAL.

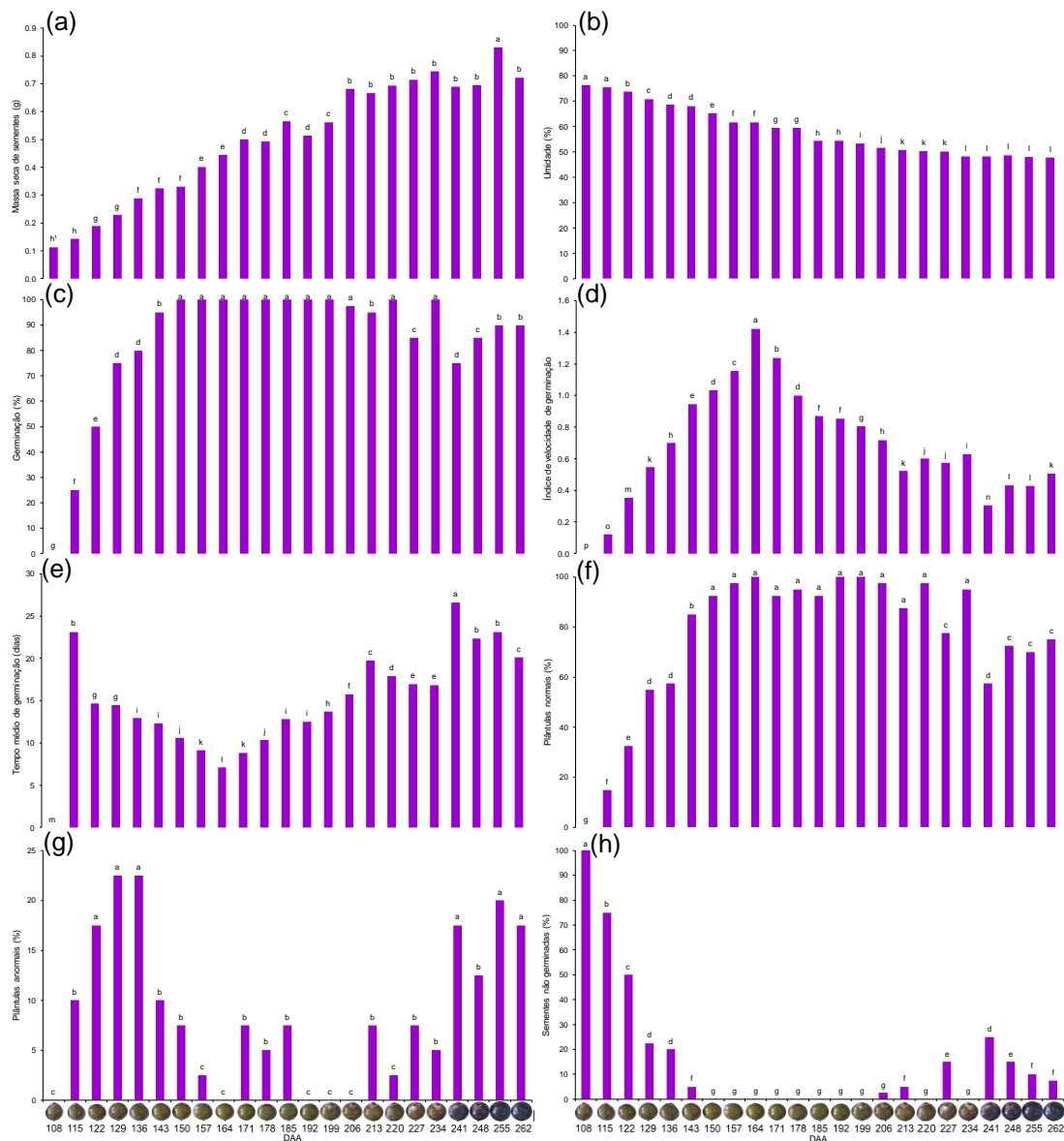
## 2.8. Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado com 23 tratamentos (estádios de maturação), quatro repetições com 10 sementes, para as análises biométrica, germinação *in vitro* e vigor, e triplicatas para as análises físico-químicas. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de agrupamento de média Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2020).

## 3 RESULTADOS

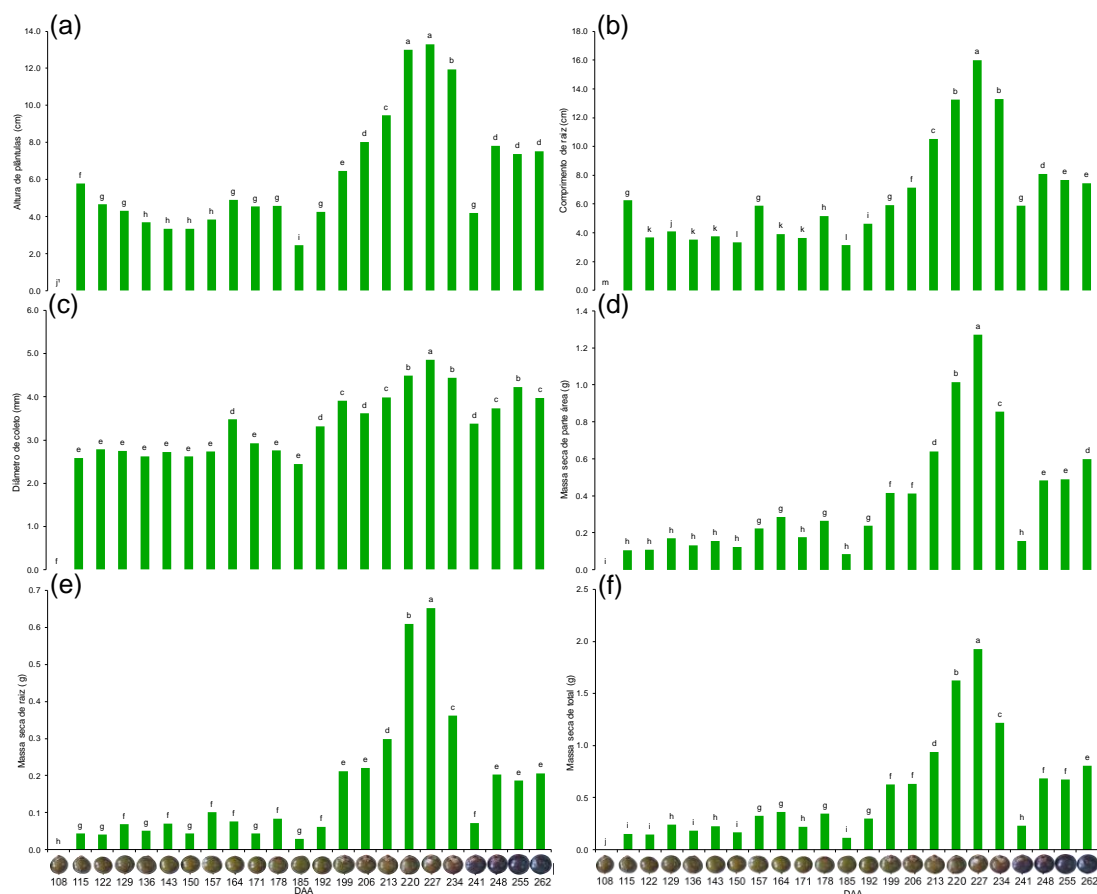
O crescimento das sementes de *E. edulis* ocorreu linearmente até atingir a máxima massa seca ( $0,83 \text{ g semente}^{-1}$ ) aos 255 DAA, enquanto a umidade decresce ao longo da maturação com máximo de 76,3 e 75,5% (108 e 115 DAA), e médias variando de 48,7-47,8% a partir de 234 DAA (Figuras 2a, b).

As sementes começam a germinar a partir de 115 DAA, e germinaram 100% a partir 150 DAA, não diferindo estatisticamente de 150 a 206, 220, 234 e 283 DAA, no entanto após 206 DAA a germinação começa a oscilar decaindo nos estádios finais (Figura 2c). As sementes obtiveram o máximo vigor aos 164 DAA (IVG = 1,42; TMG = 7 dias), com 100% de germinação e plântulas normais (Figura 2c-f). Nos estádios em que as sementes não germinaram 100%, ocorreram as maiores médias de plântulas anormais e sementes não germinadas (Figuras 2g, h).



**Figura 2.** Massa seca de sementes - g (a), umidade - % (b), germinação - % (c), índice de velocidade de germinação - IVG (d), tempo médio de germinação - TMG, dias (e), plântulas normais - % (f), plântulas anormais - % (g), sementes não germinadas - % (h), de sementes e plântulas de *E. edulis* no decorrer da maturação das sementes (DAA. Dias após a antese). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Barra de escala do fruto: 1 cm.

Em todas as variáveis analisadas nas plântulas, aquelas de sementes com 227 DAA obtiveram as maiores médias (Figura 3), diferindo-se das demais, a exceção da altura de plântulas que não diferiu das plântulas originadas de sementes com 220 DAA (Figura 3a).



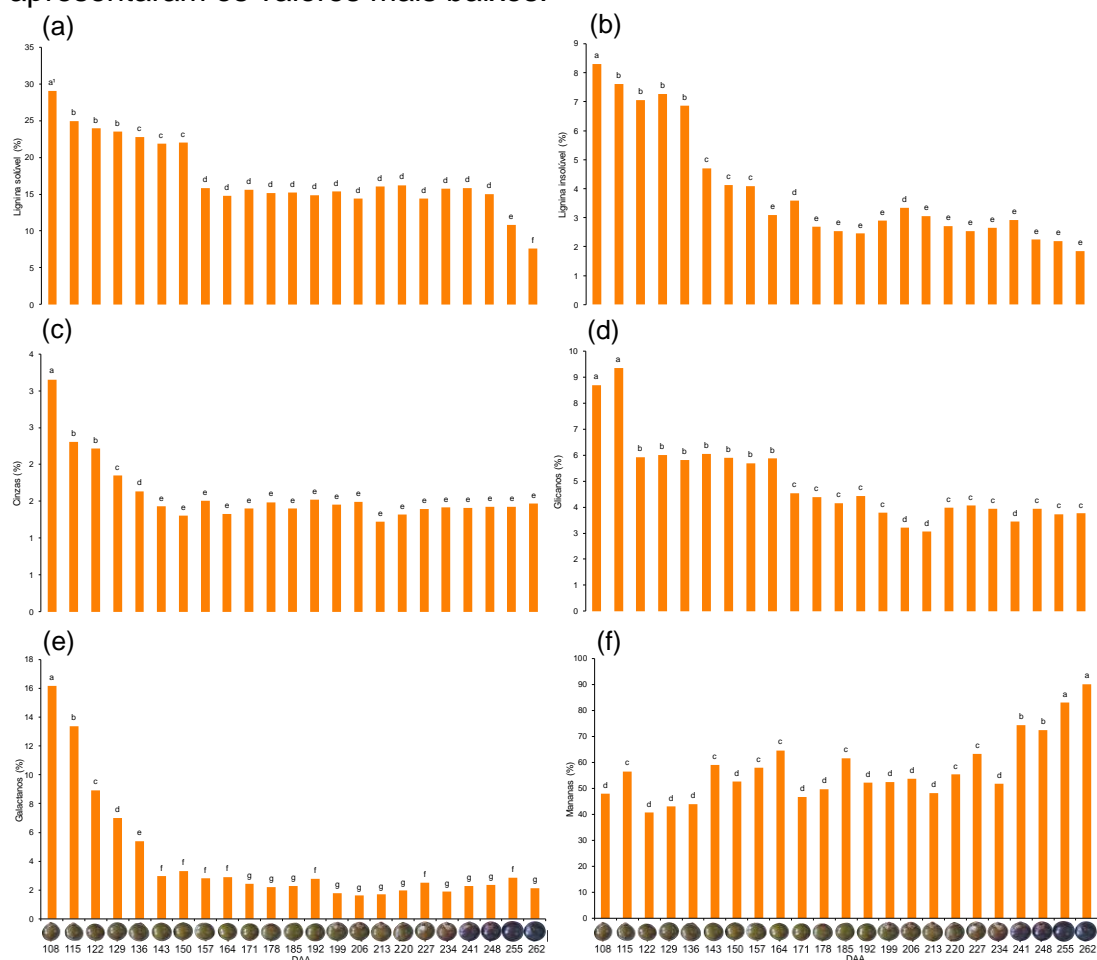
**Figura 3.** Altura de plântulas - cm (a), comprimento de raiz - cm (b), diâmetro do coleto - mm (c), massa seca de parte aérea - g (d), massa seca de raízes - g (e), massa seca total - g (f) de plântulas de *E. edulis* no decorrer da maturação das sementes (DAA. Dias após a antese). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Barra de escala do fruto: 1 cm.

Os carboidratos xilose e arabinose não foram detectados em nenhuma das amostras. Observou-se uma diminuição nos teores de lignina solúvel, lignina insolúvel, glicanos e galactanos com o avanço do estágio de maturação (Figuras 4a-e). Por outro lado, o teor de mananas aumenta com o aumento do estágio de maturação, passando de 47% com 108 DAA para 90% com 262 DAA (Figura 4f). O teor de cinzas diminuiu de 3,15% no primeiro estágio (108 DAA) para 1,63% no quinto estágio (136 DAA). A partir do sexto estágio (142 DAA), os valores apresentaram variação na faixa entre 1,40-1,57%.

O teor de mananas é superior aos demais carboidratos em todos os estádios de maturação. O teor de galactanos é superior ao teor de glicanos até o terceiro estágio (136 DAA). A partir de 142 DAA o teor de galactanos permanece quase constante até aos 162 DAA, com variação na faixa de 1,63-



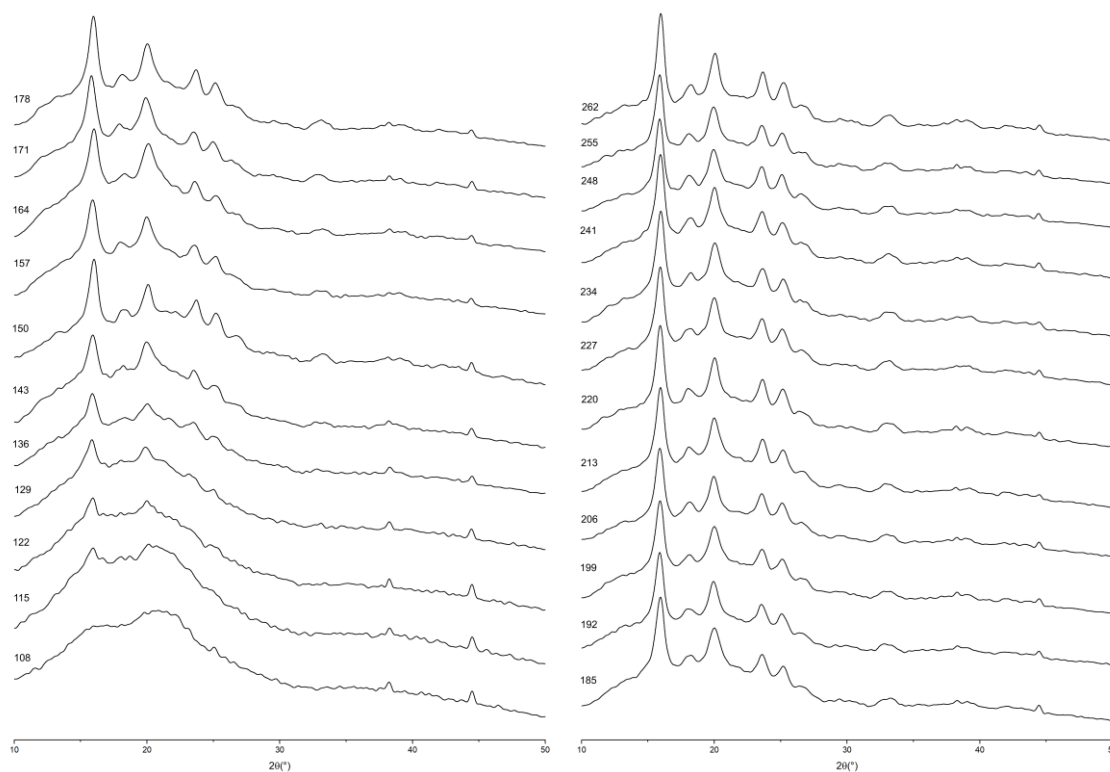
3,32%. O teor de glicanos teve pouca variação entre os estádios, apresentando valores na faixa entre 9,35-3,07%, sendo que os estádios mais avançados apresentaram os valores mais baixos.



**Figura 4.** Lignina solúvel - % (a), lignina insolúvel - % (b), cinzas - % (c), glicanos - % (d), galactanos - % (e), mananas - % (f) do endosperma de sementes de *E. edulis* no decorrer da maturação das sementes (DAA. Dias após a antese). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Barra de escala do fruto: 1 cm.

Houve evolução da cristalinidade das sementes de *E. edulis* no decorrer de sua maturação (Figura 5). É possível observar que aos 108 DAA a cristalinidade é amorfa, ou seja, não possui picos estreitos que são característicos de amostras cristalinas ou semicristalinas. Contudo, conforme avança o processo de maturação da semente, a cristalinidade também aumenta, o crescimento de picos mais estreitos começa a ser observado aos 115 DAA, ficando mais evidentes a partir de 143 DAA. Analisando, qualitativamente, os difratogramas nota-se que a cristalinidade praticamente não se altera entre 185 a 262 DAA, pois a relação entre os picos e a largura dos mesmos não se

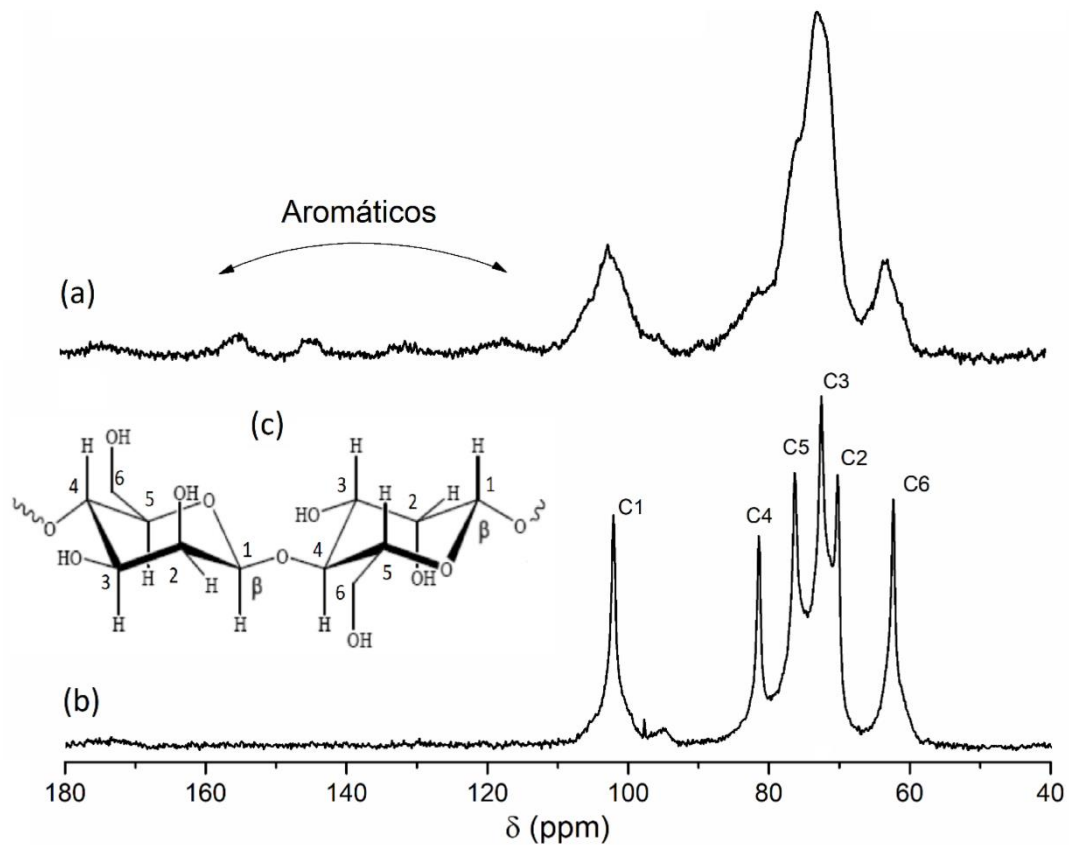
modificam, apresentando um padrão de difração típico da manana I com cinco picos  $2\theta$  proeminentes em  $15^\circ$ ,  $18^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $23^\circ$  e  $25^\circ$ , associados aos planos de difração 110, 111, 200, 210 e 211, respectivamente.



**Figura 5.** Difratoogramas de raios-X registrados para as amostras do endosperma de sementes de *E. edulis* no decorrer da maturação das sementes, a partir de 108 até 262 DAA, em intervalos de sete dias, totalizando 23 estádios.

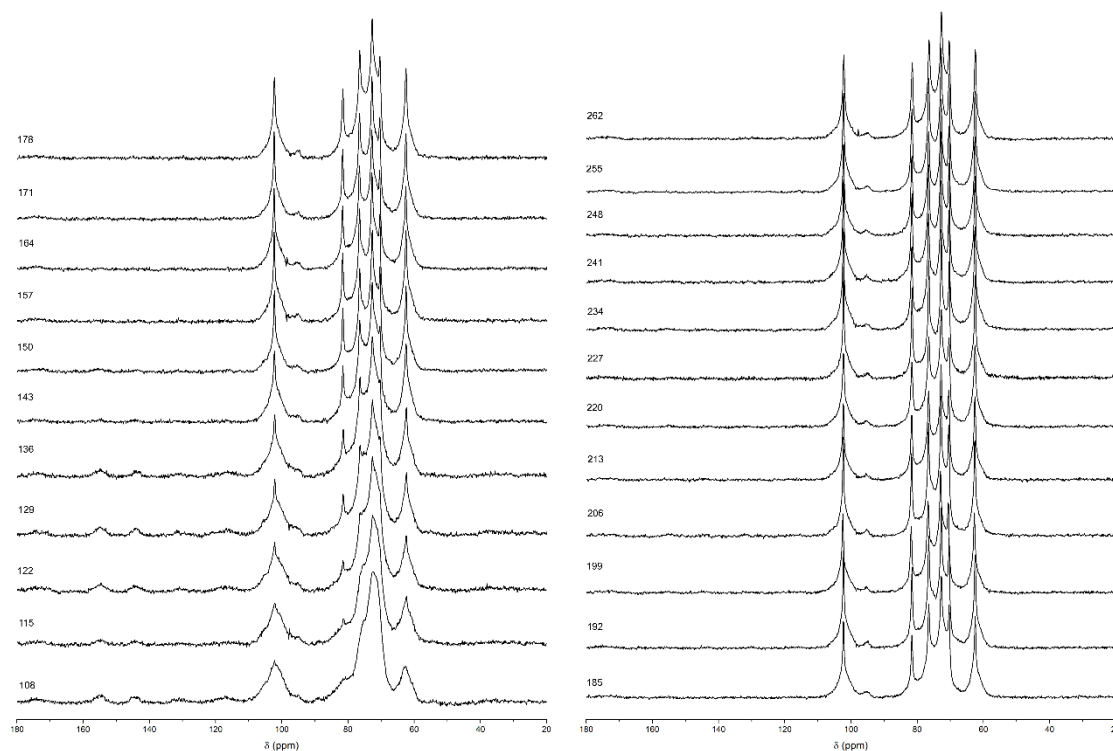
Por meio dos experimentos de RMN também foi possível observar modificações espectrais, na posição dos picos e na forma de linha dos sinais, que indicam maior grau de cristalinidade das amostras para maiores valores de DAA. Na Figura 6, podem ser observados os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS de 108 e 262 DAA. No espectro da amostra com 108 DAA é possível observar a presença de sinais aromáticos entre 10 e 160 ppm que podem ser associados a presença de lignina nesta amostra, e sinais entre 60 e 110 ppm que são decorrentes dos carboidratos presentes. Para a amostra com 262 DAA, não são mais observados sinais aromáticos relativos à lignina e os sinais relativos aos carboidratos apresentam-se mais estreitos (o que indica maior cristalinidade) e com características (número de picos, posição e forma de linhas) relativas à estrutura da manana do tipo I, formada por cadeias lineares de  $\beta(1\rightarrow4)\text{-D-}$

manose.



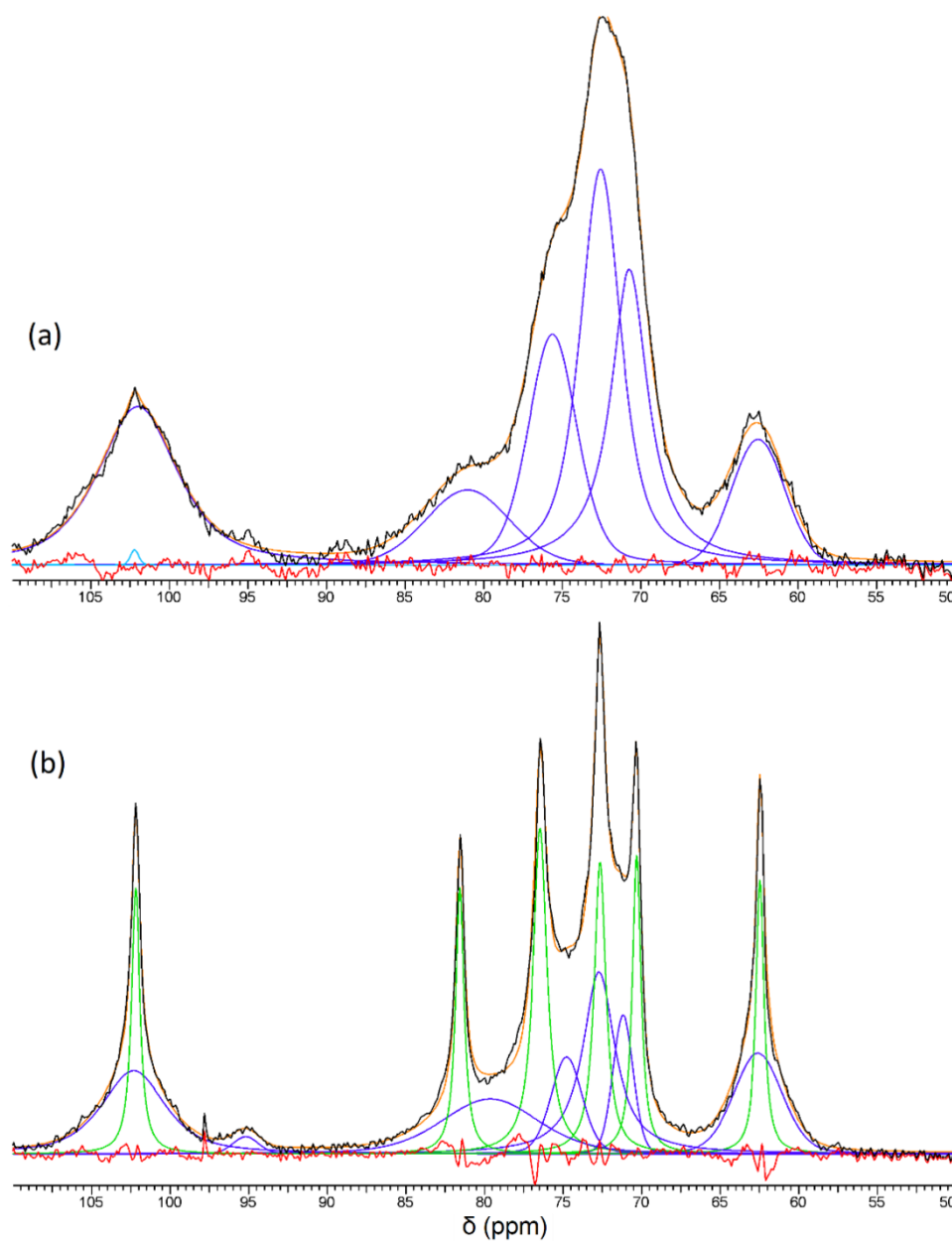
**Figura 6.** Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS das amostras do endosperma de sementes de *E. edulis* com 108 e 262 DAA, em (a) e (b), respectivamente. Os índices C1 a C6 indicam os sinais característicos dos seis átomos de carbono, quimicamente distintos, presentes na estrutura da manana (c). Adaptada de Freitas (2010).

Na Figura 7, são comparados os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS obtidos para todos os estádios de maturação das sementes, e pode-se observar de forma análoga aos resultados de DRX, que a partir da amostra de 115 DAA há um crescimento de sinais mais estreitos que se tornam cada vez mais evidentes com o processo de maturação das sementes.



**Figura 7.** Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS das amostras do endosperma de sementes de *E. edulis* no decorrer da maturação das sementes, a partir de 108 até 262 dias após a antese (DAA), em intervalos de sete dias, totalizando 23 estádios.

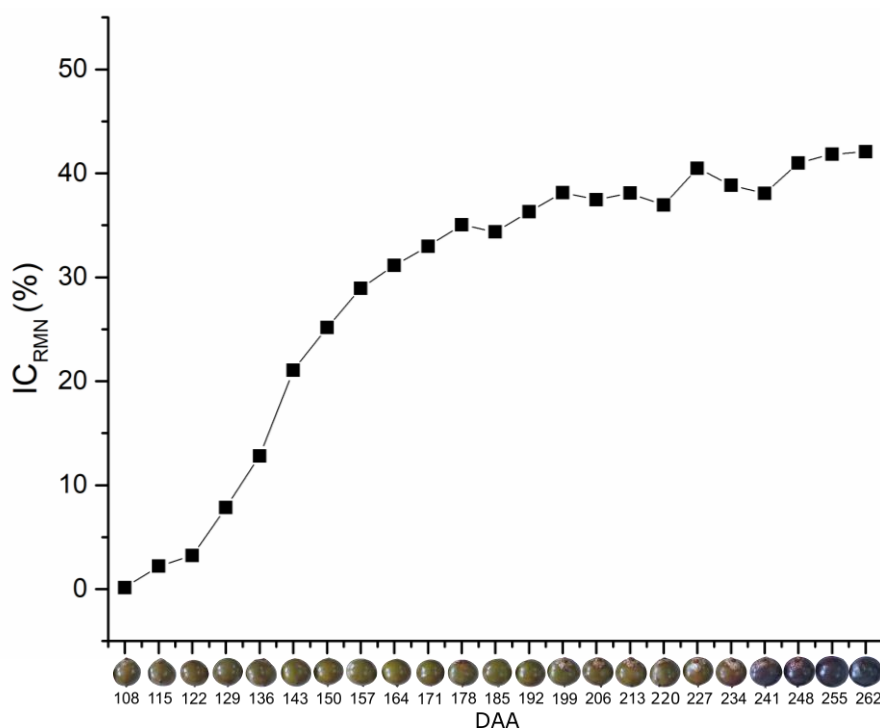
Com o intuito de se avaliar o grau de cristalinidade das amostras estudadas, os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS foram deconvoluídos, a fim de se separar a contribuição dos sinais mais estreitos associados a estruturas com maior ordenamento estrutural. Para a deconvolução do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS da amostra com 108 DAA, foi utilizado um modelo com seis linhas com largura a meia altura de 288 a 631 Hz, como apresentado na Figura 8a. Com a observação do surgimento de sinais mais estreitos, foram inseridos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS das demais amostras, outras seis linhas mais estreitas que as observadas na amostra com 108 DAA, relativas à contribuição da estrutura cristalina da manana. Na Figura 8b, é apresentado o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS das amostras com 262 DAA, em que se pode observar a presença de seis picos mais estreitos, com largura a meia altura de 56 a 106 Hz.



**Figura 8.** Deconvolução dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS das amostras do endosperma de sementes de *E. edulis* com 108 (a) e 262 dias após a antese - DAA (b). A linha laranja é a soma dos sinais em roxo (mais largos) e verde (mais estreitos). A linha vermelha indica a diferença entre a linha laranja e o espectro experimental em preto.

A partir do modelo utilizado para deconvolução dos espectros de RMN, foi possível calcular o índice de cristalinidade ( $\text{IC}_{\text{RMN}}$ ) das amostras obtidas em diferentes fases de maturação, por meio da razão entre a soma das áreas dos sinais mais estreitos e a área total do espectro. Como pode ser visto na Figura 9, há um aumento rápido do  $\text{IC}_{\text{RMN}}$  durante as primeiras semanas de maturação, principalmente entre 129 e 143 DAA, enquanto a partir de 185 DAA o

crescimento no  $IC_{RMN}$  fica bem mais lento.



**Figura 9.** Índice de cristalinidade obtido por RMN, das amostras do endosperma de sementes de *E. edulis* no decorrer da maturação das sementes, a partir de 108 até 262 dias após a antese - DAA.

#### 4 DISCUSSÃO

Em sementes, a maturidade fisiológica corresponde aos máximos no teor de massa seca, na germinação e no vigor. Assim, o máximo conteúdo de massa seca das sementes de *E. edulis* ocorreu aos 255 DAA (8,5 meses). Entretanto, considerando a germinação *in vitro* dessa espécie, verificou-se a máxima germinação, vigor e formação de plântulas normais aos 164 DAA (5,4 meses). Portanto, recomenda-se nesta data, a colheita das sementes e imediata semeadura *in vitro*. Baptista (2022) verificou que sementes imaturas *in vitro* proporcionam plântulas mais vigorosas em relação às oriundas do embrião zigótico isolado; isso porque as reservas presentes no cotilédone/haustório são mínimas, e o armazenamento das reservas de *E. edulis* é predominante no endosperma. E que, apenas o uso do ágar é uma alternativa para a germinação de sementes de *E. edulis in vitro*, menos onerosa, com menor contaminação, alta sobrevivência *ex vitro* e maior crescimento de parte aérea e sistema radicular.

A composição de açúcares do presente trabalho foi consistente com os resultados apresentados por De Lima et al. (2021), que encontraram 76% de manose, 6% de glicose, 2% de galactose, 0,6% de arabinose e 0,8% de xilose para sementes de *Euterpe oleracea*. Porém, estes autores utilizaram a semente inteira para a análise dos carboidratos e utilizaram somente frutos maduros, e comparado somente ao último estágio de maturação (264 DAA), os valores de mananas encontrados em *E. edulis* neste trabalho (90%), são superiores ao encontrado em *E. oleracea* por De Lima et al. (2021).

Os resultados encontrados neste trabalho também corroboram com a hipótese de Menezes Neto et al. (2010), que utilizaram microscopia eletrônica de transmissão e varredura para investigar a anatomia das sementes de *E. oleracea* Mart. durante o processo de germinação, e concluíram que a parede celular do endosperma é provavelmente composta por mananas.

Esse alto teor de manose nas sementes de *E. edulis* e *E. oleracea* é sustentado pelo fato de que as paredes secundárias das células do endosperma das sementes contêm pouca celulose, sendo constituído principalmente por polissacarídeos não celulósicos de armazenamento, como mananas, galactomananas, glucomananas, xiloglucanas e galactanas, e são digeridos durante a germinação (MONTEIRO et al., 2019).

Os resultados de DRX confirmam os dados obtidos para a composição química dessas sementes, observado na diminuição nos teores de lignina solúvel, lignina insolúvel (Figuras 4a-e) com o avanço do estágio de maturação e aumento no teor de mananas. A lignina, é uma molécula amorfa (ROSA et al., 2010), e está presente na fase inicial do processo de maturação (a Figura 6 mostra que o primeiro DRX é amorfo). Enquanto a manana é uma molécula semicristalina (YUI et al., 1997) e corresponde a 90% dos carboidratos presentes nas amostras obtidas com 262 DAA (Figura 4f).

Os espectros de RMN obtidos para as amostras em diferentes fases de maturação corroboram os resultados obtidos tanto para a composição dos açúcares, quanto para a evolução da cristalinidade observada por DRX. Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS semelhantes ao apresentado na Figura 6a, foram previamente reportados para amostras contendo uma relação galactose:manose de 21:79 (GIDLEY et al., 1979). No presente trabalho,

também foi observada a presença considerável de galactanos e glicanos nas primeiras fases de maturação das sementes, indicando que as formas de linha mais largas observadas tanto por DRX, quanto por RMN, são decorrentes de uma estrutura com baixo ordenamento estrutural devido a presença de lignina e ao alto teor de galactanos ligados as cadeias de manana (MELTON et al., 2009).

Vários trabalhos têm reportado a presença majoritária de manana no endosperma de diferentes sementes (SILVA et al., 2014; DIAS et al., 2020), sendo possível observar a presença de dois tipos cristalográficos distintos, dos quais a manana I tem sido mais frequentemente observada e apresenta maior cristalinidade do que a manana II (HEUX et al., 2005; PETKOWICZ et al., 2007). Com o decorrer do processo de maturação, observou-se que os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS do endosperma das sementes de *E. edulis* assumem uma forma semelhante ao reportado na literatura para espectros do endosperma de outras sementes, majoritariamente constituídos de cadeias lineares de (1 $\rightarrow$ 4) -  $\beta$ -D-mananas do tipo I (JARVIS, 1989; MARCHESSAULT et al., 1990; DAUD et al., 1992).

Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  medidos com diferentes valores de T1 (constante de tempo de relaxação transversal) possibilita observar separadamente a ocorrência de linhas mais estreitas relacionadas a estrutura cristalina da manana I e a ocorrência de linhas mais largas associadas a manana e outros açúcares em uma estrutura menos cristalina (MARCHESSAULT et al., 1990). Por meio da deconvolução dos espectros, também foi possível no presente trabalho, separar a contribuição das estruturas em maior e menor grau de ordenamento estrutural e assim acompanhar o crescimento do índice de cristalinidade com a maturação das sementes. O crescimento rápido do  $\text{IC}_{\text{RMN}}$  nas primeiras semanas de maturação pode ser relacionado com as quedas nos teores de lignina, glicanos e galactanos, que ocorrem aproximadamente no mesmo período. Já o crescimento mais lento do  $\text{IC}_{\text{RMN}}$  para maiores valores de DAA pode ser relacionado ao gradativo crescimento no grau de ordenamento estrutural da manose I.



## 5 CONCLUSÕES

A máxima germinação, vigor e formação de plântulas normais aos 164 DAA, gera um ganho de 98 dias em relação ao uso de sementes no último estágio (262 DAA), portanto, recomenda-se nesta data, a colheita das sementes e imediata semeadura *in vitro*.

As análises de lignina, carboidratos, DRX e RMN indicam que nos primeiros estádios de maturação, o endosperma das sementes de *E. edulis* é composto por lignina, glicanos, galactanos e mananas que formam uma estrutura com baixo ordenamento estrutural. Com a evolução da maturação das sementes, observou-se redução nos teores de lignina, glicanos e galactanos, e aumento no teor de mananas, o que permitiu a formação da estrutura cristalina da manana I. Dessa forma, o presente estudo preenche uma lacuna científica, expandindo o a fronteira do conhecimento em relação a formação das sementes de *E. edulis*.

## 6 REFERÊNCIAS

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. What kind of seed dormancy might palms have? **Seed Science Research**, v. 24, p. 17-22, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258513000342>

BAPTISTA, J. O. **Germinação de sementes *in vitro* e aclimatização *ex vitro* de *Euterpe edulis* Martius**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo. Espírito Santo, 41f., 2022.

BATISTA-SILVA, W.; NASCIMENTO, V. L.; MEDEIROS, D. B.; NUNES-NESE, A.; RIBEIRO, D. M.; ZSÖGÖN, A.; ARAÚJO, W. L. Modifications in organic acid profiles during fruit development and ripening: correlation or causation? **Frontiers Plant Science**, v. 9, p. 1-20, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01689>

BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 142-147, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0406-0>

BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 4, p. 2128-2133, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0406-0>

BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J.; HELLERM, M. G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC – ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 363-369, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.035>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. MAPA/DAS/ACS. 395p. 2009.

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017-1023, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>

BURATTO, R. T.; COCERO, M. J.; MARTÍN, Á. Characterization of industrial açai pulp residues and valorization by microwave-assisted extraction. **Chemical Engineering and Processing – Process Intensification**, v. 160, p. 108269, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108269>

CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe dulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, p. 134-142, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v32n2847>

DAUD, M. J.; JARVIS, M. C. Mannan of oil palm kernel. **Phytochemistry**, v. 31, p. 463-464, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)90017-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)90017-K)

DE LIMA, A. C. P.; BASTOS, D. L. R.; CAMARENA, M. A.; BON, E. P. S.; CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, R. S. S.; GUTARRA, M. L. E. Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açai (*Euterpe oleracea*) processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 925-935, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00551-w>

DIAS, G. P.; SANTOS, H. C. M.; RIBEIRO, L. M.; NUNES, Y. R. F.; BRAGANÇA, G. P. P.; ISAIAS, R. M. S.; SIMÕES, M. O. M. Reserve mobilization dynamics and degradation pattern of mannan-rich cell walls in the recalcitrant seed of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 445-460, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.031>

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960. DOI: <https://doi.org/10.5558/tfc36010-1>

FANTINIA, A. C.; GURIES, R. P. Forest structure and productivity of palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) in the Brazilian Mata Atlântica. **Forest Ecology and Management**, v. 242, n. 2-3, p. 185-194, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.01.005>

FREITAS, D. M. **Extração de polissacarídeos do caroço de açai (*Euterpe oleracea*)**. Dissertação de mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 67f, 2010.

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; PEREIRA, C.; ABREU, R. M. V.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BRACHT, 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.037>

GIDLEY, M. J.; MCARTHUR, A. J.; UNDERWOOD, D. R. <sup>13</sup>C NMR characterization of molecular structures in powders, hydrates and gels of galactomannans and glucomannans. **Food Hydrocolloids**, v. 5, p. 129-140, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80298-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80298-1)

HEUX, L.; HAGGLUND, P.; PUTAUX, J. L.; CHANZY, H. Structural aspects in semicrystalline samples of the mannan II family. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 324-332, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm0495349>

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>

JARVIS, M.C. The <sup>13</sup>C NMR spectrum of (1→4)-β-D-mannans in intact endosperm tissue of the date (*Phoenix dactylifera*). **Carbohydrate Research**, v. 197, p. 276-280, 1990.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.

LI, R.; CHEN, L. J.; WU, Y. P.; ZHANG, R.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; HU, X. Effects of cultivar and maternal environment on seed quality in *Vicia sativa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01411>

DE LIMA, A. C. P.; BASTOS, D. L. R.; CAMARENA, M. A.; BON, E. P. S.; CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, R. S. S., GUTARRA, M. L. E. Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açai (*Euterpe oleracea*) processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 3, p. 925-935, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00551-w>

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MARCHESSAULT, R. H.; TAYLOR, M. G.; WINTER, W. T. <sup>13</sup>C CP/MAS NMR spectra of poly-β-D-(1→4) mannose: mannan. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 68, p. 1192-1195, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1139/v90-184>

MELTON, L. D.; SMITH, B. G.; IBRAHIM, R.; SCHRODER, R. Mannans in

primary and secondary plant cell walls. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 39, p. 153-160, 2009.

MONTEIRO, A. F.; MIGUEZ, I. S.; SILVA, J. P. R. B.; SILVA, A. S'A. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47401-3>

MOURA, A. C. F.; RIBEIRO, L. M.; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y. R. F. Cytological and histochemical evaluations reveal roles of the cotyledonary petiole in the germination and seedling development of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Protoplasma**, v. 256, p. 1299-1316, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01375-1>

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

MENEZES NETO, M. A.; LOBATO, A. K. S.; ALVES, J. D.; GOULART, P. F. P.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Seed and seedling anatomy in *Euterpe oleraceae* Mart. during the germination process. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 8, n. 2, p. 1147-1152, 2010.

PANZA, V.; LÁINEZ, 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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00293.x>

PETKOWICZ, C. L. O.; SCHAEFER, S.; REICHER, F. The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 4, p. 659-664, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.002>

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

RIBEIRO, L. O.; PEREIRA, R. N. C.; TONON, R. V.; CABRAL, L. M. C.; SANTIAGO, M. C. P. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. C.; MATTA, V. M.; FREITAS, S. P. Antioxidant compounds recovery from juçara residue by thermal assisted extraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, p. 68-73, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0651-0>

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONCALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTIN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.003>

ROSA, M. F.; MEDEIROS, E. S.; MALMONGE, J. A.; GREGORSKI, K. S.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L. H. C.; GLENN, G.; ORTS, W. J.; IMAM, S. H. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate**

**Polymers**, v. 81, n. 1, p. 83-92, 2010. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.059>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; NEHRING, P.; GOIS, J. S. de; ALMEIDA, T. S. de; 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.006>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

SCHULZ, M.; BRUGNEROTTO, P.; SERAGLIO, S. K. T.; GONZAGA, L. V. BORGES, G. S.C.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Aliphatic organic acids and sugars in seven edible ripening stages of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103683, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103683>

SILVA, R. S.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y. R. F.; LOPES, P. S. N. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*), the Swamp palm. **Flora**, v. 209, p. 674-685, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2014.08.012>

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of extractives in biomass**. NREL/TP-510-42619, 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. NREL/TP-510-42618, 2011.

YUI, T.; MIYAWAKI, K.; YADA, M.; OGAWA, K. An evaluation of crystal structure of mannan I by X-ray powder diffraction and molecular mechanics studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, n. 3, p. 243-250, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(97\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)00069-X)

## CAPÍTULO IV

### **Sistema de defesa antioxidativo na maturação e qualidade fisiológica de sementes *in vitro* de *Euterpe edulis* Martius**

**Resumo:** A palmeira *Euterpe edulis* Martius, é nativa da Mata Atlântica e produz um fruto com composição nutricional e potencial antioxidante superior a *Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*. No entanto, não há estudos quanto ao sistema de defesa antioxidante das sementes. Assim, o propósito desse estudo foi analisar o sistema de defesa antioxidativo na maturação de sementes associado a germinação *in vitro* e a qualidade de plântulas geradas de *E. edulis*. Para isso, foram colhidas sementes em 29 estádios de maturação (94-290 dias após a antese - DAA), e analisados quanto a germinação, vigor, formação de plântulas e o sistema de defesa antioxidativo das sementes (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, peróxido de oxigênio, peroxidação lipídica, e antocianinas), em delineamento inteiramente casualizado. A massa seca do fruto e seu volume não diferem a partir de 241 DAA, enquanto a massa seca da semente, obteve média máxima aos 255 DAA, diminuindo após esse período, e umidade das sementes decresceu ao longo da maturação. Em todas as variáveis analisadas nas plântulas, as geradas de sementes com 227 DAA obtiveram as maiores médias. Com os resultados foi possível compreender tanto quanto a formação das sementes, quanto a do seu sistema de defesa antioxidativo, e determinar o melhor estágio para a germinação *in vitro* e a produção de mudas. As sementes obtiveram o máximo de germinação, vigor e plântulas normais aos 164 DAA, fruto ainda imaturo. E o sistema de defesa antioxidativo tem maiores atividades a partir de 269 DAA.

**Palavras-chave:** juçara, germinação, espécies reativas ao oxigênio, antioxidantes, enzimas.

**Abstract:** The *Euterpe edulis* Martius palm is native to the Atlantic Forest and produces a fruit with a nutritional composition and antioxidant potential superior to *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. However, there are no studies on the antioxidant defense system of seeds. Thus, the purpose of this study was to analyze the antioxidant defense system in seed maturation associated with *in vitro* germination and the quality of seedlings generated from *E. edulis*. For this, seeds were harvested at 29 maturation stages (94-290 days after anthesis - DAA), and analyzed for twinning, vigor, seedling formation, and the antioxidative defense system of the seeds (superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, oxygen peroxide, lipid peroxidation, and anthocyanins), in a completely randomized design. The dry mass of the fruit and its volume did not differ from 241 DAA, while the dry mass of the seed had a maximum average at 255 DAA, decreasing after this period, and seed moisture decreased during maturation. In all the variables analyzed in the seedlings, those generated from seeds with 227 DAA obtained the highest averages. With the results, it was possible to understand both the formation of seeds and their antioxidant defense system and to determine the best stage for *in vitro* germination and seedling production. The seeds obtained maximum germination, vigor, and normal seedlings at 164 DAA, with fruit, were still immature. And the antioxidant defense system has greater activities from 269 DAA.

**Keywords:** juçara, germination, reactive oxygen species, antioxidants, enzymes.

## 1 INTRODUÇÃO

A palmeira *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) é nativa da Mata Atlântica. Essa palmeira produz um fruto esférico roxo, com características comparáveis àqueles de *E. oleracea* Martius e *E. precatoria* Martius, mas com melhor composição nutricional e potencial antioxidante (SCHULZ et al., 2016). No entanto, a extração excessiva do palmito quase a extinguiu e, apesar de encontrar-se na categoria de vulnerável, ainda está passando por um processo de superexploração, principalmente fora das áreas de reserva e, conseqüentemente alterando a dinâmica de regeneração da Mata Atlântica (BRANCALION et al., 2012; MULER et al., 2014; SOUZA; PREVEDELLO, 2020).

O fruto vem ganhando destaque na alimentação humana, e é um enfoque importante para contornar a exploração ilegal do palmito. A polpa do fruto contém muitos micronutrientes essenciais para a homeostase do organismo humano, como potássio (K), ferro (Fe), zinco (Zn), fósforo (P), cobre (Cu), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). E macronutrientes, carboidratos, proteínas e lipídios, com alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, ácido oleico e menor teor de lipídios saturados (PUPIN et al., 2018; PEREIRA et al., 2022). Além de possuir um alto potencial antioxidante associado a compostos fenólicos, principalmente antocianinas e ácidos fenólicos (SCHULZ et al., 2016).

Durante o processo de maturação dos frutos ocorrem diversas alterações bioquímicas e metabólicas de compostos primários e secundários (BATISTA-SILVA et al., 2018). Nos estádios mais juvenis das sementes, o metabolismo é intenso, com elevada atividade respiratória e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou seja, alta redução de oxigênio que dá origem ao ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ao radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (EL-MAAROUF-BOUTEAU; BAILLY, 2008).

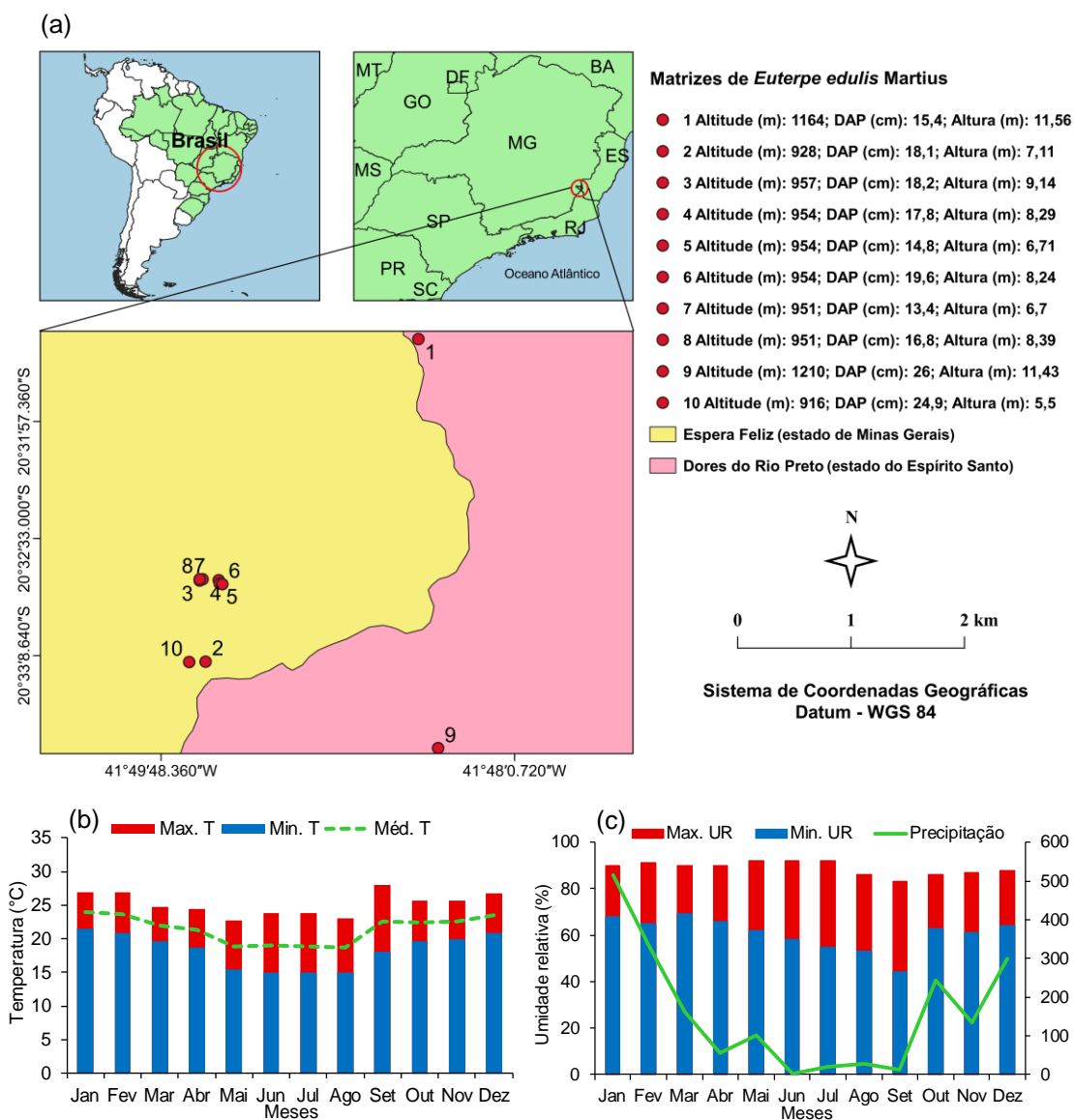
Já no final da fase de maturação, quando ocorre redução dos teores de água e do metabolismo das sementes, também pode ocorrer o aumento da produção das EROs, em consequência do início do processo de dessecação. E assim, a atividade antioxidante enzimática tende a reduzir-se, e outros mecanismos de proteção passam a ser mais importantes, como os antioxidantes não-enzimáticos (EL-MAAROUF-BOUTEAU; BAILLY, 2008), a exemplo, as antocianinas.



As EROs promovem a germinação de várias sementes, tanto dormentes quanto quiescentes, ocorrendo dentro de um intervalo oxidativo. Conseqüentemente, se os níveis de EROs estiverem acima desse intervalo, as sementes sofrem danos oxidativos, levando à deterioração e perda de germinação, e se abaixo, não ocorre a germinação (MITTLER, 2017; CEMBROWSKA-LECH, 2020). Esse equilíbrio é regulado por enzimas removedoras de EROs presentes nas células, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (POX). Portanto, a hipótese é que a produção dessas enzimas aumente no decorrer da maturação das sementes, pois atuam no mecanismo de defesa das células e favorecem a qualidade fisiológica das sementes, alinhado ao seu alto vigor e formação de plântulas normais. Logo, o propósito do estudo foi analisar o sistema de defesa antioxidativo na maturação de sementes associado a germinação *in vitro* e a qualidade de plântulas geradas de *Euterpe edulis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de *E. edulis* foram colhidos de 10 plantas matrizes localizada no distrito de Pedra Menina, nos municípios de Dores do Rio Preto - ES, e Espera Feliz – MG (Figura 1a). A temperatura máxima durante o período estudado foi de 28,0 °C em setembro e mínima de 14,9 °C em junho, com precipitação máxima de 514,4 mm em janeiro, e umidade relativa máxima de 92% em maio e junho (Figura 1b-a).



**Figura 1.** Coordenadas e características das plantas matrizes (a), temperaturas máxima (Max.T), média (Avg.T) e mínima (Min.T) (b), umidade relativa máxima (Max.RH), mínima (Min.RH) e precipitação (c) do início da floração ao final da colheita dos frutos na região onde está localizada a matriz de *E. edulis*, em 2020. Dados fornecidos pelo INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), Brazil. DAP. Diâmetro a altura do peito (1,30 m).

A colheita dos frutos foi iniciada aos 94 dias e estenderam-se até os 290 dias após a antese (DAA), em intervalos de sete dias, totalizando 29 estádios. Os frutos foram colhidos manualmente, e encaminhados ao Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), para avaliações referentes a umidade, germinação das sementes e crescimento inicial das plântulas.

## 2.1 Teor de água das sementes

Determinado utilizando-se quatro amostras com subamostras de cinco sementes para cada tratamento, pelo método de estufa (Adamo<sup>®</sup>) regulada a  $105 \pm 3$  °C por 24 h, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem.

## 2.2 Germinação e vigor das sementes *in vitro*

No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, após a limpeza dos frutos, foi retirado o tegumento, e em seguida, os mesmos foram imersos em solução de ácido ascórbico (Dinâmica<sup>®</sup>) à 2%, para impedir a oxidação fenólica dos tecidos vegetais.

Na câmara de fluxo laminar, as sementes de *E. edulis* foram imersas em álcool etílico à 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (Candura<sup>®</sup>) a 2,5% por 10 minutos e em solução de amoxicilina (Germed<sup>®</sup>) a 3 g L<sup>-1</sup> por 10 minutos, realizando-se a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada após o uso de cada agente desinfestante. Após desinfestação, as sementes foram dispostas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma<sup>®</sup>), suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) (Synth<sup>®</sup>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica<sup>®</sup>), 0,1 g L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma<sup>®</sup>), e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Kasvi<sup>®</sup>). O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  com hidróxido de potássio (KOH) (Alphatec<sup>®</sup>) e/ou ácido clorídrico (HCl) (Vetec<sup>®</sup>) a 1,0 N, antes da autoclavagem.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 8/16 horas luz/escuro, intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  até a obtenção de plântulas. Durante esse período, foram obtidos os dados de porcentagem de germinação (%) (BRASIL, 2009), frequência de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), e tempo médio de germinação (TMG, d) (LABOURIAU, 1983). E após 150 dias, plântulas normais e anormais (%), altura das plântulas (cm), diâmetro do coleto (mm), comprimento de raízes (cm), número de raízes, massa seca da parte aérea, raízes e total de plântulas (g), e índice de qualidade de Dickson (DICKSON et al., 1960).

## 2.3 Análises bioquímicas

As sementes para as análises bioquímicas foram armazenadas em um ultrafreezer (Thermo Scientific®) com temperatura de -80 °C.

### 2.3.1 Peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica nas sementes

Para a extração, 200 mg de sementes foram trituradas (IKA®, modelo A11BS32) com nitrogênio líquido, homogeneizados em 1500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m v<sup>-1</sup>) (Sigma®), e centrifugados a 10.000 rpm 15 min<sup>-1</sup>, a 4 °C.

Para a quantificação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), alíquotas de 45 µL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação composto por 40 µL tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 90 µL iodeto de potássio 1 M (Vetec®). A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada pela absorbância das amostras a 390 nm, com base na curva-padrão (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

Já a quantificação da peroxidação lipídica foi por meio da determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Em um tubo (150 x 10 mm), foram adicionados 200 µL do extrato e 550 µL do meio de reação 0,5% (p v<sup>-1</sup>) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p v<sup>-1</sup>) de TCA, incubando-se, em seguida, a 95 °C, por 30 min. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras determinadas em espectrofotômetro de Elisa, a 535 nm e 600 nm.

### 2.3.2 Enzimas do sistema antioxidante nas sementes

Para a extração das enzimas, 200 mg de sementes foram trituradas (IKA®, modelo A11BS32) com nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1500 µL tampão de extração: 375 µL de fosfato de potássio 100 mM (Vetec®), pH 7,8, 15 µL ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM (Calbiochem®), 75 µL ácido ascórbico 10 mM (Sigma®), e 1035 µL de água destilada. Em seguida, foram centrifugados a 13000 rpm, por 10 min, a 4 °C (Vision®, modelo VS-15000CFNII), coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (BIEMELT et

al., 1998).

A atividade da SOD foi analisada conforme proposto por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de água destilada (branco) nos dois primeiros poços da microplaca de leitura e nos demais 5  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático em duplicata. Foi adicionado 190  $\mu\text{L}$  da solução de tampão, composta por: 100  $\mu\text{L}$  fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8) (Vetec<sup>®</sup>), 43  $\mu\text{L}$  metionina 14 mM + EDTA 0,1  $\mu\text{M}$  (Calbiochem<sup>®</sup>), 15  $\mu\text{L}$  de azul de nitrotetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$  (Sigma<sup>®</sup>), 2  $\mu\text{L}$  riboflavina 2  $\mu\text{M}$  (Sigma<sup>®</sup>) e 30  $\mu\text{L}$  de água destilada. O meio de reação mais a amostra foram iluminados com lâmpada fluorescente de 15 W por 7 minutos. As leituras de absorvância foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro Elisa (BIOTEK-Eon<sup>®</sup>).

A atividade da CAT foi obtida segundo Havir e McHale (1987). Alíquotas de 8  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático dos estádios de 1-25, e 5  $\mu\text{L}$  dos estádios 26-29, foram adicionados a 180  $\mu\text{L}$  do meio de reação, contendo 91 (1-25) e 94  $\mu\text{L}$  (26-29) de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) (Vetec<sup>®</sup>), 9  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 12,5 mM (Exôdo Científica<sup>®</sup>) e 72  $\mu\text{L}$  de água destilada. A atividade dessa enzima foi determinada em espectrofotômetro Elisa, a 240 nm, a cada 15 s, por 3 min.

A atividade da APX foi obtida de acordo com Nakano e Asada (1981). Foi utilizado 5  $\mu\text{L}$  de extrato adicionado de 180  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação, composto por 94  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 9  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM, 9  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2 mM e 63  $\mu\text{L}$  de água destilada. A atividade dessa enzima foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato, a cada 15 s, durante 3 min, a 290 nm em espectrofotômetro Elisa.

### 2.3.3 Antocianinas

A extração das antocianinas das sementes, seguiu o método descrito por Francis (1982), em que foram pesadas 1,0 g de semente triturada e adicionou-se 30 mL da solução extratora etanol 95% - HCl 1.5 N na proporção 85:15, homogeneizando por 2 min. Em seguida, completou-se para 50 mL com a solução extratora e, a mistura foi armazenada na ausência de luz, a 4 °C, por 16 horas. Após filtragem, as leituras foram feitas a 535 nm, e os resultados

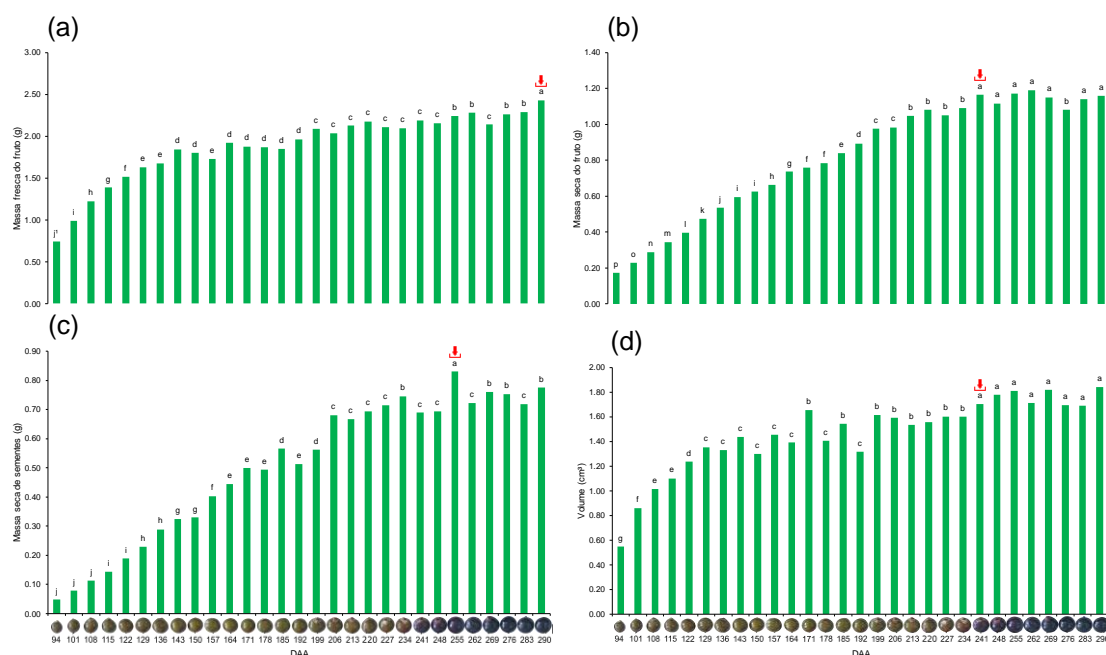
expressos em mg 100 g<sup>-1</sup> calculados por meio da equação: absorvância x fator de diluição/98,2.

## 2.4 Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado com 29 tratamentos (estádios de maturação), quatro repetições com 10 sementes, para as análises biométricas e germinação *in vitro*, e três repetições em duplicatas para as análises bioquímicas. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de agrupamento de médias de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), correlação de Pearson, e análise dos componentes principais. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio de rotinas computacionais no software R, versão 4.1.2 (R CORE TEAM, 2020). A produção de gráficos e figuras foi com o auxílio dos seguintes pacotes: readxl, factoextra, factoMineR, tidyverse, ggcorrplot, psych, ExpDes.pt.

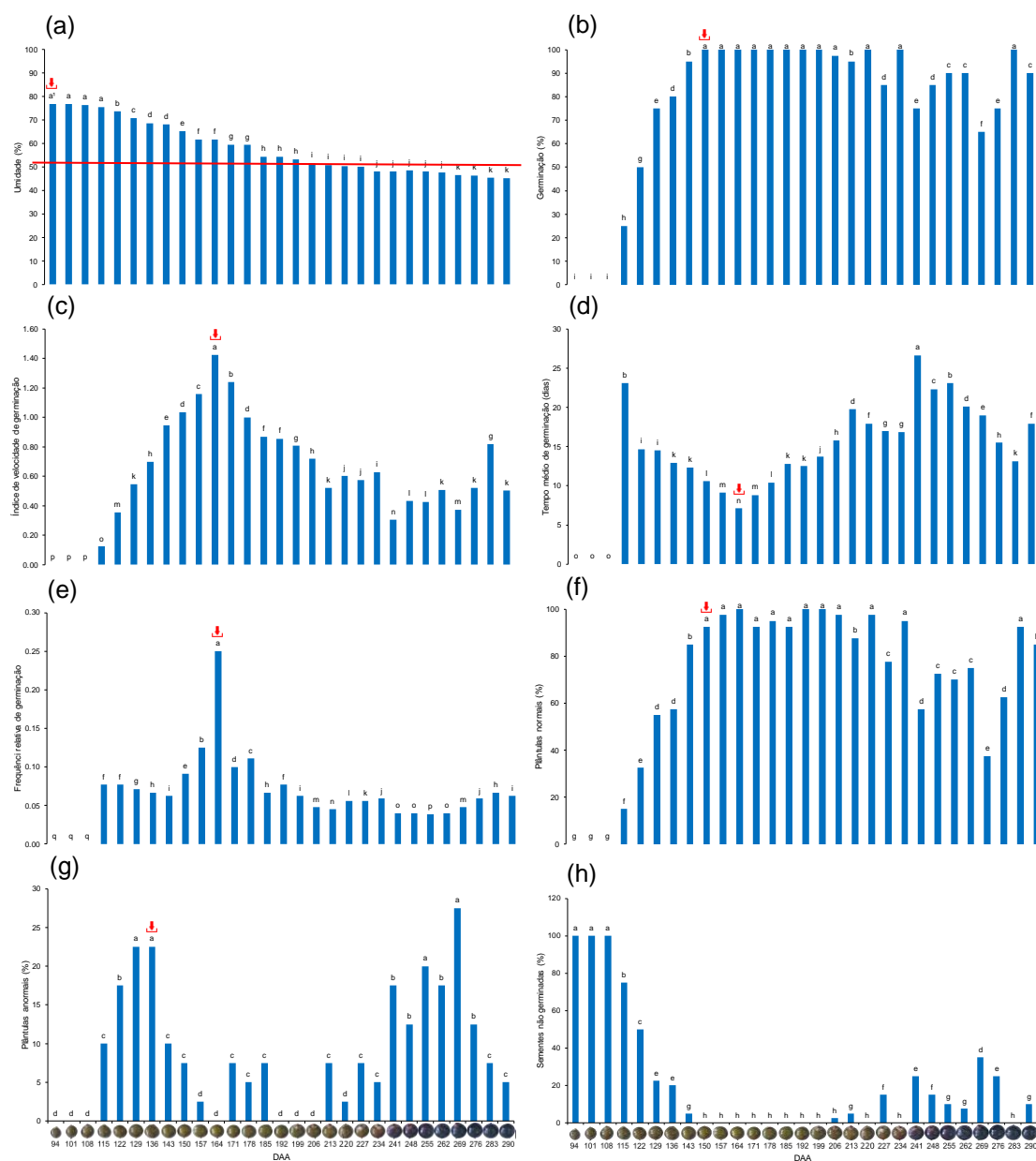
## 3 RESULTADOS

Os frutos de *E. edulis* levaram 290 DAA até desprender-se da planta matriz, amadurecendo sua polpa a partir de 241 DAA. As características morfológicas do fruto foram crescentes na maioria das variáveis até os 290 DAA, diferindo-se estatisticamente (Figura 2). A massa seca do fruto e seu volume não diferiram estatisticamente a partir de 241 DAA (estádios do fruto maduro), compondo o mesmo grupo estatístico (Figuras 2b, d). Enquanto a massa seca da semente, obteve média máxima aos 255 DAA (0,83 g), diminuindo após esse período (Figura 2c).



**Figura 2.** Massa fresca do fruto - g (a), massa seca do fruto - g (b), massa seca da semente - g (c), volume - cm<sup>3</sup> (d) de sementes de *E. edulis* dias após a antese (DAA). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Barra de escala do fruto: 1 cm.

A umidade das sementes decresceu ao longo da maturação de 77 a 45% (94-290 DAA) (Figura 3a). As sementes não germinam até 108 DAA, e germinaram 100% a partir 150 DAA, não diferindo estatisticamente de 150 a 206, e 220, 234 e 283 DAA, no entanto após 206 DAA a germinação começa a oscilar (Figura 3b). As sementes obtiveram o máximo vigor aos 164 DAA (IVG = 1,42; TMG = 7 dias e FrG = 0,25), com 100% de germinação e plântulas normais (Figuras 3b-f). Geralmente, sementes nos estágios iniciais de maturação ou finais, que germinam, originam maiores médias de plântulas anormais e sementes não germinadas (Figuras 3g, h).

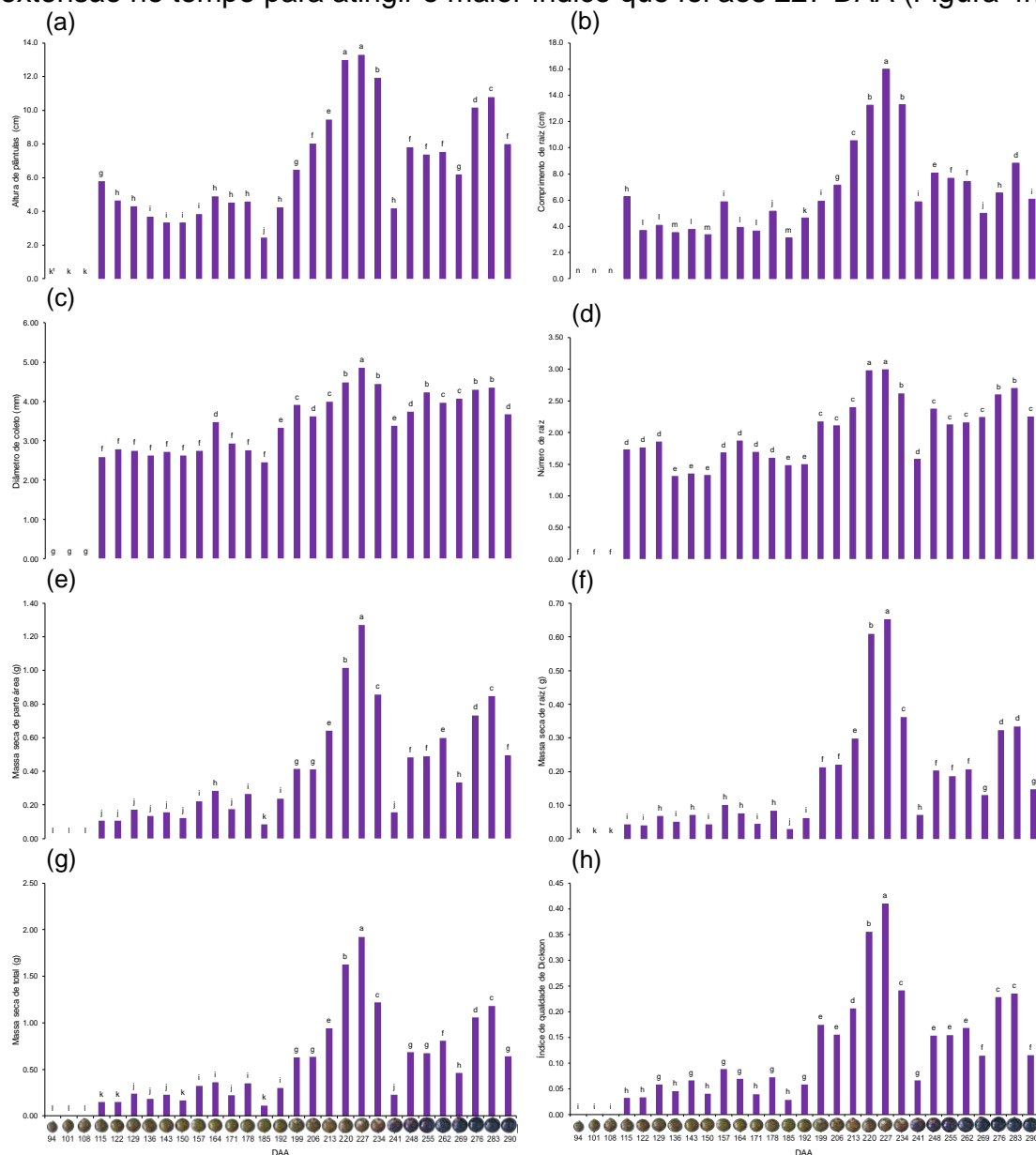


**Figura 3.** Umidade - % (a), germinação - % (b), índice de velocidade de germinação - IVG (c), tempo médio de germinação - TMG, dias (d), frequência relativa de germinação - FrG (e), plântulas normais - % (f), plântulas anormais - % (g), e sementes não germinadas - % (h) de *E. edulis* dias após a antese (DAA). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Barra de escala do fruto: 1 cm.

Nos estágios iniciais até 108 DAA não há a formação de plântulas, pois não há germinação. Em todas as variáveis analisadas nas plântulas, as geradas de sementes com 227 DAA obtiveram as maiores médias (Figura 4), diferindo-se das demais, a exceção da altura de plântulas e do número de raízes que não diferiu das plântulas originadas de sementes com 220 DAA (Figuras 4a, d). Analisando todas as variáveis conjuntamente no IQD verifica-se uma maior



extensão no tempo para atingir o maior índice que foi aos 227 DAA (Figura 4h).



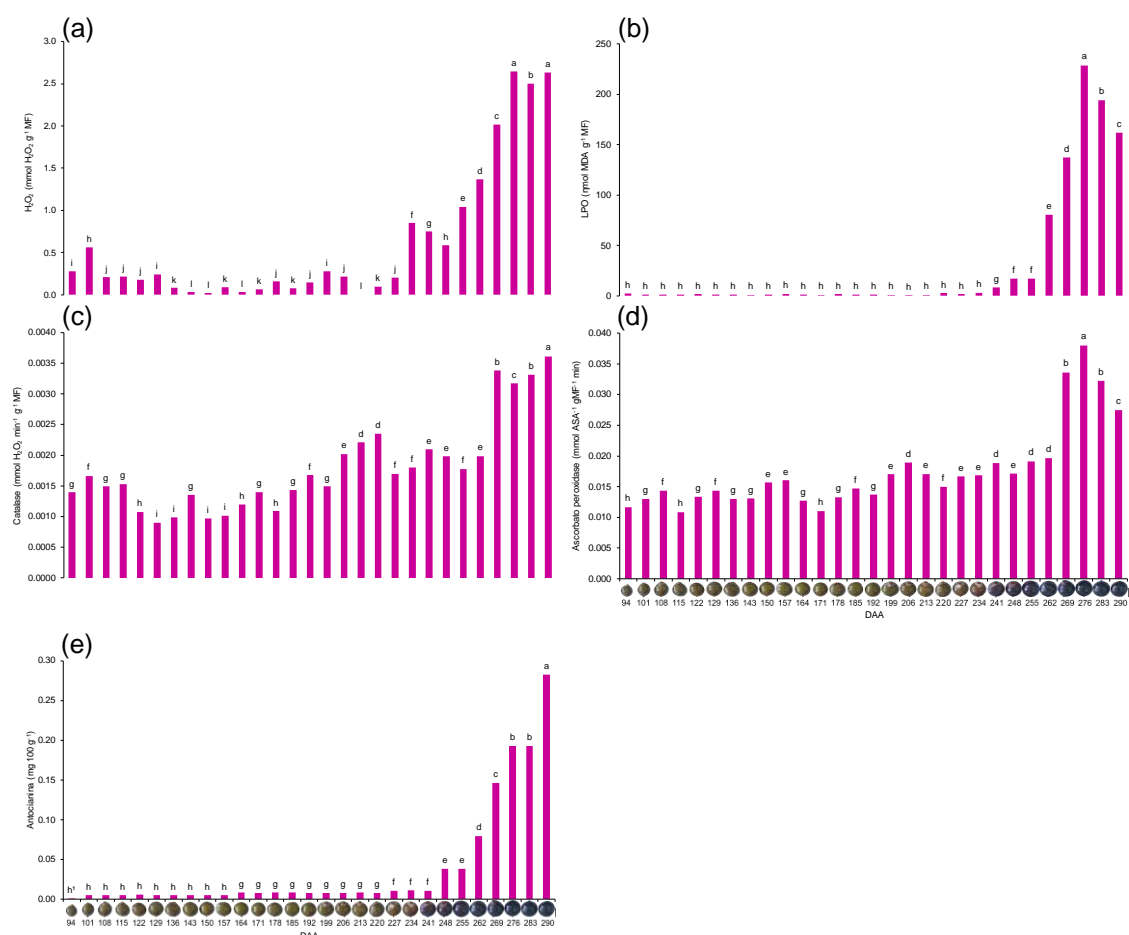
**Figura 4.** Altura de plântulas - cm (a), comprimento de raiz - cm (b), diâmetro do coleto - mm (c), número de raízes - g (d), massa seca de parte aérea - g (e), massa seca de raízes - g (f), massa seca total - g (g), e índice de qualidade de Dickson - IQD (h) de plântulas de *E. edulis* no decorrer da maturação das sementes (DAA. Dias após a antese). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Barra de escala do fruto: 1 cm.

Os valores para cada análise fisiológica foram crescentes de acordo com o grau de maturação das sementes (Figura 5). Apenas para a SOD não houve atividade durante a maturação.

A atividade das enzimas CAT e APX, e  $H_2O_2$  e peroxidação lipídica

tiveram comportamento semelhante, uma vez que, as maiores atividades iniciam-se a partir de 269 DDA devido ao processo de maturação que promove o aumento de espécies reativas de oxigênio.

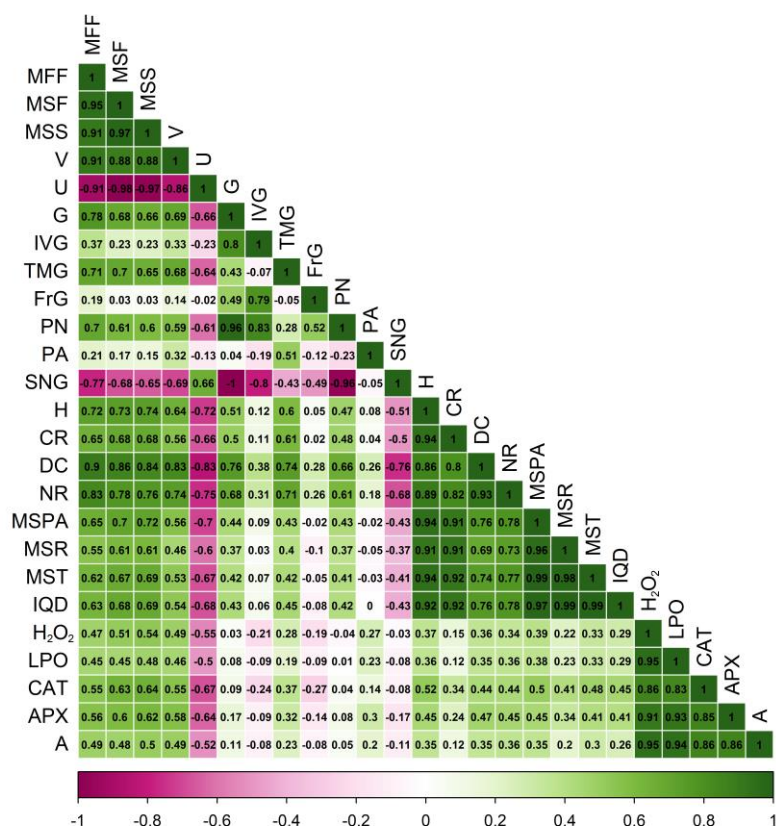
A produção de antocianinas pelas sementes de *E. edulis* se mantém baixo até 241 DDA, e após esse período o teor deste pigmento aumenta gradativamente devido ao processo de maturação.



**Figura 5.** Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> MF (a), peroxidação lipídica (LPO) - nmol MDA g<sup>-1</sup> MF (b), catalase - mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF (c), ascorbato peroxidase - mmol ASA<sup>-1</sup> g MF<sup>-1</sup> min (d), e antocianina - mg 100 g<sup>-1</sup> (e) de sementes de *E. edulis* dias após a antese (DAA). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott (p < 0,05). Barra de escala do fruto: 1 cm.

A maioria das variáveis estudadas possuem correlação positiva, a exceção da umidade (U) e sementes não germinadas (SNS) (Figura 6). É possível distinguir grupos fortemente correlacionados positivamente, como entre as variáveis morfológicas do fruto (MFF, MSF, MSS, V), morfológicas das

plântulas (H, CR, DC, NR, MSPA, MSR, MST, IQD), e entre as variáveis fisiológicas relacionadas ao sistema oxidativo das sementes (A, APX, CAT, LPO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

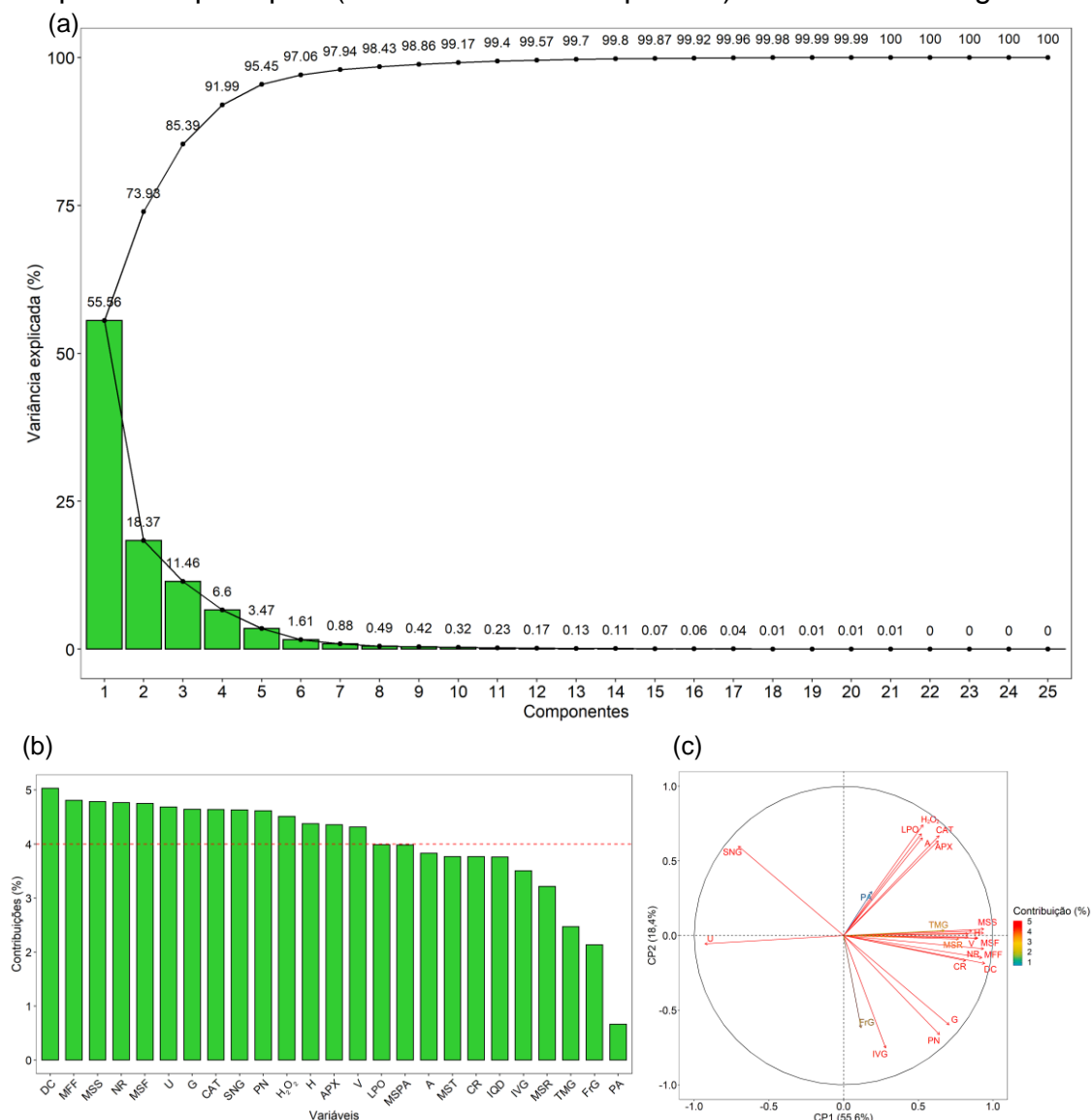


**Figura 6.** Correlação de Pearson das variáveis massa fresca de fruto (MFF), massa seca de fruto (MSF), massa seca de semente (MSS), volume de semente (V), umidade (U), germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), frequência relativa de germinação (FrG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), altura de plântulas (H), comprimento de raiz (CR), diâmetro do coleto (DC), número de raízes (RN), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), massa seca total (MST), índice de qualidade de Dickson (IQD), antocianina (A), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidação lipídica (LPO), e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de sementes de *E. edulis* no decorrer da maturação. Significância:  $p < 0,05$ , para valores  $-0,21 \leq r \geq 0,21$ .

Analisando as variáveis estudadas pelos componentes principais, é possível observar que os dois primeiros componentes (CP1 e CP2) explicam 74% da variância. Como o CP1 (55,6%) e o CP2 (18,4%) explicam cerca de 74% da variância observada, os demais componentes foram excluídos (Figura 7a).

As variáveis mais relevantes e que mais contribuem para os componentes

CP1 e CP2, dentre as 25 variáveis estudadas, foram: DC, MFF, MSS, NR, MSF, U, G, CAT, SNG, PN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H, APX e V, com contribuição acima do valor mínimo de 4% (Figura 7b). Uma visualização gráfica dos dados para os dois primeiros componentes principais (74% da variância explicada) é mostrada na Figura 7c.



**Figura 7.** Variância (%) explicada por cada um dos componentes principais (a). Contribuição das 25 variáveis para o primeiro e segundo componente principal (CP1 e CP2), a linha tracejada (4%) é a contribuição mínima considerada relevante, sendo 100% dividido por 25 variáveis (b). Gráfico biplot das variáveis para os dois primeiros componentes CP1 e CP2 (c). Variáveis: massa fresca de fruto (MFF), massa seca de fruto (MSF), massa seca de semente (MSS), volume de semente (V), umidade (U), germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), frequência relativa de germinação (FrG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), altura de plântulas (H), comprimento de raiz (CR), diâmetro do coleto (DC), número de raízes (RN), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), massa seca total (MST), índice de qualidade de Dickson (IQD),

peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxidação lipídica (LPO), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), e antocianina (A).

#### 4 DISCUSSÃO

O processo de maturação de sementes é caracterizado pela ocorrência de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. O teor de água das sementes reduziu 30% ao atingir 269 DAA onde os valores de umidade foram os menores (Figura 3a), o que não é um teor de água crítico, mas reflete consideravelmente na qualidade fisiológica de sementes recalcitrantes como as de *E. edulis*.

O máximo conteúdo de massa seca, máxima germinação e máximo vigor das sementes é indicativo do atingimento do ponto de maturidade fisiológica. Entretanto, a avaliação da germinação e vigor na condição *in vitro* surpreende os padrões indicativos normais fazendo com que sementes imaturas apresentem máxima germinação aos 150 DAA (Figura 3b), vigor e plântulas normais aos 164 DAA, precocemente (Figuras 3c, d, f, respectivamente). Durante este processo, a atividade metabólica ocorre de forma mais intensa devido à alta atividade respiratória e consequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio - EROs (radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $\cdot OH$ )) além de danos naturalmente causados na membrana ocasionando a perda de sua semi-permeabilidade, podendo este dano ser quantificado por meio da peroxidação lipídica (ARAÚJO et al., 2018).

O aumento da atividade do metabolismo e dos processos respiratórios intensificam a produção de EROs, dessa forma, o sistema antioxidante é ativado a fim de manter a homeostase. O acúmulo de EROs e os danos que causam são determinados por meio da eficiência do sistema antioxidante que preserva a conformação das proteínas, lipídios, DNA e outros componentes celulares para que possam ser utilizados nos processos metabólicos (MELO et al., 2021). As principais organelas responsáveis pela produção de EROs intracelulares são as mitocôndrias e peroxissomos. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial gera  $O_2^{\cdot-}$  e, os glioxissomos são transformados em peroxissomos, na qual o  $FADH_2$  transfere os elétrons diretamente para o  $O_2$  produzindo  $H_2O_2$  por  $\beta$ -oxidação conduzindo à degradação de proteínas (KIJOWSKA-OBERC et al.,

2021).

No final da fase de maturação, quando há redução dos teores de água e do metabolismo das sementes, mesmo ocorrendo produção das EROs, a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e ascorbato peroxidase (APX)) tende a estabilizar e outros mecanismos de proteção passam a entrar em atividade como os antioxidantes não enzimáticos (ARAÚJO et al., 2018), assim como foi observado para as sementes de *E. edulis*, as quais a atividade enzimática com 269 DAA se manteve constante ou apresentou pequenas reduções e aumentou o conteúdo de antocianinas (Figura 5).

A baixa atividade enzimática das sementes de *E. edulis* até 262 DAA está associada ao menor estresse oxidativo dessas sementes e também em função da redução do metabolismo (ARAÚJO et al., 2018). No citoplasma e na cromatina do endosperma e embrião de sementes maduras recalcitrantes de *E. edulis* foram imunolocalizadas as proteínas do tipo desidrina (DHN) (PANZA et al., 2007). Entretanto, segundo os autores, nesta espécie, as DHN não são suficientes para conferir tolerância à dessecação, o que não quer dizer que são indispensáveis. Em *A. angustifolia* a presença de DHN nos núcleos indica proteção da maquinaria transcricional (FARIAS-SOARES et al., 2012).

A baixa atividade da enzima SOD sugere uma menor produção de  $O_2^{\cdot -}$  e consequentemente menores taxas de desnaturalização de membrana por oxidação, evitando a remobilização e quebra de moléculas de reserva. A conservação das moléculas de reserva favorece a germinação e o vigor devido a preservação do embrião das sementes recalcitrantes de *E. edulis* que são naturalmente mais sensíveis a dessecação, ou seja, com uma inabilidade de preservar a estrutura do sistema de membranas, pela menor atividade de proteínas LEAs e açúcares da série rafínosica (rafinose e estaquiose). Segundo Obroucheva et al. (2016) a sacarose localizada no eixo embrionário de sementes, importada precocemente de cotilédones representa uma fonte osmótica potencial, sendo uma reserva muito mais eficiente para o início do crescimento do que oligossacarídeos e amido. Berjak e Pammenter (2013) relatam que os fatores que facilitam a tolerância à dessecação são “desligamento” metabólico e desdiferenciação intracelular, mecanismos estes

não verificado em sementes recalcitrantes, contribuindo significativamente para sua sensibilidade à dessecação.

A CAT é eficaz quando a semente apresenta altas concentrações de  $H_2O_2$ , na qual esta enzima indispensável aumenta sua atividade para a desintoxicação contra esta ERO intra e extracelular mantendo-as em níveis controlados (MELO et al., 2021). Em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze verificou-se que a expressão do gene *APX* e *SMP* (*PROTEÍNA DE MATURAÇÃO DE SEMENTES*), diminuiu nos cotilédones; abundância aumentada da expressão do gene *CAT* nos eixos embrionários; enquanto os genes *GPX* (*GLUTATIONA PEROXIDASE*) e *SOD* não mostraram diferenças significativas após a desidratação (GASPARIN et al., 2021). Segundo estes autores, os perfis de expressão gênica de sementes recalcitrantes de *A. angustifolia*, sugeriram que a perda de viabilidade após a desidratação está relacionada à diminuição dos níveis de transcrição de alguns genes associados à tolerância à dessecação.

A APX desempenha um papel fundamental no ciclo ascorbato-glutationa e na eliminação de  $H_2O_2$  das células vegetais. Essa enzima desempenha um papel importante na biossíntese da parede celular, bem como no crescimento, diferenciação e desenvolvimento celular, além de estar envolvida nas respostas ao estresse (MELO et al., 2021). A enzima APX reduz o  $H_2O_2$  à  $H_2O$  pela oxidação do ácido ascórbico e desidroascorbato (OBROUCHEVA et al., 2016).

A antocianina é um marcador bioquímico, identificado pelos altos níveis antociânicos que refletiu no aumento da produção de EROs, peroxidação lipídica e, conseqüentemente da atividade de enzimas do estresse oxidativo (APX e CAT) (Figura 6). As antocianinas são reguladas de forma coordenada em múltiplos níveis através da sinalização ambiental e de desenvolvimento da semente. Alto conteúdo de antocianinas está ligado ao final da fase de maturação das sementes devido a expressão dos genes ligados a este estágio de desenvolvimento, além disso, pesquisas recentes sugerem que a síntese deste pigmento é regulada através da sinalização de rotas metabólicas as quais utilizam melatonina como precursora (LI et al., 2020).

## 5 CONCLUSÕES

As sementes *in vitro* obtiveram o máximo de germinação, vigor e plântulas normais aos 164 DAA (fruto imaturo), com um ganho de 126 dias comparado ao uso de sementes do último estágio de maturação (290 DAA).

A atividade das enzimas CAT e APX, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidação lipídica tiveram maiores atividades a partir de 269 DDA devido ao processo de maturação que promove o aumento de espécies reativas de oxigênio.

A produção de antocianinas pelas sementes de *E. edulis* chega ao máximo no último estágio de maturação.

## 6 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, R. F.; ABUD, H. F.; SILVA, L. J. D.; ARAUJO, E. F.; PINTO, C. M. F.; SILVA, F. W. S. Alterações fisiológicas e atividade de enzimas antioxidantes em sementes de pimentas *Capsicum chinense* Jacq e *Capsicum frutescens* L. durante o processo de maturação. **Revista Ceres**, v. 65, n. 6, p. 534-545, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0034-737X201865060009>

BATISTA-SILVA, W.; NASCIMENTO, V. L.; MEDEIROS, D. B.; NUNES-NESE, A.; RIBEIRO, D. M.; ZSÖGÖN, A.; ARAÚJO, W. L. Modifications in organic acid profiles during fruit development and ripening: correlation or causation? **Frontiers Plant Science**, v. 9, p. 1-20, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01689>

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 478-511, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00478>

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.651>

BRANCALION, P. H. S.; VIDAL, E.; LAVORENTI, N. A.; BATISTA, J. L. F.; RODRIGUE, R. R.; Soil-mediated effects on potential *Euterpe edulis* (Arecaceae) fruit and palm heart sustainable management in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 284, p. 78-85, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.07.028>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. MAPA/DAS/ACS. 395p. 2009.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipids peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)



CEMBROWSKA-LECH, D. Tissue printing and dual excitation flow cytometry for oxidative stress - new tools for reactive oxygen species research in seed biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8656, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21228656>

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960. DOI: <https://doi.org/10.5558/tfc36010-1>

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 3, p. 175-82, 2008. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5539>

FARIAS-SOARES, F. L.; BURRIEZA, H. P.; STEINER, N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Immunoanalysis of dehydrins in *Araucaria angustifolia* embryos. **Protoplasma**, v. 250, p. 911-918, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0474-7>

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. **Anthocyanins as food colors**. London: Academic Press, 1982. p.181-207. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-472550-8.X5001-X>

GASPARIN, E.; FARIA, J. M. R.; RIBEIRO, P. R.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. M. Loss of viability during dehydration of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze seeds is associated with specific changes in gene expression. **Trees**, v. 35, p. 2087-2104, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02176-x>

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 67, n. 3, p. 450-455, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>

KIJOWSKA-OBERC, J.; STASZAK, A. M.; RATAJCZAK, E. Climate change affects seed aging? Initiation mechanism and consequences of loss of forest tree seed viability. **Trees**, v. 35, p. 1099-1108, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02072-w>

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.

LI, D.; GUO, Y.; ZHANG, D.; HE, S.; GONG, J.; MA, H.; GAO, X.; WANG, Z.; JIANG, L.; DUN, X.; HU, S.; CHEN, M. Melatonin represses oil and anthocyanin accumulation in seeds. **Plant Physiology**, v. 183, n. 3, p. 898-914, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.20.00117>

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MELO, G. M. D.; SANTOS, H. O. D.; OLIVEIRA, T. F.; CUNHA, A. R. D.; PEREIRA, A. A. S.; GUARALDO, M. M. D. S. Effect of priming and different types of drying on the physiological quality of *Urochloa ruziziensis* seeds. **Journal of Seed Science**, v. 43, p. -, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v43250046>

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p.11-19, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.

MULER, A. E.; ROTHER, D. C.; RANCALION, P. S.; NAVES, R. P.; RODRIGUES, R. R.; PIZO, M. A. Can overharvesting of a non-timber-forest-product change the regeneration dynamics of a tropical rainforest? The case study of *Euterpe edulis*. **Forest Ecology and Management**, v. 324, p. 117-125, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.09.001>

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

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>

OBROUCHEVA, N.; SINKEVICH, I.; LITYAGINA, S. Physiological aspects of seed recalcitrance: a case study on the tree *Aesculus hippocastanum*. **Tree Physiology**, v. 36, p. 1127-1150, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw037>

PANZA, V.; DISTÉFANO, A. J.; CARJUZZA, P.; LÁINEZ, V.; DEL VAS, V.; MALDONADO, S. Detection of dehydrin-like proteins in embryos and endosperm of mature *Euterpe edulis* seeds. **Protoplasma**, v. 231, p. 1-5, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-007-0248-9>

PEREIRA, D. C. S.; GOMES, F. S.; TONON, R. V.; BERES, C.; CABRAL, L. M. C. Towards chemical characterization and possible applications of juçara fruit: an approach to remove *Euterpe edulis* Martius from the extinction list. **Journal of Food Science and Technology**, v. , p. xx-yy, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05342-8>

PUPIN, L.; SANTOS, V. S.; SANTOS NETO, J. P.; FUSCO, D. O.; TEIXEIRA, G. H. A. Is the bioaccessibility of minerals affected by the processing steps of juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.)? **Food Science and Technology**, v. 91, p. 14-25, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.024>

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

SOUZA, A. C.; PREVEDELLO, J. A. The importance of protected areas for overexploited plants: Evidence from a biodiversity hotspot. **Biological Conservation**, v. 243, p. 108482, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108482>

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)

## CAPÍTULO V

### Imaginologia e densitometria de raio-X na maturação e qualidade de sementes de *Euterpe edulis* Martius

**Resumo:** *Euterpe edulis* Martius é uma espécie de palmeira ameaçada de extinção presente na Floresta Atlântica e no Cerrado da América do Sul. A utilização dos frutos é uma das principais estratégias sustentáveis adotadas para a manutenção da espécie, sendo necessária a utilização de métodos rápidos para seleção de sementes de melhor qualidade para a produção de mudas. Portanto, objetivou-se estudar o processo de maturação de sementes de *Euterpe edulis* por meio de análises de imagens e densitometria de raio-X. Foram colhidos frutos de dez matrizes em diferentes estádios de maturação, iniciando-se aos 94 dias após a antese (DAA) e estenderam-se até os 290 DAA. E em cada estágio foi analisado: massa seca de semente, teor de água, germinação, vigor, densidade e análises de imagens com auxílio de groundEye®, radiografia, microscopia eletrônica de varredura, e detector de energia dispersiva. As sementes obtiveram o maior acúmulo de massa seca aos 255 DAA (0,83 g), e o início da germinação *in vitro* ocorreu após 115 DAA, germinando 100% a partir de 150 DAA, e o máximo vigor aos 164 DAA, com 100% de plântulas normais. Com as imagens de raio-X foi possível visualizar sementes desidratadas e pequenos danos mecânicos, como o trincamento do pericarpo. No mesocarpo e endocarpo foram observadas as principais mudanças entre os estádios de maturação, principalmente com o acúmulo de potássio e silício. A utilização de sementes de *E. edulis* com 164 DAA (epicarpo verde), que possuem máxima germinação *in vitro*, vigor, plântulas normais e qualidade físico-química, garante uma diferença de 126 dias (4,2 meses) se comparado com frutos colhidos aos 290 DAA (epicarpo preto), normalmente utilizado na germinação *ex vitro* de sementes.

**Palavras-chave:** groundEye®, radiografia, microscopia eletrônica de varredura, detector de energia dispersiva, densidade, juçara.

**Abstract:** *Euterpe edulis* Martius is an endangered palm species present in the Atlantic Forest and Cerrado of South America. The use of the fruits is one of the main sustainable strategies adopted for the maintenance of the species, being necessary the use of fast methods for selection of species. better quality seeds for seedling production. Therefore, the objective was to study the maturation process of *Euterpe edulis* seeds through image analysis and X-ray densitometry. Fruits were harvested from ten matrices at different stages of maturation, starting at 94 days after anthesis (DAA) and extending to 290 DAA. At each stage, the following were analyzed: seed dry mass, water content, germination, vigor, density and image analysis with the aid of groundEye®, radiography, scanning electron microscopy, and dispersive energy detector. The seeds obtained the highest dry mass accumulation at 255 DAA (0.83 g), and the beginning of germination *in vitro* occurred after 115 DAA, germinating 100% from 150 DAA, and maximum vigor at 164 DAA, with 100% of normal seedlings. With the X-ray images, it was possible to visualize dehydrated seeds and small mechanical damage, such as the cracking of the pericarp. In the mesocarp and endocarp, the main changes were observed between the maturation stages, mainly with the accumulation of potassium and silicon. The use of *E. edulis* seeds with 164 DAA (green epicarp), which have maximum germination *in vitro*, vigor, normal seedlings and physicochemical quality, guarantees a difference of 126 days (4.2 months) compared to fruits harvested at 290 DAA (black epicarp), normally used in ex vitro germination of seeds.

**Keywords:** groundEye®, radiography, scanning electron microscopy, dispersive energy detector, density, juçara.

## 1 INTRODUÇÃO

*Euterpe edulis* Martius é uma espécie de palmeira dominante no sub-bosque da Floresta Atlântica e no Cerrado da América do Sul, e vem sofrendo ciclos repetidos de exploração, por possuir um palmito considerado iguaria na gastronomia e com qualidade e sabor superior aos demais pertencentes ao gênero *Euterpe* (BORGES et al., 2011; ROTHER; RODRIGUES; PIZO, 2016; BARROSO et al., 2019; LUGON et al., 2021). Em consequência, populações naturais podem sofrer declínios acentuados e extinções locais, sendo uma espécie pilar na estrutura e dinâmica da vegetação da Floresta Atlântica, tornando-a prioritária nos planos de manejo florestal e esforços de conservação (ROTHER; RODRIGUES; PIZO, 2016; SOUZA; PREVEDELLO, 2020).

A utilização dos frutos é uma das principais estratégias sustentáveis adotadas para a manutenção da espécie (FARINAZZO et al., 2020). O fruto é composto de uma única semente coberta por uma polpa fina de cor roxa escura a preta, colhida anualmente (INADA et al., 2015). Essa cor típica se deve à alta concentração de antocianinas, principalmente, cianidina-3-rutinósido ( $449 \text{ g mol}^{-1}$ ) e cianidina-3-glucosídeo ( $595 \text{ g mol}^{-1}$ ) (VIEIRA et al., 2018), com propriedades superiores ao *E. oleracea* Martius e *E. precatoria* Martius (BORGES et al., 2013). Assim, a colheita dos frutos de *E. edulis* torna-se uma atividade sustentável potencialmente mais lucrativa do que a extração de seu palmito.

Além do valor econômico dos frutos de *E. edulis*, esses possuem grande importância na cadeia reprodutiva da espécie, sendo seu único meio de propagação natural (SCHULZ et al., 2016). No entanto, são escassos os estudos quanto a sua formação e relação com o seu potencial e vigor germinativo.

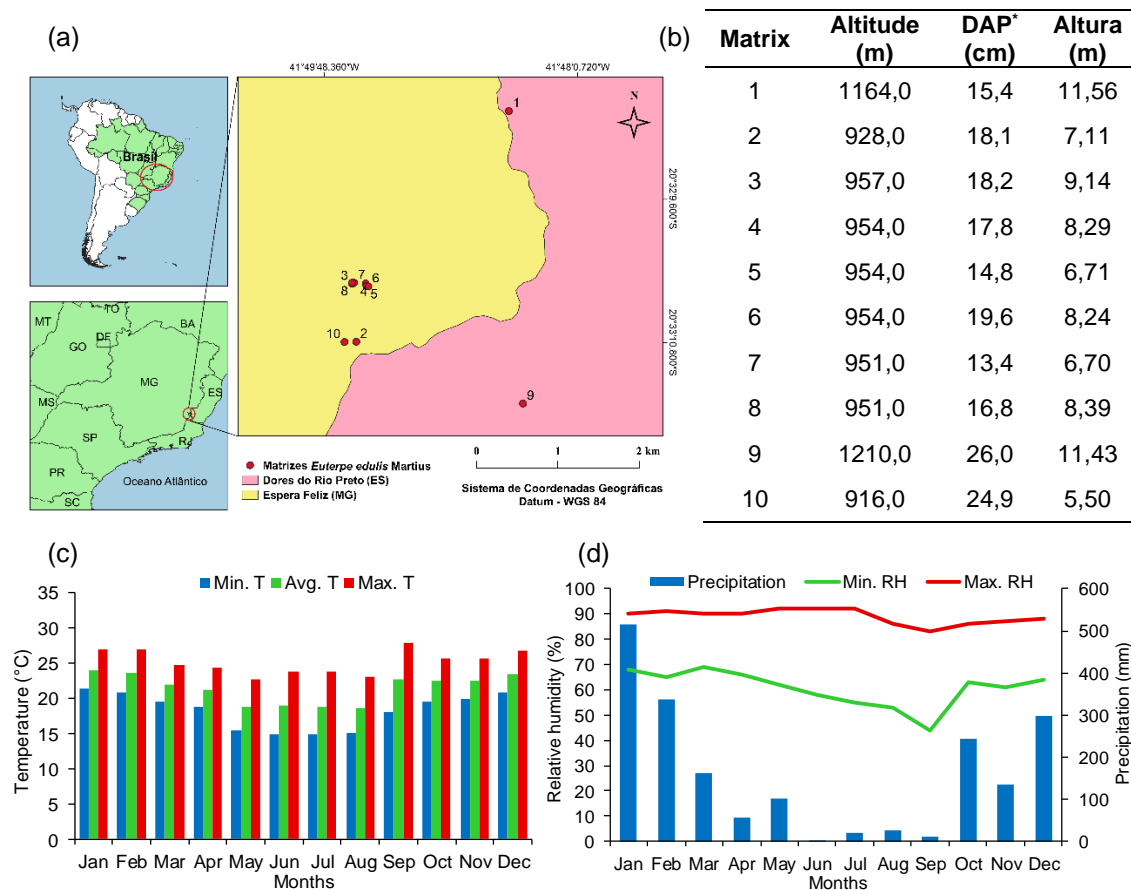
A qualidade de sementes é analisada principalmente por métodos destrutivos, trabalhosos e demorados, assim novas e refinadas tecnologias baseadas em procedimentos informatizados permitem a obtenção de diagnósticos detalhados sobre as características externas e internas da integridade estrutural das sementes (ARKHIPOV et al., 2019). Além disso, criam a oportunidade de automatizar as análises laboratoriais, auxiliando em tomadas de decisões rápidas, menos subjetivas e não invasivas para a indústria de sementes (BIANCHINI et al., 2021).

O uso de imagens com o auxílio de hardwares e softwares analíticos

personalizados na análise de qualidade de sementes, permite classificar os vários aspectos das sementes, como sua morfologia externa e interna, danos mecânicos ou causados por insetos, e estabelecimento de relações entre integridade, morfologia e determinação do potencial fisiológico (COLMER et al., 2020). Portanto, objetivou-se estudar o processo de maturação de sementes de *Euterpe edulis* por meio de análises de imagens e densitometria de raio-X.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de *E. edulis* foram colhidos de plantas matrizes, localizada no distrito de Pedra Menina, no município de Dores do Rio Preto e Espera Feliz, Espírito Santo/Minas Gerais, Brasil, próximo ao Parque Nacional do Caparaó (Figuras 1a, b). A temperatura máxima durante o período estudado foi de 28,0 °C em setembro e mínima de 14,9 °C em junho, com precipitação máxima de 514,4 mm em janeiro, e umidade relativa máxima de 92% em maio e junho (Figuras 1c, d).



**Figura 1.** Coordenadas (a) e características das plantas matrizes (b), temperaturas máxima (Max.T), média (Avg.T) e mínima (Min.T) (c), umidade relativa máxima (Max.RH), mínima (Min.RH) e precipitação (d) do início da floração ao final da colheita dos frutos na região onde está localizada a matriz de *E. edulis*, em 2020. Dados fornecidos pelo INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), Brazil. \*DAP. Diâmetro a altura do peito (1,30 m).

A colheita dos frutos foi iniciada aos 94 e estenderam-se até os 290 dias após a antese (DAA), em intervalos de sete dias, totalizando 29 estádios. Os frutos foram colhidos manualmente, e encaminhados ao Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUEFES), para avaliações de umidade (%), em estufa a  $105 \pm 3$  °C (BRASIL, 2009); massa fresca do fruto (g), germinação e vigor.

## 2.1 Germinação *in vitro*

No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, após a limpeza dos frutos,



foi retirado o tegumento, e em seguida, os mesmos foram imersos em solução de ácido ascórbico a 2%, para impedir a oxidação fenólica dos tecidos vegetais.

Na câmara de fluxo laminar, as sementes de *E. edulis* foram imersas em álcool etílico a 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (Candura®) a 2,5% por 10 minutos e em solução de amoxicilina (Germed®) a 3 g L<sup>-1</sup> por 10 minutos, realizando-se a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada após cada etapa. Após a desinfestação, as sementes foram dispostas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma®), suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) (Synth®), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica®), 0,1 g L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma®), e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Kasvi®). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 com hidróxido de potássio (KOH) (Alphatec®) e/ou ácido clorídrico (HCl) (Vetec®) a 1,0 N, antes da autoclavagem.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 8/16 horas luz/escuro, intensidade luminosa de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> até a obtenção de plântulas. Durante esse período, foram obtidos os dados de porcentagem de germinação (%) (BRASIL, 2009), índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), e tempo médio de germinação (TMG, dias) (LABOURIAU, 1983). E após 150 dias, plântulas normais (%), altura das plântulas (cm), e comprimento de raízes (cm).

## 2.2 GroundEye® e raio-X

A análise de imagem das sementes foi realizada empregando o sistema GroundEye®, versão S800, constituído de uma câmera profissional de alta resolução que capturou as informações e aliado ao software forneceu resultados de porcentagem de cores presente em cada estágio de maturação. As imagens radiográficas foram geradas usando uma unidade de raios-X Faxitron (MX 20) com uma intensidade de 24 kV por 20 s.

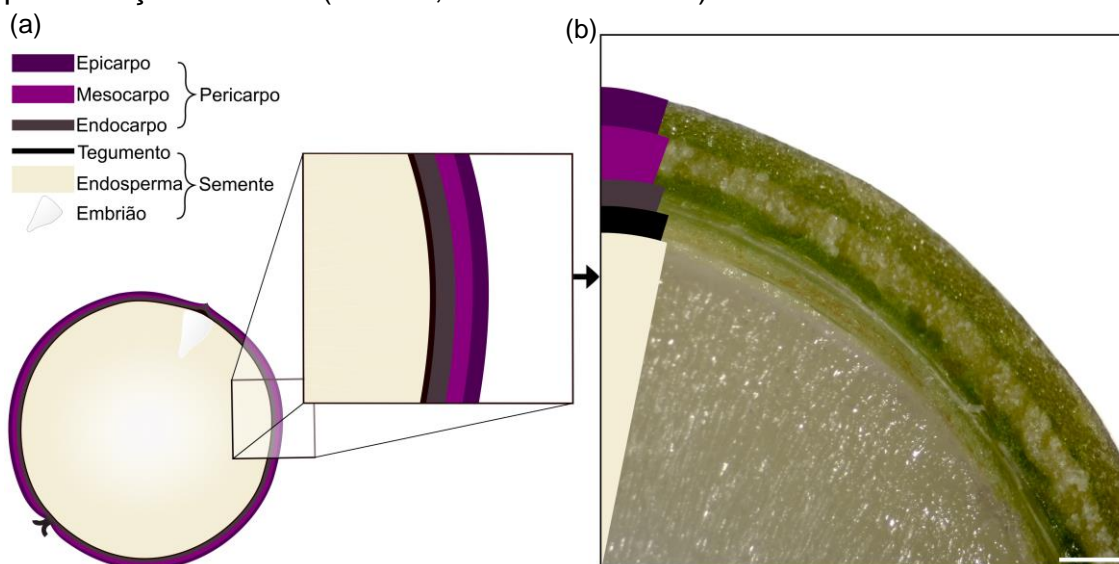
## 2.3 Densidade

Foi determinado o perfil de densidade por densitometria de raios-X. As sementes foram dispostas entre duas amostras de madeira nas dimensões 5 x

5 x 0,5 cm, e colocados em porta-amostras com capacidade para seis amostras, no compartimento interno do microdensitômetro de raios-X (GreCon®, DAX 6000); os valores de densidade foram determinados a cada 20  $\mu\text{m}$ . O densitômetro de raios X utilizado possui tensão de 33 kV, corrente entre 0 e 1 mA, ângulo de radiação de 11 ° e colimação inicial e final de feixes de 100 e 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Ao final, foi determinado a densidade média, densidade máxima, densidade mínima e densidade gravimétrica.

#### 2.4 Microscopia eletrônica de varredura e detector de energia dispersiva de raios-X (MEV/EDS)

Foram selecionados cinco estádios de maturação (94, 115, 164, 241, e 290 DAA) de sementes de *E. edulis*, desidratadas em série etílica até álcool absoluto e realizada a secagem em ponto crítico com CO<sub>2</sub> (Autosamdri 815, Tousimis®). Foram seccionadas amostras da superfície externa (epicarpo) e da interna (mesocarpo e endocarpo) das sementes (Figura 2), e dispostas em “stubs” submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica (Desk V, Denton Vacuum®).



**Figura 2.** Ilustração do fruto de *E. edulis*, com destaque para as camadas do pericarpo (epicarpo, mesocarpo, endocarpo), e corte do fruto imaturo (b). Barra: 500  $\mu\text{m}$  (b).

As análises e fotodocumentação foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (JSM - 6610LV, Jeol®) em combinação com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS, Bruker, XFlash® Detector

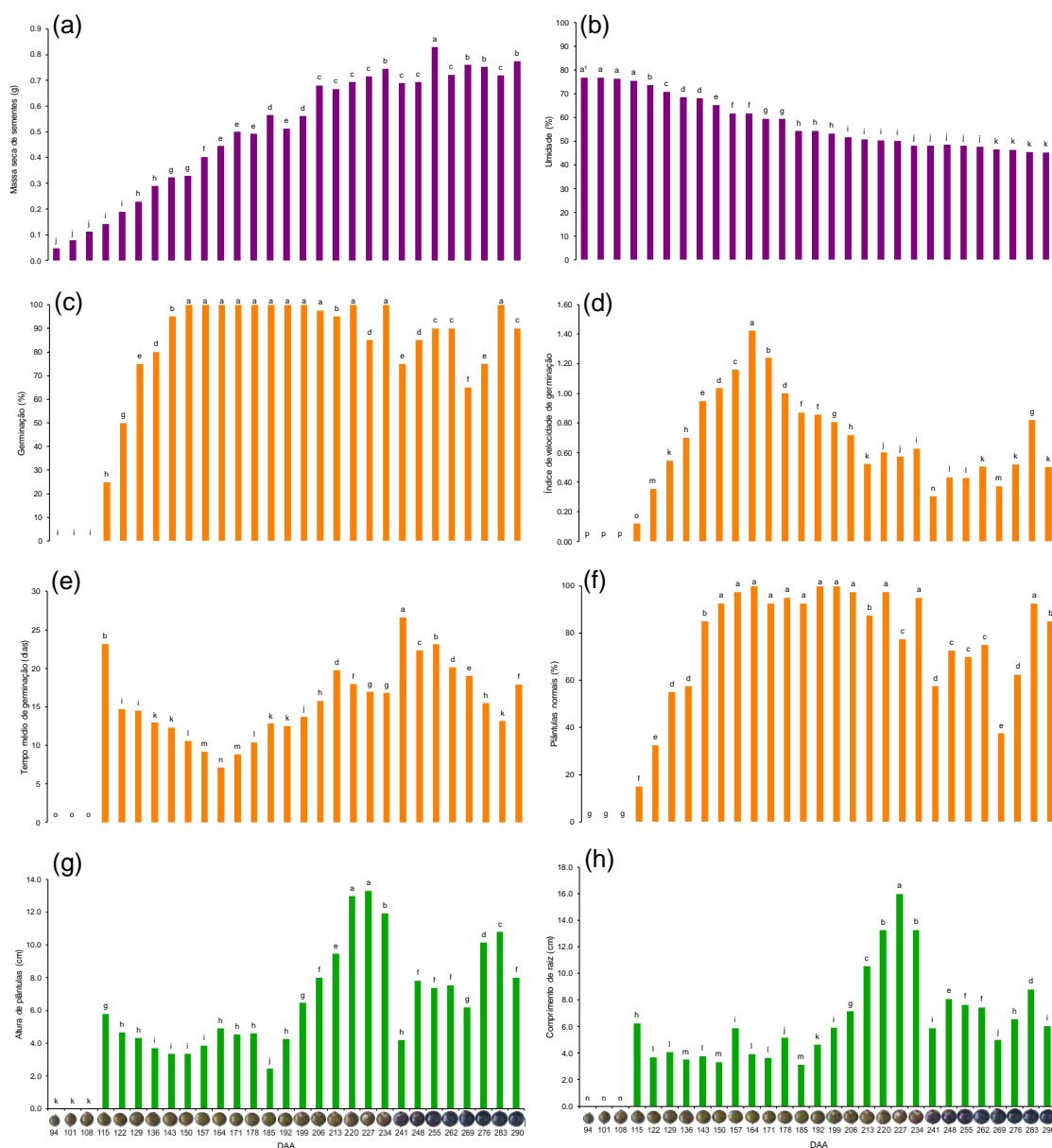
6|10). As análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória - ES.

## 2.5 Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado com 29 tratamentos (estádios de maturação), quatro repetições com 10 sementes, para as análises biométricas, germinação *in vitro* e vigor; e quatro repetições com uma semente, para as análises físico-químicas. Os dados foram submetidos teste de agrupamento de médias Scott-Knott, com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2020).

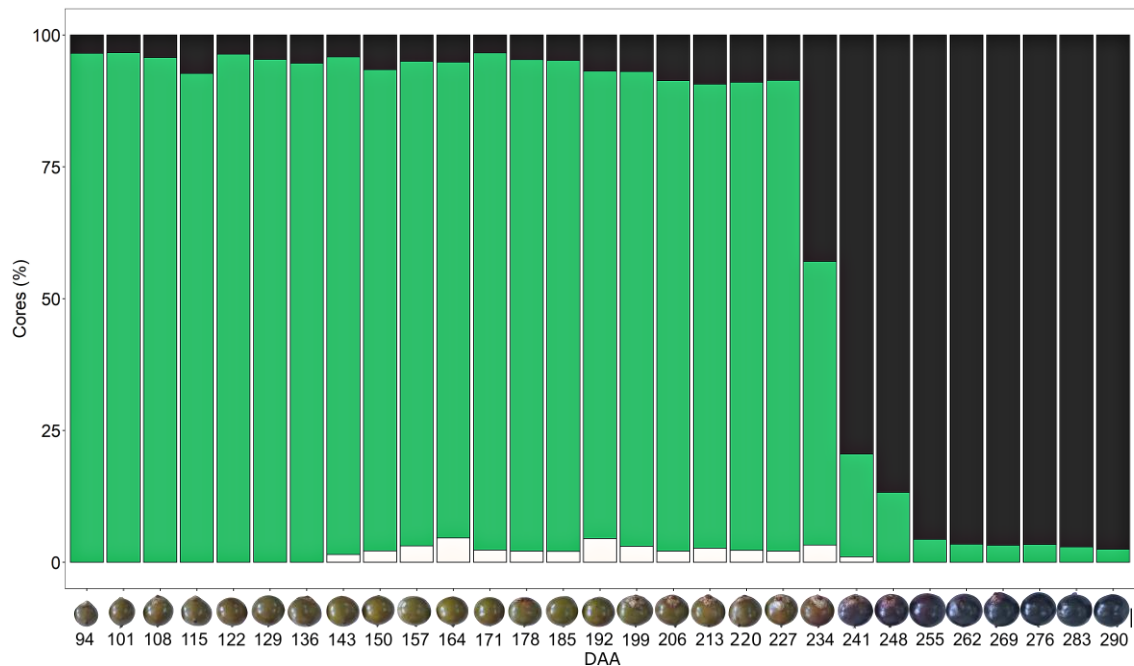
## 3 RESULTADOS

As sementes de *E. edulis* obtiveram a maior massa seca (0,83 g) aos 255 DAA, e aos 290 DAA os frutos se desprenderam da planta matriz (Figura 3a). A umidade das sementes decresceu ao longo da maturação de 77 a 45% (94-290 DAA, respectivamente) (Figura 3b). As sementes iniciaram a germinação após 115 DAA, e germinaram 100% a partir 150 DAA, não diferindo estatisticamente de 150 a 206, 220, 234 e 283 DAA, no entanto, após 206 DAA a germinação começa a oscilar (Figura 3c). As sementes obtiveram o máximo vigor aos 164 DAA (IVG = 1,42; TMG = 7 dias), com 100% de germinação e plântulas normais (Figuras 3d-f). A maior média de altura de plântulas foi obtida de sementes com 220 e 227 DAA, e a maior média de comprimento de raízes com 227 DAA (Figuras 3g, h).



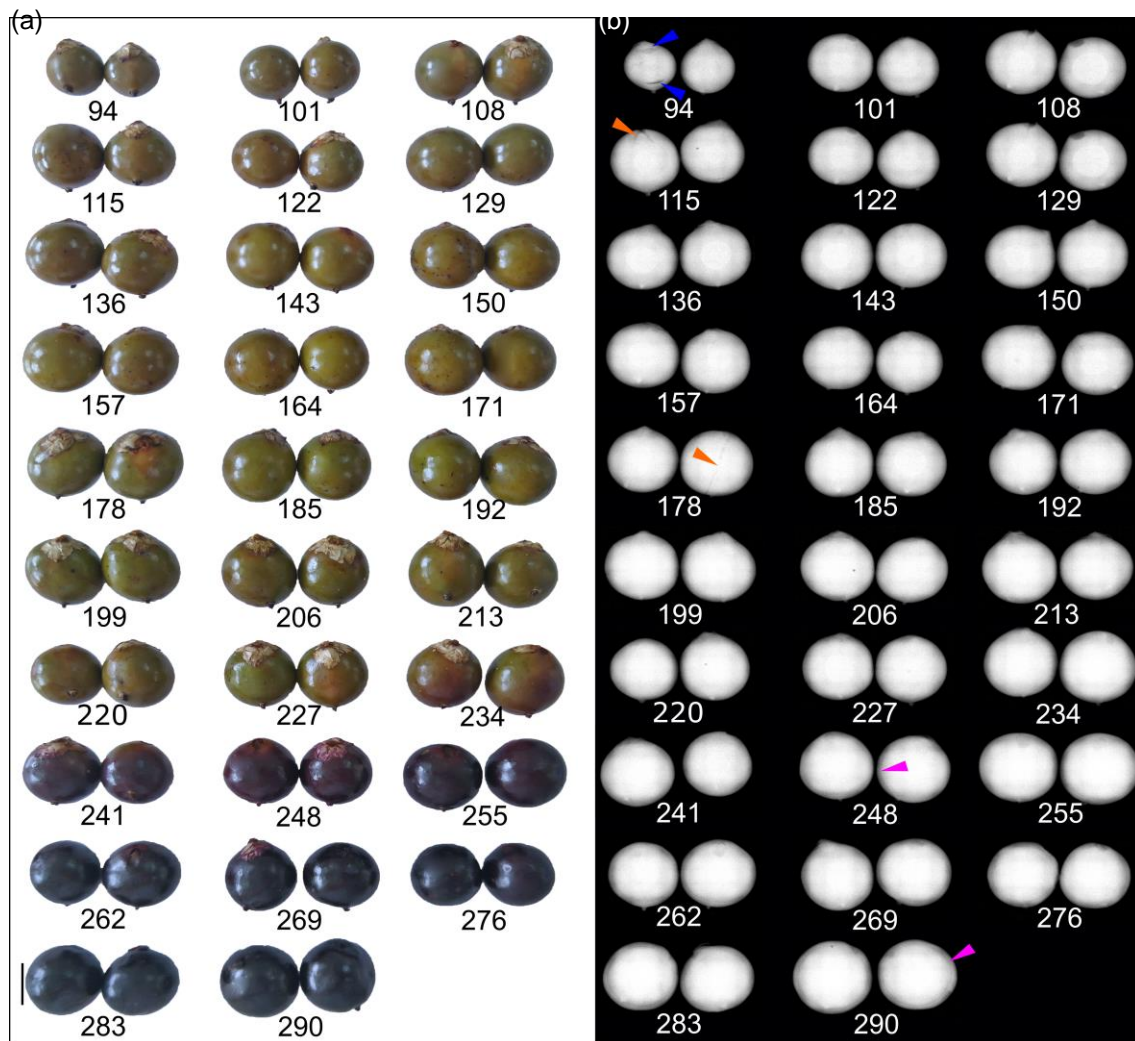
**Figura 3.** Massa seca de semente - g (a), umidade - % (b), germinação - % (c), índice de velocidade de germinação - IVG (d), tempo médio de germinação - TMG, dias (e), plântulas normais - % (f), altura de plântulas - cm (g), comprimento de raiz - cm (h), de sementes e plântulas de *E. edulis* no decorrer da maturação das sementes (DAA. Dias após a antese). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Barra de escala do fruto: 1 cm.

Os estádios iniciais de maturação de sementes de *E. edulis*, até 227 DAA, predomina a coloração verde nos frutos (96,7-88,0%) (Figuras 4 e 5a). Aos 234 DAA, o fruto começa a amadurecer e modificar a cor, com 53,8% verde e 42,9% preto, após esse estágio a coloração verde nos frutos diminuem drasticamente, enquanto a preta aumenta, atingindo a menor porcentagem de verde (2,5%) e maior de preto (97,5%) aos 290 DAA (Figuras 4 e 5a).



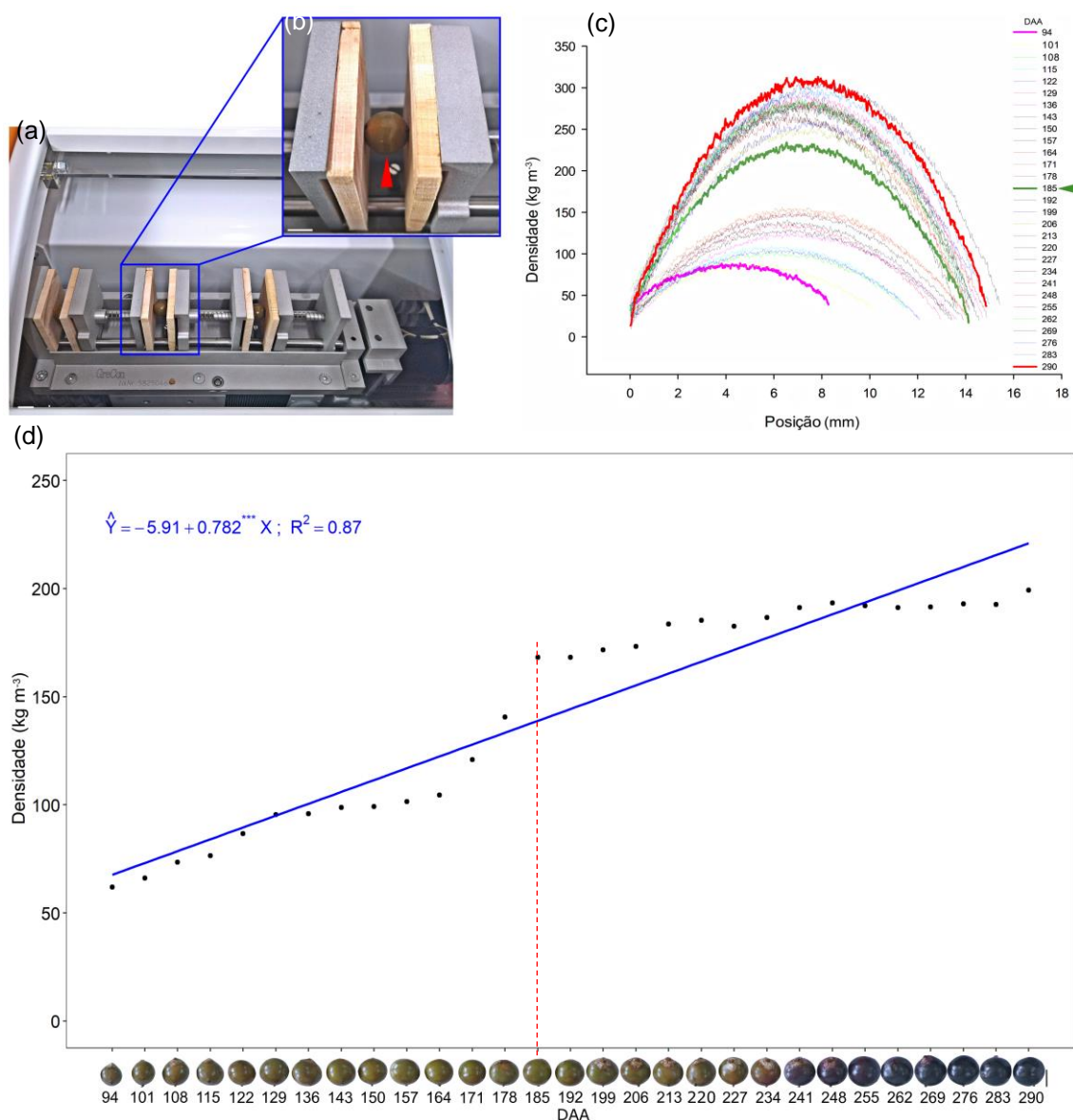
**Figura 4.** Média da porcentagem de cores do pericarpo em cada estágio de maturação de sementes de *E. edulis*. (DAA. Dias após a antese).

Com as imagens de raio-X é possível visualizar sementes desidratadas e pequenos danos mecânicos, como o trincamento do pericarpo (Figura 5b). Também é possível observar o efeito da diminuição natural da umidade nas sementes ao longo da maturação, com o início da visualização da distinção entre pericarpo e semente aos 248 DAA, ficando mais nítido com o decorrer dos próximos estádios, diferenciando-se claramente aos 283 e 290 DAA (Figura 5b).



**Figura 5.** Frutos de *E. edulis* em cada estágio de maturação (94-290 DAA - dias após a antese) (a), e imagem de raio-X das respectivas sementes (b). Em destaque, danos por desidratação – setas azuis; danos mecânicos no pericarpo – setas laranjas; efeito da diminuição natural da umidade nas sementes – setas rosas. Barra: 1 cm.

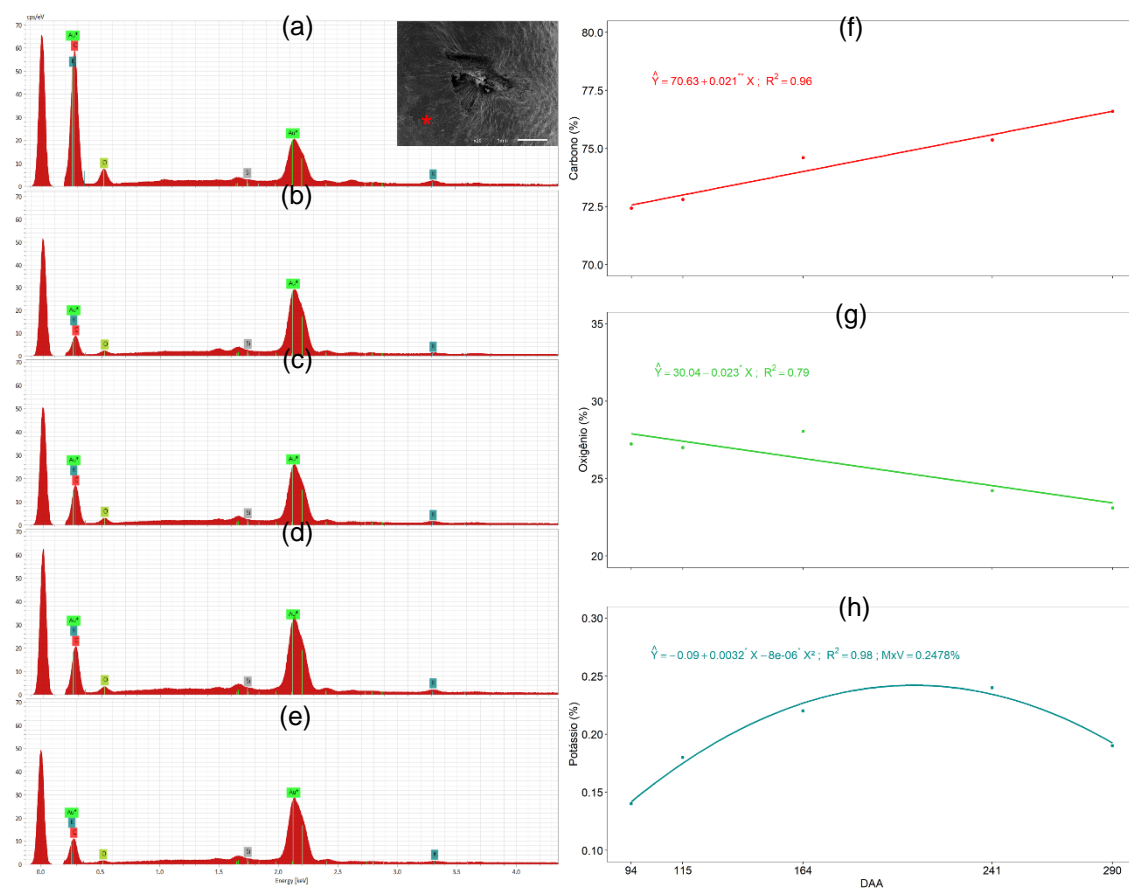
O método de densitometria de raio-X utilizado foi eficiente na análise de densidade das sementes de *E. edulis* (Figuras 6a-c). A densidade média aumenta linearmente com a maturação das sementes, no entanto, após 185 DAA a densidade aumenta consideravelmente (Figuras 6c, d).



**Figura 6.** Densitometria de raio-X (a) realizada nas sementes de *E. edulis* (a), com destaque do porta-amostra contendo uma semente em análise (b) (seta vermelha). Representação gráfica da leitura de densidade ( $\text{kg m}^{-3}$ ) de uma semente de cada estágio de maturação (94-290 dias após a antese - DAA) (c), e médias de densidade ao longo da maturação das sementes (d). Coeficiente estatisticamente significativo a \*\*\*0,1% pelo teste t. Barra: 1 cm (a, d), 0,5 cm (b).

Com a microanálise de elementos químicos presentes no epicarpo das sementes foi possível observar a presença de carbono (C), oxigênio (O), potássio (K) e silício (Si) (Figuras 7a-e). O C é o elemento químico mais presente, aumentando linearmente com a maturação das sementes (72,42-76,60%), enquanto o O diminui de 27,23-23,09% (Figuras 7f, g). Já o K ajustou-se a um modelo quadrático, com máximo valor de 0,24% aos 210 DAA (Figura 7h). Embora o Si apareça no espectro, as porcentagens não foram detectáveis, por

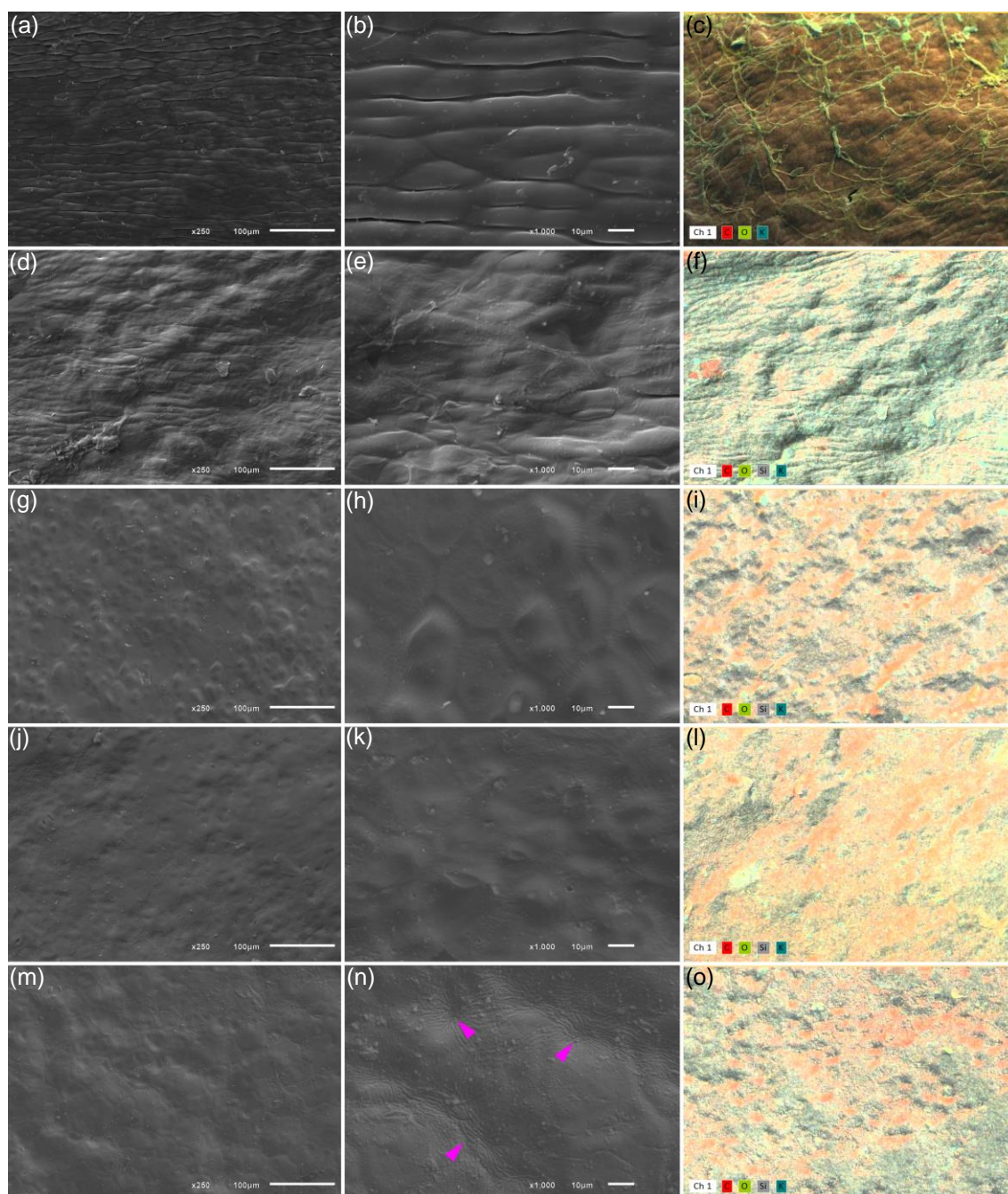
serem muito baixas.



**Figura 7.** Microanálise de elementos químicos presentes no epicarpo (asterisco vermelho) das sementes de *E. edulis* nos estádios 94 (a), 115 (b), 164 (c), 241 (d), 290 (e) dias após a antese (DAA). Médias da porcentagem de cada elemento químico presente no epicarpo das sementes ao longo da maturação, carbono (f), oxigênio (g), e potássio (h). Coeficiente estatisticamente significativo a \*\*1 e \*5% pelo teste t. MxV. Valor máximo. Au. Banho de ouro da amostra.

Na MEV do epicarpo foi possível observar o intumescimento da polpa do fruto ao longo do amadurecimento (108 para 241 DAA), e sua desidratação no último estágio (290 DAA) (Figura 8). No mapa de elementos químicos do epicarpo destaca os pontos na superfície onde está presente cada elemento, sobressaindo a coloração vermelha representante do C, e seu aumento com a maturação (Figuras 8c, f, i, l, o).

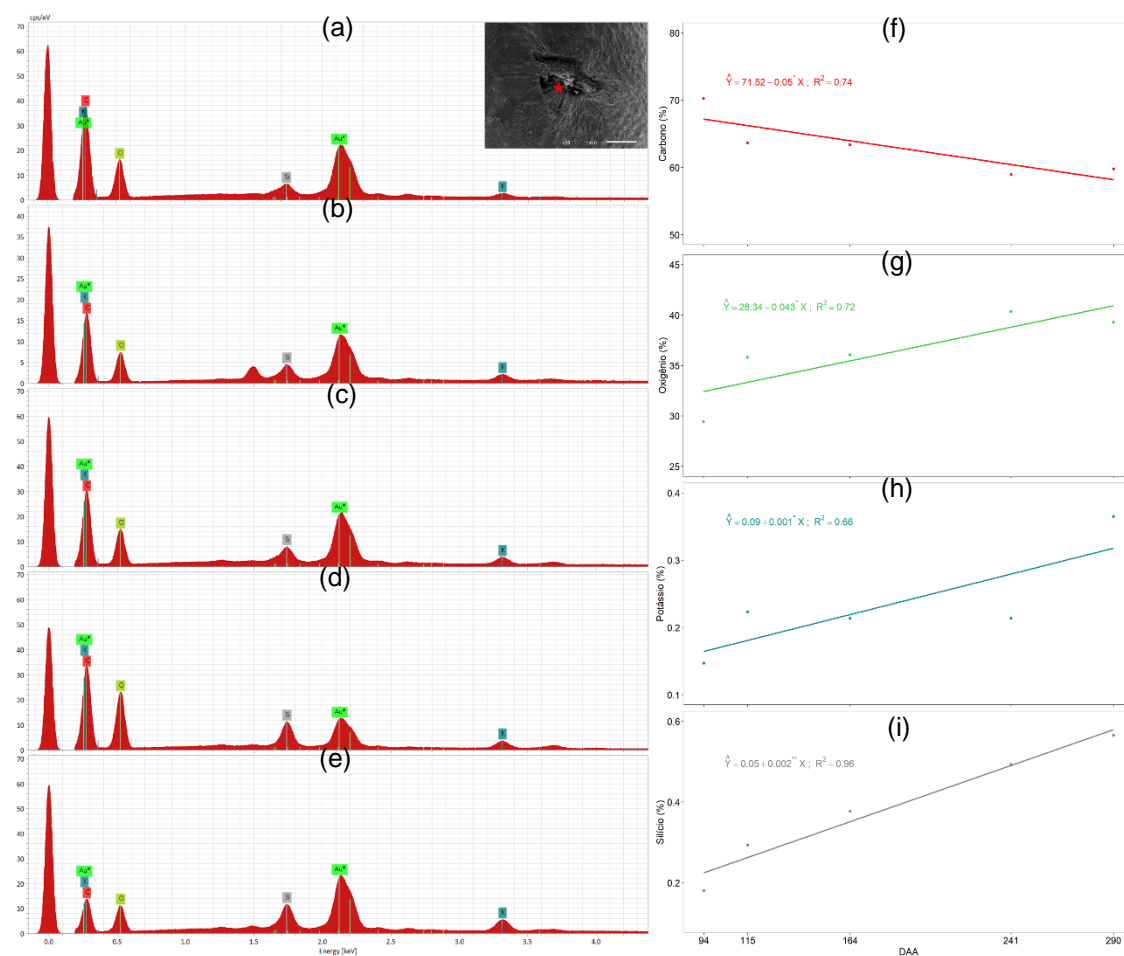




**Figura 8.** Micrografia MEV/EDS com mapa de elementos químicos presentes no epicarpo das sementes de *E. edulis* nos estádios 94 (a-c), 115 (d-f), 164 (g-i), 241 (j-l), 290 (m-o) DAA. Em destaque, pontos de desidratação da polpa - setas rosas (n).

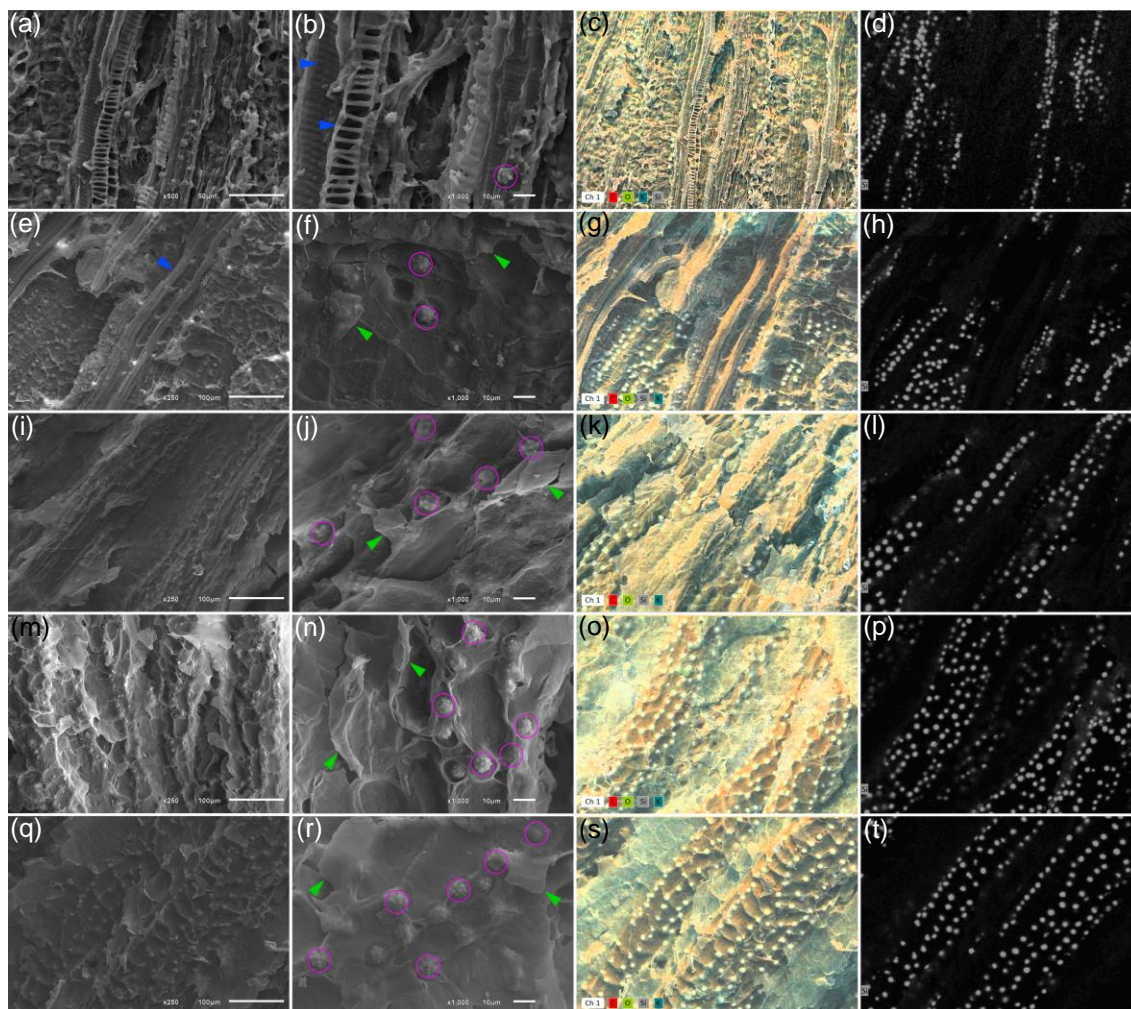
No mesocarpo e endocarpo das sementes também foi possível observar a presença de C, O, K e Si, como os principais elementos químicos (Figuras 9a-e). No entanto, diferentemente do epicarpo, no mesocarpo a porcentagem de C diminui linearmente com a maturação das sementes (70,24-59,79%), enquanto o O, K e Si aumentam de 29,43-39,29%, 0,15-0,37% e 0,18-0,57%,

respectivamente (Figuras 9f-i).



**Figura 9.** Microanálise de elementos químicos presentes no mesocarpo e endocarpo (asterisco vermelho) das sementes de *E. edulis* no estágio 94 (a), 115 (b), 164 (c), 241 (d), 290 (e) dias após a antese (DAA). E médias da porcentagem de cada elemento químico presente no mesocarpo e endocarpo das sementes ao longo da maturação, carbono (f), oxigênio (g), potássio (h), e silício (i). Coeficiente estatisticamente significativo a \*\*1 e \*5% pelo teste t. Au. Banho de ouro da amostra.

No mesocarpo e endocarpo foram observadas as principais mudanças entre os estádios de maturação (Figura 10). Aos 94 DAA havia poucas lâminas do mesocarpo deixando mais visíveis as fibras oriundas no endocarpo (Figuras 10a, b), e uma menor deposição de Si (Figuras 10c, d). Com o passar dos estádios, pode-se observar a formação de lâminas do mesocarpo cobrindo as fibras oriundas do endocarpo, e principalmente a maior deposição de Si (Figuras 10e-t).



**Figura 10.** Micrografia MEV/EDS com mapa de elementos químicos presentes no mesocarpo e endocarpo das sementes de *E. edulis* nos estádios 94 (a-d), 115 (e-h), 164 (i-l), 241 (m-p), 290 (q-t) DAA. Em destaque, fibras oriundas do endocarpo (setas azuis) (b, e), lâminas do mesocarpo (setas verdes) (f, j, n, r), deposição de silício (círculo rosa) (b, f, j, n, r), e mapa da deposição de silício (pontos cinzas) (d, h, l, p, t).

#### 4 DISCUSSÃO

A massa seca das sementes aumentou gradativamente ao longo da maturação até atingir seu máximo aos 255 DAA, diminuindo após esse estágio, enquanto a umidade diminui até 45% (283 e 290 DAA). O acúmulo de matéria seca à medida que a semente se desenvolve é devido a rápida divisão e expansão celular, necessitando de alto teor de água durante o desenvolvimento inicial da semente para a atividade metabólica e a manutenção do crescimento da semente (KOK et al., 2013). Com o acúmulo progressivo de reservas de armazenamento, principalmente o acúmulo de lipídios e fibras que aumentam

linearmente com a maturação das sementes de *E. edulis* (MELLO et al., 2021), a água é deslocada das células.

A maturação compreende uma série de transformações morfológicas e fisiológicas no óvulo fertilizado, produzindo subsequentemente sementes que atingem o máximo acúmulo de massa seca, germinação e vigor, condição esta denominada ponto de maturidade fisiológica. *In vitro* as sementes de *E. edulis* atingiram máxima germinação, vigor e plântulas normais aos 164 DAA. Na germinação *ex vitro* os frutos são colhidos aproximadamente aos 290 DAA, diferença esta de 126 dias (4,2 meses). Portanto, verifica-se *in vitro* que frutos imaturos (predominância de cor verde do pericarpo de frutos) podem ser empregados na produção de plântulas de qualidade; conservação, ou seja, manutenção de bancos de germoplasma *in vitro*; uso de explantes juvenis na embriogênese somática, auxiliando programas de melhoramento desta espécie.

Sementes de *E. edulis*, recalcitrantes, necessitam de acompanhamento quanto as modificações que ocorrem durante o processo de maturação, a exemplo, do teor de água. No presente trabalho, o estudo com raio-X possibilitou observar fissuras no pericarpo dos frutos e redução da umidade com o avanço da maturação. As fissuras são locais prováveis de infecção por microrganismos o que é extremamente indesejável na cultura de tecidos vegetais e perda de água, que deve ser monitorada devido a intolerância do embrião à dessecação.

Inúmeros são os estudos de diagnóstico de imagens, como o de *Jatropha curcas* L., em que descritores da integridade tecidual (ex.: densidade integrada (cinza mm pixel<sup>-1</sup>) - IntDen) tendem apresentar maiores médias de níveis de cinza do raio-X associadas às sementes da classe 1 (germinadas) e as menores médias às sementes da classe 2 (não germinadas), com essa tendência mantida nas classificações baseadas no vigor de plântulas (MEDEIROS et al., 2020a). A ferramenta IJCropSeed (imagens de raio-X interpretadas no ImageJ<sup>®</sup>), utilizou-se de inúmeros descritores da integridade tecidual de *Crambe abyssinica* Hochst. ex R.E.Fr., como o IntDen, em que sementes de alta qualidade apresentam maior densidade tecidual, refletindo em maiores valores de cinza nas radiografias, o que ao final gera plântulas normais (MEDEIROS et al., 2020b). Em sementes de *Capsicum chinenses* Jacq. foram encontradas correlações positivas e significativas entre os parâmetros de densidade tecidual,

avaliados por análise de imagens de raio-X interpretadas no ImageJ®, com a porcentagem e velocidade de germinação e viabilidade das sementes, enquanto correlações negativas foram observadas com a dormência (MEDEIROS et al., 2019). Em sementes de *Lecythis pisonis* Cambess. as densidades derivadas das imagens de raio-X e interpretadas no ArcGIS® diferiram em apenas 4% daquelas obtidas em laboratório, o que valida o uso dessa metodologia (ROSA et al., 2020). Portanto, verifica-se que esses métodos não destrutivos são amplamente utilizados na avaliação interna dos tecidos, identificando nas sementes: ausência de estruturas internas (endosperma e embrião), danos mecânicos, predação, deterioração, ferramenta esta que passa a ser indispensável quando se trata principalmente de grandes lotes de sementes em uma demanda cada vez mais crescente.

Associado, avaliou-se a densidade das sementes com a técnica de densitometria de raio-X, verificando que a densidade média aumenta com a maturação. A densitometria de raios-X é muito utilizada na análise quantitativa das propriedades da madeira de diferentes espécies florestais e produtos de madeira, no entanto, a técnica é pouco explorada na análise de semente, podendo ser uma técnica não-destrutiva promissora para quantificar a densidade, vantajoso para avaliar a morfologia interna da semente. Além disso, é um método vantajoso para avaliar a morfologia interna da semente, podendo identificar sementes vazias, parcialmente vazias e com defeitos no endosperma (GOMES-JUNIOR et al., 2012).

Em pericarpo, mesocarpo e endocarpo de sementes de *E. edulis* foram detectados elementos químicos com diferentes funções, a exemplo, do Si e K (MEV/EDS). O Si apresenta a sua maior concentração no mesocarpo e endocarpo de sementes de 290 DAA (0,63%), atuando na estrutura física ou mecânica da semente, promovendo resistência à penetração de água e outros compostos. Lima et al. (2021) em amostras de fibra de semente de *E. oleraceae*, verificaram cerca de 2% (p/p) de Si. Diferença de concentração de Si entre essas duas espécies de 1,63%, ou seja, uma resistência mecânica 3,17 vezes inferior a *E. oleracea*, o que pode influenciar consideravelmente no processo de embebição das sementes.

O aumento de biomassa dos frutos é acompanhado pelo acúmulo de K,

um macronutriente muito presente em sementes cuja função é a rustificação da muda com benefícios na aclimatização, para o subsequente plantio à campo. Além disso, é importante na formação dos frutos atuando no transporte de assimilados do floema, e na ativação de enzimas que são essenciais para a síntese de compostos orgânicos, incluindo açúcares solúveis sintetizados durante a maturação dos frutos (LIMA et al., 2014).

## 5 CONCLUSÕES

A máxima germinação, vigor e plântulas normais de *E. edulis* foram obtidas *in vitro* a partir de frutos colhidos aos 164 DAA (epicarpo verde), diferença de 126 dias (4,2 meses) se comparado com frutos colhidos aos 290 DAA (epicarpo preto), normalmente utilizado na germinação *ex vitro* de sementes.

A densitometria de raios-X é uma técnica inédita em sementes. É uma análise não-destrutiva, que possibilita identificar fissuras no pericarpo dos frutos e redução da umidade e sementes mais densas com a evolução do processo de maturação em *E. edulis*, permitindo a detecção e a separação de sementes com danos.

Concentrações de silício e potássio aumentam no mesocarpo e endocarpo de frutos de *E. edulis* com o avanço da maturação.

## 6 REFERÊNCIAS

- ARKHIPOV, M. V.; PRIYATKIN, N. S.; GUSAKOVA, L. P.; POTRAKHOV, N. N. GRYAZNOV, A. Y.; BESSONOV, V. B.; OBODOVSKII, A. V.; STAROVEROV, N. E. X-ray computer methods for studying the structural integrity of seeds and their importance in modern seed science. **Technical Physics**, v. 64, n. 4, p. 582-592, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1063784219040030>
- 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, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.036>
- BIANCHINI, V. D. M.; MASCARIN, G. M.; SILVA, L. C. A. S.; ARTHUR, V.; CARSTENSEN, J. M.; BOELT, B.; SILVA, C. B. Multispectral and X-ray images for characterization of *Jatropha curcas* L. seed quality. **Plant Methods**, v. 17, n.

9, p. 1-13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00709-6>

BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 4, p. 2128-2133, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0406-0>

BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J.; HELLERM, M. G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC – ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 363-369, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.035>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. MAPA/DAS/ACS. 395p. 2009.

COLMER, J.; O'NEILL, C. M.; WELLS, R.; BOSTROM, A.; REYNOLDS, D.; WEBSDALE, D.; SHIRALAGI, G.; LU, W.; LOU, Q.; CORNU, T. L.; BALL, J.; RENEMA, J.; FLORES ANDALUZ, G.; BENJAMINS, R.; PENFIELD, S.; ZHOU, J. SeedGerm: a cost-effective phenotyping platform for automated seed imaging and machine-learning based phenotypic analysis of crop seed germination. **New Phytologist**, v. 228, n. 2, p. 778-793, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16736>

DICKSON, A.; LEAF, A. L.; HOSNER, J. F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **Forest Chronicle**, v. 36, p. 10-13, 1960. DOI: <https://doi.org/10.5558/tfc36010-1>

FARINAZZO, F. S.; VALENTE, L. J.; ALMEIDA, M. B.; SIMIONATO, A. S.; FERNANDES, M. T. C.; MAURO, C. S. I.; TOMAL, A. A. B.; GARCIA, S. Characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius). **Process Biochemistry**, v. 91, p. 141-148, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.005>

GOMES-JUNIOR, F. G.; YAGUSHI, J. T.; BELINI, U. L.; CICERO, S. M.; TOMAZELLO-FILHO, M. X-ray densitometry to assess internal seed morphology and quality. **Seed Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 102-107, 2012. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2012.40.1.11>

INADA, K. O. P.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.002>

KOK, S. Y.; NAMASIVAYAM, P.; EE, G. C. L.; ONG-ABDULLAH, M. Biochemical characterisation during seed development of oil palm (*Elaeis guineensis*). **Journal of Plant Research**, v. 126, n. 4, p. 539-547, 2013. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s10265-013-0560-8>

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.

LIMA, R. L. S.; SOFIATTI, V.; AZEVEDO, C. A. V.; CAZETTA, J. O.; CARVALHO JÚNIOR, G. S.; ARRIEL, N. H. C. Nutrient accumulation curves in fruits and nutrient export by seeds and hulls harvesting of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3003-3014, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p3003>

LIMA, A. C. P.; BASTOS, D. L. R.; CAMRENA, M. A.; BON, E. P. S.; CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, R. S. S.; GUTARRA, M. L. E. Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açai (*Euterpe oleracea*) processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 925-935, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00551-w>

LUGON, M. D.; DOS SANTOS, P. H. D.; OLIVEIRA, P. V.; DE ALMEIDA, F. A. N.; LUBER, J.; FORZZA, R. C.; JARDIM, M. A. G.; PANETO, G. G. Is your açai really from Amazon? Using DNA barcoding to authenticate commercial products. **Food Analytical Methods**, v. 14, n. 8, p. 1559-1566, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-021-01998-2>

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MEDEIROS, A. D.; PINHEIRO, D. T.; XAVIER, W. A.; SILVA, L. J.; DIAS, D. C. F. S. Quality classification of *Jatropha curcas* seeds using radiographic images and machine learning. **Industrial Crops & Products**, v. 146, 112162, 2020a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112162>

MEDEIROS, A. D.; SILVA, L. J.; SILVA, J. M.; DIAS, D. C. F. S.; PEREIRA, M. D. IJCropSeed: An open-access tool for high-throughput analysis of crop seed radiographs. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 175, 105555, 2020b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105555>

MEDEIROS, A. D.; ZAVALA-LEÓN, M. J.; SILVA, L. J.; OLIVEIRA, A. M. S.; DIAS, D. C. F. S.; Relationship between internal morphology and physiological quality of pepper seeds during fruit maturation and storage. **Agronomy Journal**, v. 112, p. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/agj2.20071>

MELLO, T.; ROSA, T. L. M.; SIMÕES, I. M.; LIMA, P. A. M.; DOS ANJOS, B. B.; DE ARAUJO, C. P.; HEGEDUS, C. E. N.; DOS 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**, p. 1-12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02216-6>

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



R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ROSA, T. L. M.; ARAUJO, C. P.; KAMKE, C.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, J. P. B.; SCHMILDT, E. R.; LOPES, J. C.; MENGARDA, L. H. G.; OTONI, W. C.; SANTOS, A. R. Sapucaia nut: morphophysiology, minerals content, methodological validation in image analysis, phenotypic and molecular diversity in *Lecythis pisonis* Cambess. **Food Research International**, v. 137, p. 109383, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109383>.

ROTHER, D. C.; RODRIGUES, R. R.; PIZO, M. A. Bamboo thickets alter the demographic structure of *Euterpe edulis* population: a keystone, threatened palm species of the Atlantic forest. **Acta Oecologica**, v. 70, p. 96-102, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actao.2015.11.008>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

SOUZA, A. C.; PREVEDELLO, J. A. The importance of protected areas for overexploited plants: Evidence from a biodiversity hotspot. **Biological Conservation**, v. 243, p. 108482, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108482>

VIEIRA, G. S.; MOREIRA, F. K. V.; MATSUMOTO, R. L. S.; MICHELON, M.; FILHO, F. M.; HUBINGER, M. D. Influence of nanofiltration membrane features on enrichment of jussara ethanolic extract (*Euterpe edulis*) in anthocyanins. **Journal of Food Engineering**, v. 226, p. 31-41, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.01.013>

## CAPÍTULO VI

### **Indutores auxínicos e análogos ao picloram na embriogênese somática de *Euterpe edulis* Martius**

**Resumo:** *Euterpe edulis* Martius é uma espécie nativa da Mata Atlântica, ameaçada de extinção, com frutos de alto potencial antioxidante, e propagação única e exclusivamente por sementes, não sendo possível a propagação por perfilhamento. Portanto, o propósito do estudo foi analisar a embriogênese somática como técnica de propagação, com diferentes indutores auxínicos e análogos ao picloram. Foram colhidas sementes imaturas e extraídos seus embriões zigóticos, os quais foram utilizados em dois experimentos. O primeiro foi conduzido em meio de cultura MS líquido, suplementado com 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) ou picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), 150, 300, 450 e 600  $\mu\text{M}$ . Já o segundo foi em meio MS semisólido suplementado com picloram e seus análogos triclopyr (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético), e clopyralid (ácido 3,6-dicloro-piridina-2-carboxílico), a 100, 125, 150 e 175  $\mu\text{M}$ . Na maturação e germinação, os calos do segundo experimento de picloram e embriões somáticos isolados de triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ) foram transferidos para meio de pré-maturação (MS basal), e após 30 dias para meio MS basal ou suplementado com 5  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico (ABA); ou 0,53  $\mu\text{M}$  de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e 12,3  $\mu\text{M}$  de 2-isopenteniladenina (2-iP). Os embriões somáticos com protrusão radicular foram transferidos para meio de cultura MS até a obtenção de plântulas, que foram transferidas para meio MS sem sacarose por 30 dias, e foram transferidas para o ambiente *ex vitro*, acondicionadas em copos plásticos contendo substrato. Ao fim de cada etapa, os experimentos foram analisados quantitativa e qualitativamente, por meio de microscopia eletrônica de varredura, transmissão e de força atômica. Os resultados de indução embriogênica usando picloram foram superiores ao de 2,4-D, e no segundo experimento, os de triclopyr foram superiores ao de picloram, que foram superiores aos de clopyralid. Embriões somáticos em pré-maturação, provenientes de calos induzidos com triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ), multiplicaram cinco vezes mais. A maturação e germinação dos embriões somáticos foi máxima em meio com ABA (5  $\mu\text{M}$ ). Portanto, recomenda-se o uso de triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ), de

microscopia de força atômica para a identificação do tipo de calo, de tratamento pré-maturação e ABA (5  $\mu$ M) na maturação e germinação de embriões somáticos de *E. edulis*.

**Palavras-chave:** indutores embriogênicos, 2,4-D, ácido piridinocarboxílicos, triclopyr, clopyralid, ABA, juçara.

**Abstract:** *Euterpe edulis* Martius is a species native to the Atlantic Forest with fruits of high antioxidant potential. Its propagation is solely and exclusively by seeds and due the non-tillering nature and historical overharvesting it is threatened to extinction. Therefore, the purpose of the study was to analyze somatic embryogenesis as a propagation technique, with different auxin inducers and picloram analogues. Immature seeds were collected and their zygotic embryos extracted and used in two experiments. The first was carried out in liquid MS culture medium, supplemented with 2,4-D (dichlorophenoxyacetic acid) and picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid), 150, 300, 450 and 600  $\mu\text{M}$ . The second was in solid MS medium supplemented with picloram and its analogues triclopyr (3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid), and clopyralid (3,6-dichloropyridine-2-carboxylic acid), 100, 125, 150 and 175  $\mu\text{M}$ . At maturation and germination, calli from the second picloram experiment and somatic embryos isolated from triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ) were transferred to pre-maturation medium (basal MS), and after 30 days to basal MS medium or supplemented with 5  $\mu\text{M}$  of abscisic (ABA); or 0.53  $\mu\text{M}$  1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 12.3  $\mu\text{M}$  2-isopentenyladenine (2-iP). Somatic embryos with root protrusion were transferred to MS culture medium until seedlings were obtained, which were transferred to MS medium without sucrose for 30 days, and transferred to the ex vitro environment, placed in plastic cups containing substrate. At the end of each stage, the experiments were analyzed quantitatively and qualitatively, using scanning, transmission and atomic force electron microscopy. The embryogenic induction results of picloram were superior to those of 2,4-D, and in the second experiment, those of triclopyr were superior to those of picloram, which were superior to those of clopyralid. Pre-maturation somatic embryos from callus induced with triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ) multiplied five times more. The maturation and germination of somatic embryos was maximal in medium with ABA (5  $\mu\text{M}$ ). Therefore, it is recommended to use triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ), atomic force microscopy to identify callus type, pre-maturation treatment and ABA (5  $\mu\text{M}$ ) in the maturation and germination of *E. edulis* somatic embryos.

**Keywords:** embryogenic inducers, 2,4-D, pyridinecarboxylic acid, triclopyr, clopyralid, ABA, juçara.

## 1 INTRODUÇÃO

*Euterpe edulis* Martius é uma espécie nativa da Mata Atlântica, com frutos de rica composição em compostos bioativos e nutrientes, com alto potencial antioxidante associado a compostos fenólicos, principalmente antocianinas e ácidos fenólicos. No entanto, sua regeneração natural e conservação foram seriamente prejudicadas pelo desmatamento e intensa extração ilegal de palmito (SCHULZ et al., 2016).

A propagação da espécie *E. edulis* se dá única e exclusivamente por sementes, não sendo possível a propagação por perfilhamento, pois a espécie não emite brotações na base da planta (SCHULZ et al., 2016). As sementes são recalcitrantes e sua germinação é lenta e desuniforme, podendo levar de 60 a 90 dias (CURSI; CICERO, 2014).

A embriogênese somática é uma técnica de propagação promissora em palmeiras, permitindo o progresso no desenvolvimento de sistemas de propagação *in vitro* em muitas plantas economicamente importantes. O dendê (*Elaeis guineenses* Jacq.), a exemplo, que permitiu a produção de material uniforme para programas de plantio no campo e no melhoramento genético (BEULÉ et al., 2011).

A indução e o desenvolvimento de embriões somáticos vão depender de alguns fatores como a composição do meio de cultura, explantes, genótipos, indutores e suas concentrações (ROSE et al., 2010). O picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico), é um produto químico orgânico sintético que pertence ao grupo de herbicida ácidos piridinocarboxílicos (MARCO-BROWN et al., 2014), conhecidos como mimetizadores de auxinas.

O picloram já vem sendo utilizado na embriogênese somática pela sua eficácia na absorção e mobilização, bem como à sua rápida metabolização em locais específicos da planta (KARUN et al., 2004), proporcionando bons resultados em palmeiras, como: *Bactris gasipaes* (VALVERDE et al., 1987; STEINMACHER et al., 2007), *Calamus merrillii* Becc. e *C. subinermis* Wendl. ex Becc. (GOH et al., 1999, 2001) e *Euterpe oleracea* (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016). Além do picloram, existem outros análogos que não existem registros de sua utilização na embriogênese somática, a exemplo, o fluroxypyr (ácido 4-amino-3,5-dicloro-6-fluoro-2-piridiloxiacético), o

triclopyr (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético), o clopyralid (ácido 3,6-dicloro-piridina-2-carboxílico) e o aminopyralid (ácido 4-amino-3,6-dicloropiridina-2-carboxílico). A hipótese é que os ácidos piridinocarboxílicos são compostos promissores na embriogênese somática em palmeiras, visto os bons resultados já encontrados com o picloram. Portanto, o propósito do estudo foi analisar a embriogênese somática como técnica de propagação de *E. edulis*, com diferentes indutores auxínicos e análogos ao picloram, e validar a análise da embriogênese somática por microscopia de força atômica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e desinfestação

Os frutos de *E. edulis* foram colhidos de uma planta matriz de 6,7 m de altura e 13,4 cm de DAP (altura na altura do peito – 1,30 m), localizada no distrito de Pedra Menina, no município de Dores do Rio Preto, Espírito Santo, Brasil próximo ao Parque Nacional do Caparaó, nas coordenadas 20°32'45.4" S, 41°49'35.7" W, e na altitude 951 m, selecionada pelo seu alto nível de antocianina da polpa do fruto (Capítulo I). A colheita dos frutos ocorreu com aproximadamente 168 dias após a antese, e foram encaminhados para Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES).

Após a limpeza dos frutos com água e detergente neutro, foi retirado o tegumento, e em seguida, os mesmos foram imersos em solução de ácido ascórbico à 2%, para impedir a oxidação fenólica dos tecidos vegetais. Na câmara de fluxo laminar, as sementes de *E. edulis* foram imersas em álcool etílico à 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) (Candura®) a 2.5% por 10 minutos e em solução de amoxicilina (Germed®) a 3 g L<sup>-1</sup> por 10 minutos, realizando-se a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada após cada etapa.

### 2.2 Indução

Os embriões zigóticos foram extraídos das sementes imaturas e utilizados

nos experimentos I e II. No experimento I, os embriões foram dispostos em placas de Petri de vidro (90 x 15 mm) imersos em 6 mL de meio de cultura líquido MS estacionário (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma®), 0,1 g L<sup>-1</sup> mio-inositol (Sigma®), 30 g L<sup>-1</sup> sacarose (Dinâmica®), e 1 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) (Synth®), e o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, suplementado com 2,4- D (ácido diclorofenoxiacético – Sigma®), picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico – Sigma®) nas concentrações 150, 300, 450 e 600 µM. No segundo experimento, foi acrescentado 5,5 g L<sup>-1</sup> ágar-ágar (Dinâmica®), e suplementado com picloram e seus análogos triclopyr (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético – Sigma®), e clopyralid (ácido 3,6-dicloro-piridina-2-carboxílico – Sigma®), nas concentrações 100, 125, 150 e 175 µM, todos os indutores foram filtroesterelizados e adicionados ao meio de cultura após autoclavagem.

Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 170 dias. Foi analisado no experimento I: calogênese (%), calo embriogênico (%), oxidação (%), área total de calos (mm<sup>2</sup>), área embriogênica (mm<sup>2</sup>), e porcentagem embriogênica. Nos demais experimentos: calogênese (%), taxa de indução (%), massa calogênica (g), área total de calos (mm<sup>2</sup>) e oxidação (%).

### 2.2.1. Microscopia eletrônica de varredura - MEV

As amostras de calos e embriões da indução foram fixadas em solução Karnovsky, desidratadas em série etílica até álcool absoluto e realizada a secagem em ponto crítico com CO<sub>2</sub> (Autosamdri 815, Tousimis®), dispostas em “stubs” e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica (Desk V, Denton Vacuum®).

As análises e fotodocumentação foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (JSM - 6610LV, Jeol®) e todas as imagens foram digitalmente processadas. As análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória - ES.

### 2.2.2. Análise por microscopia eletrônica de transmissão - MET

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras dos diferentes grupos experimentais foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky contendo 2,5% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído e 0,1 M de tampão cacodilato. Posteriormente, os tecidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e incluídos em resina epóxi (EMbed 812, Eletron Microscopy Sciences). Cortes ultrafinos (60-80 nm de espessura) foram obtidos em um ultramicrotomo (UCT, Leica Microsystems) antes das etapas de coloração em acetato de uranila e citrato de chumbo. Micrografias eletrônicas representativas dos diferentes grupos foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1400, Japão) a 120 kV e ampliação de 12000 x. As análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória - ES.

### 2.2.3. Análise por microscopia de força atômica - AFM

As amostras de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, de calos da indução foram desidratadas em série etílica até álcool absoluto, em seguida realizada a secagem em ponto crítico com CO<sub>2</sub> (Autosamdri 815, Tousimis®), e posteriormente dispostas sobre lâminas de vidro, utilizando o esmalte como meio de adesão.

As imagens do AFM foram coletadas usando um microscópio confocal alpha300 R (WITEc, Wissenschaftliche Instrument und Technologie GmbH°, Ulm, Alemanha) operado em modo não contato (nas regiões selecionadas, usando um microscópio de luz, LM – acoplado ao equipamento), um cantilever Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, uma constante nominal de 42 N m<sup>-1</sup>, frequência de ressonância de aproximadamente 285 kHz, varredura taxas de 0,3-1,0 Hz e scan de 2500-10000 nm.

Além de imagens topográficas, imagens de fase e microscopia de luz foram coletados simultaneamente. As imagens de fase foram usadas para estimar as propriedades físicas dos calos, como dureza, adesão e viscoelasticidade.

A assimetria de superfície (SSK) foi obtida a partir da equação 1, e a altura



de pico a pico, dada pela diferença entre as alturas de pico mais alto e mais baixo, foram usados para avaliar a rugosidade da superfície.

$$SSK = \frac{1}{R_Q^3} \frac{1}{n} \sum_i^n Z_i^3 \quad \text{Equação 1}$$

Onde  $Z_i$  é a altura na posição  $i$ ,  $R_Q$  é a quadrática média do desvio de altura, e  $n$  é o número de pontos dentro da grade da imagem.

Em geral, um SSK zero sugere uma distribuição de dados simétrica ou uma distribuição de dados uniforme em torno do plano médio, enquanto um SSK diferente de zero sugere uma distribuição assimétrica, onde uma superfície plana com pequenos picos ( $SSK > 0$ ) ou pequenos vales ( $SSK < 0$ ) são observados.

Kurtosis (SKU) é determinado pela Equação 2, do software de avaliação de dados WITec e indica se os dados estão arranjados horizontalmente ou perpendicularmente sobre a média.

$$SKU = \frac{1}{\langle MN \rangle SQ^4} \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^M \epsilon_{i,j} [z(x_i, y_j) - \bar{z}]^4 \quad \text{Equação 2}$$

Onde  $M$  e  $N$  é o número de pontos de dados em  $X$  e  $Y$ ,  $SQ$  é o desvio médio quadrático,  $Z$  é a altura da superfície em relação ao plano médio. O  $SKU > 3,00$  indica a presença de picos excessivamente altos ou vales profundos, por outro lado  $SKU < 3,00$  indica superfícies com textura protuberante. Se as alturas da superfície estão distribuídas normalmente,  $SKU = 3,00$ .

As análises foram realizadas no Laboratório de Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análise de Petróleo, Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória - ES.

#### 2.2.4. Delineamento experimental

Os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, sendo o exp. I em fatorial 2x4 (indutores I: 2,4-D e picloram x concentrações: 150, 300, 450 e 600  $\mu\text{M}$ ), e o exp. II em fatorial 3x4 (indutores II: picloram, triclopyr e clopyralid x concentrações: 100, 125, 150 e 175  $\mu\text{M}$ ). Ambos com quatro repetições de cinco embriões zigóticos. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de F entre os indutores I, teste de média entre os

indutores II, Tukey ( $p < 0,05$ ), e análise de regressão, com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2020).

### 2.3 Maturação e germinação

Todos os calos embriogênicos da indução, do experimento II, foram transferidos para pré-maturação em meio de cultura MS,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  mio-inositol,  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose, sem adição de reguladores. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da adição do ágar-ágar ( $5,5 \text{ g L}^{-1}$ ). E foram mantidos em sala de crescimento a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , no escuro, por 30 dias, e contabilizado o número de embriões somáticos.

Após esse período, os calos embriogênicos dos tratamentos com picloram foram transferidos para meio de cultura MS, com  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  mio-inositol,  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da adição do ágar-ágar ( $5,5 \text{ g L}^{-1}$ ), e após autoclavagem foi suplementado com  $5 \text{ } \mu\text{M}$  de ácido abscísico (ABA); ou  $0,53 \text{ } \mu\text{M}$  de ácido 1-naftalenoacético (ANA) e  $12,3 \text{ } \mu\text{M}$  de 2-isopenteniladenina (2-iP) (GUERRA; HANDRO, 1998). Já os calos embriogênicos do triclopyr ( $100 \text{ } \mu\text{M}$ ) estavam com os embriões somáticos já se desprendendo, porém assíncronos, portanto, foram individualizados e dispostos nos mesmos meios de cultura acima. E foram mantidos em sala de crescimento a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , no escuro até protusão radicular, sendo avaliado a porcentagem de germinação.

### 2.4 Crescimento e aclimatização de plântulas somáticas

Os embriões somáticos com protusão radicular originados do tratamento com triclopyr ( $100 \text{ } \mu\text{M}$ ) foram transferidos para meio de cultura MS, com  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  mio-inositol,  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose, e  $1 \text{ g L}^{-1}$  PVP. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da adição do ágar-ágar ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ). E foram mantidos em sala de crescimento a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 8/16 horas luz/escuro, intensidade luminosa de  $30 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  até a obtenção de plântulas com aproximadamente 5 cm, duas folhas expandidas e no mínimo duas raízes.

As plântulas foram transferidas para meio de cultura MS, com  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  mio-inositol,  $1 \text{ g L}^{-1}$  PVP, e  $4 \text{ g L}^{-1}$  ágar-ágar. Após 30 dias, os tubos com as plântulas foram colocados sob temperatura ambiente, e após sete dias foram

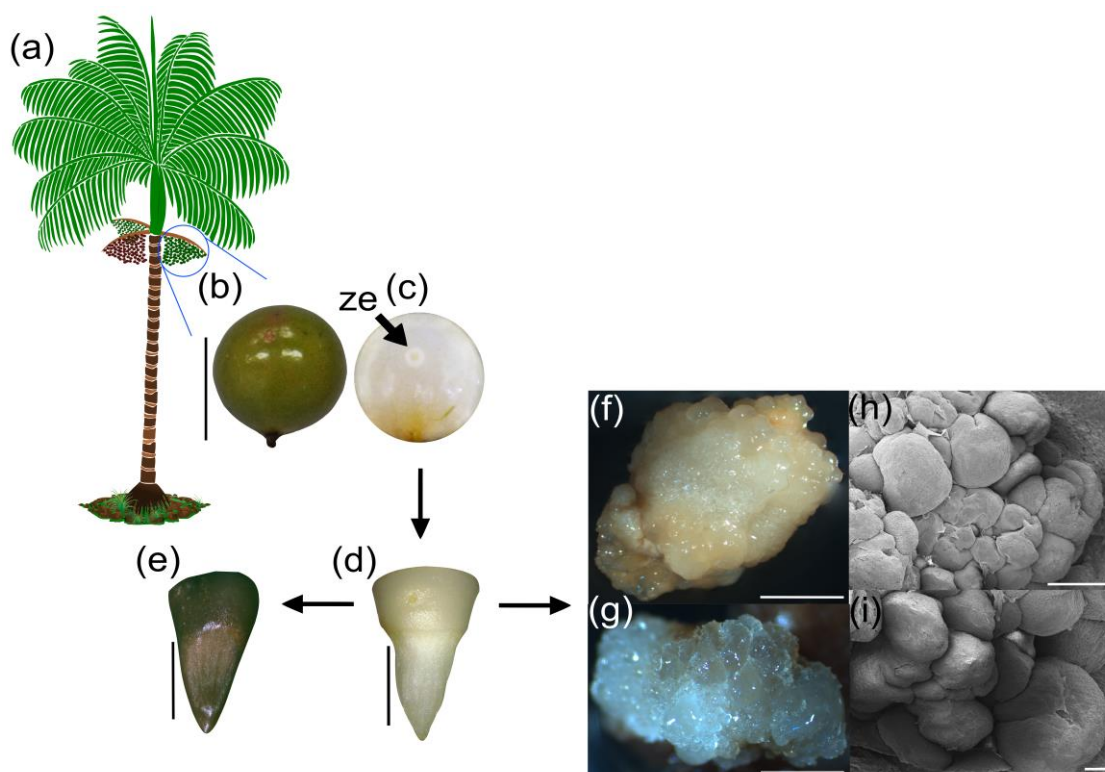
transferidas para o ambiente *ex vitro*, acondicionadas em copos plásticos (590 mL) contendo substrato (TerraNutri®) autoclavado e umedecido com água destilada e autoclavada. O copo foi coberto com outro copo (300 mL) para manter a umidade nos primeiros sete dias, após esse período, a cada dois dias foram realizados dois furos ( $\Theta = 0,5$  cm) no copo superior, por mais dez dias, quando foi retirado.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Indução

##### 3.1.1 Experimento I

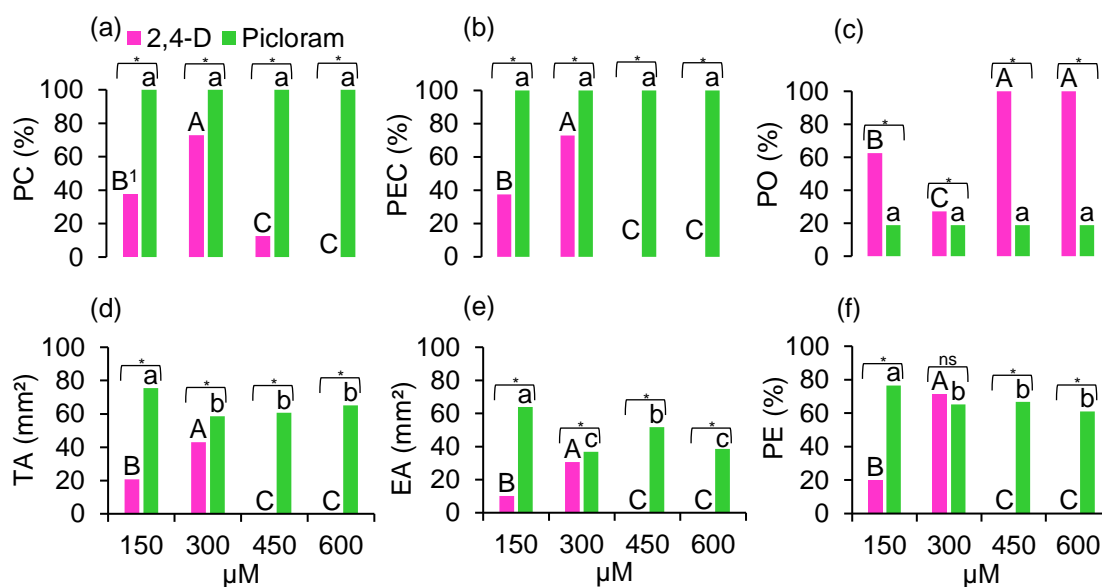
Os embriões zigóticos retirados das sementes de *E. edulis* (Figura 1) que foram tratados com 2,4-D, a maioria oxidou antes mesmo de calejar (Figura 1e), principalmente nas concentrações de 450 e 600  $\mu\text{M}$  (100%) (Figura 2c). Já os embriões zigóticos tratados com picloram calejaram 100% (Figura 2a, b), formando regiões embriogênicas e pró-embriões somáticos, em destaque a concentração de 150  $\mu\text{M}$  (Figura 1f-i).



**Figura 1.** Ilustração botânica da palmeira *E. edulis* em frutificação (a), fruto imaturo (b), semente imatura (ze. embrião zigótico) (c), embrião zigótico destacado da semente (d), embrião zigótico oxidado (e), calo embriogênico tratado com picloram 150  $\mu\text{M}$  (f), área embriogênica (g), MEV da

área embriogênica (h, i). Barra: 1,0 cm (a); 5000  $\mu\text{m}$  (f), 2000  $\mu\text{m}$  (d, e, g), 1000  $\mu\text{m}$  (h), 200  $\mu\text{m}$  (i).

Não houve ajuste do modelo de regressão para as variáveis. No entanto, houve interação significativa entre todas as variáveis para os dois fatores, indutor embriogênico e concentração (Figura 2 a-f). Houve uma grande diferença entre 2,4-D e picloram para todas as variáveis, destacando-se o picloram com as maiores médias de porcentagem de calos (PC), porcentagem de calos embriogênicos (PEC) área total de calos (TA), área embriogênica (EA), e porcentagem embriogênica (PE); e menores médias de porcentagem de oxidação (PO).

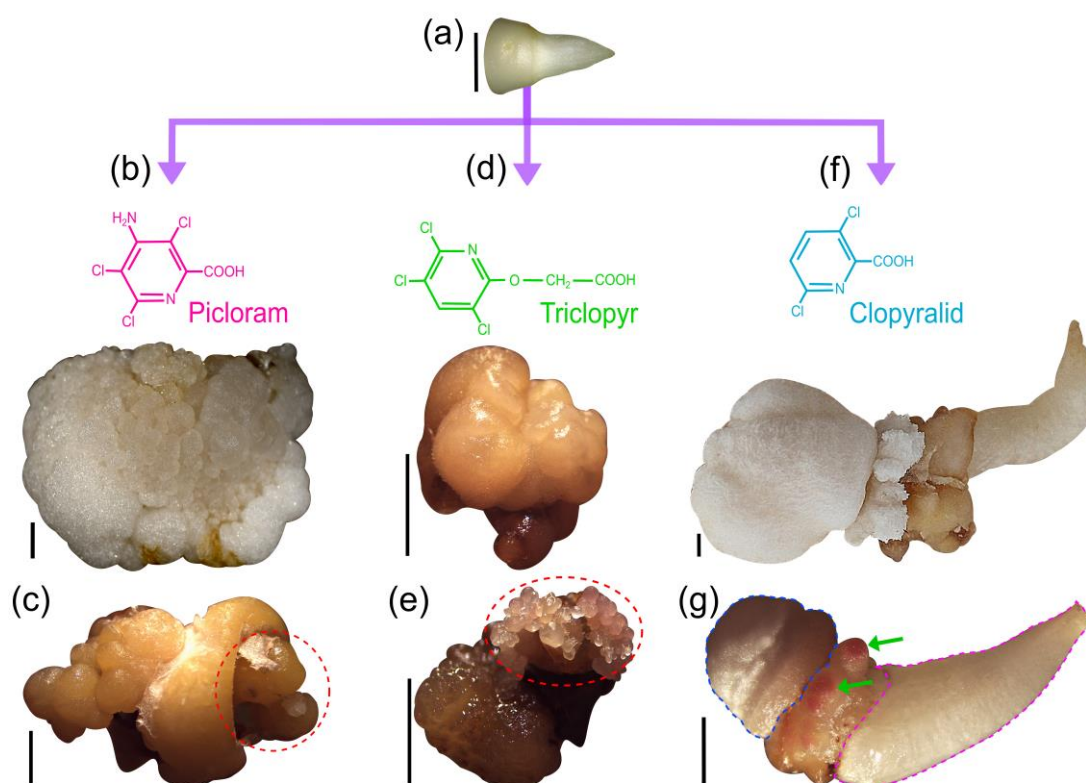


**Figura 2.** Indução de embriogênese somática em embriões zigóticos imaturos de *E. edulis* após tratamentos com 2,4-D e picloram, (a) porcentagem de calos - PC, (b) porcentagem de calos embriogênicos - PEC, (c) porcentagem de oxidação - PO, (d) área total de calos - TA ( $\text{mm}^2$ ), (e) área embriogênica ( $\text{mm}^2$ ), e (f) porcentagem de área embriogênica - PE. <sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula (2,4-D) e minúscula (picloram), entre as concentrações e indutores embriogênicos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Significativo ( $p < 0,05$ ) e <sup>ns</sup>não significativo pelo teste F, entre os dois indutores embriogênicos.

### 3.1.2 Experimento II

Os embriões zigóticos tratados com as concentrações de picloram e triclopyr originaram calos de diferentes naturezas, não-embriogênicos e embriogênicos (Figura 3a-e). Para ambos os indutores, os calos embriogênicos

possuem regiões embriogênicas (Figura 3c, e), no entanto, essas regiões dos calos tratados com triclopyr, após 170 dias, já possuíam embriões somáticos (Figura 3e). Enquanto a maioria dos embriões zigóticos tratados com clopyralid, formaram estruturas não-embriogênicas e plântulas anormais (Figura 3f, g).



**Figura 3.** Embrião zigótico de *E. edulis* usado como explante para indução embriogênica (a); molécula de picloram e respectivos calos não-embriogênico (b) e embriogênico (c), destacado a área embriogênica (tracejado vermelho); molécula de triclopyr e respectivos calos não-embriogênico (d) e embriogênico (e), em destaque área embriogênica com embriões somáticos (tracejado vermelho); e molécula de clopyralid respectivos estruturas não-embriogênicas (plântulas anormais) (f), plântula anormal com haustório (tracejado azul), raízes (setas verdes) e caulículo (tracejado rosa) (g). Barra: 2000  $\mu$ M (a-g).

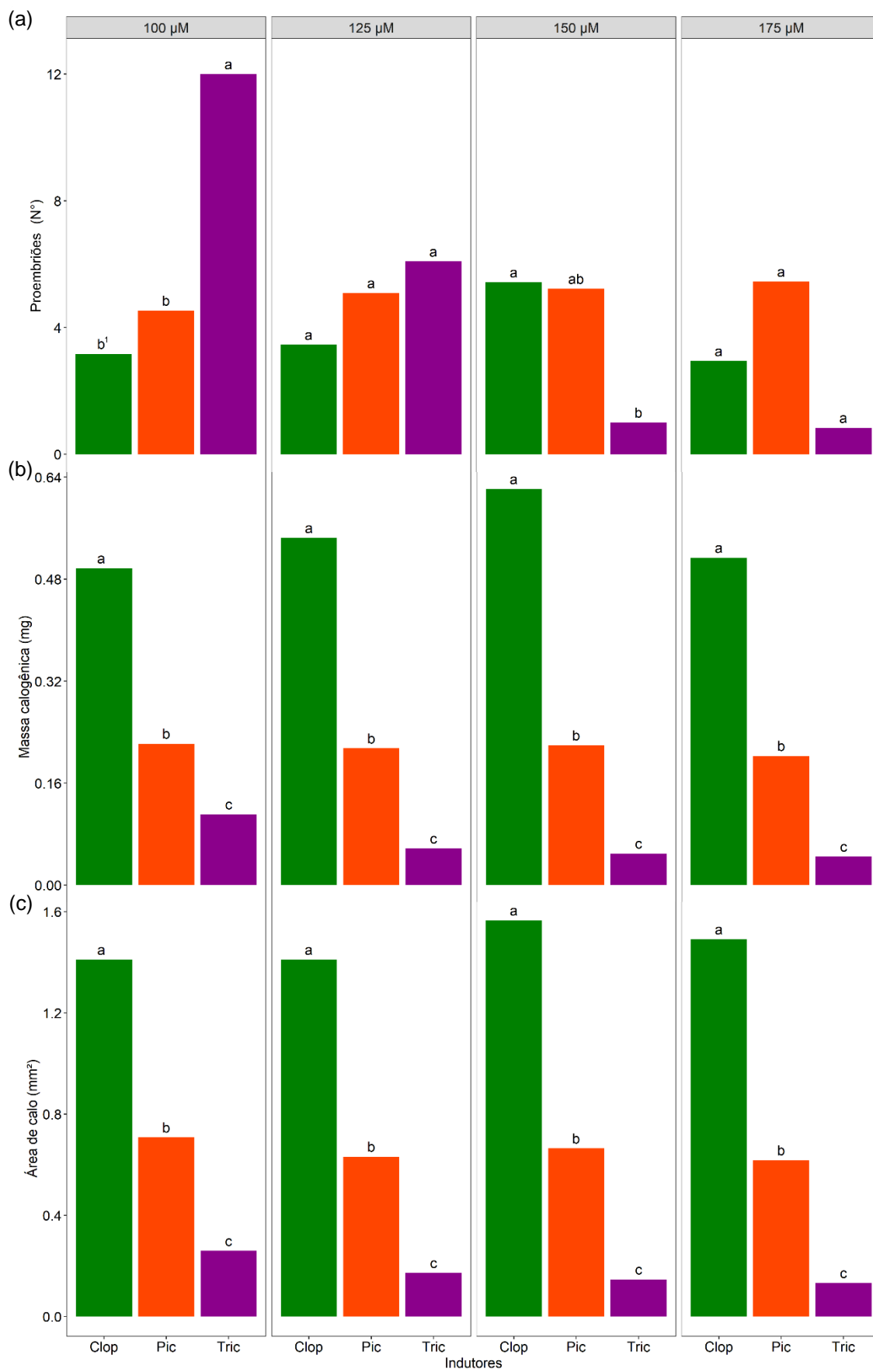
Houve interação significativa entre os fatores indutor e concentrações para as variáveis proembrião (PE), massa calogênica (MC) e área de calos (AC). Na taxa de indução (TI) houve diferença significativa entre indutores e entre concentrações, enquanto a taxa de calogênese (TC) e oxidação (O) foi significativo somente entre os indutores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Significância de cada variável dentro de cada fator ( $p < 0.05$ )

<b>Fatores</b>	<b>PE (Nº)</b>	<b>TC (%)</b>	<b>TI (%)</b>	<b>MC (mg)</b>	<b>AC (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>O (%)</b>
<b>Indutores (I)</b>	ns	*	*	*	*	*
<b>Concentração (C)</b>	*	ns	*	*	*	ns
<b>IxC</b>	*	ns	ns	*	*	ns

\*Significativo; ns. não significativo. PE. proembrião; TC. taxa de calogênese; TI. taxa de indução; MC. massa calogênica; AC. área de calos; O. oxidação.

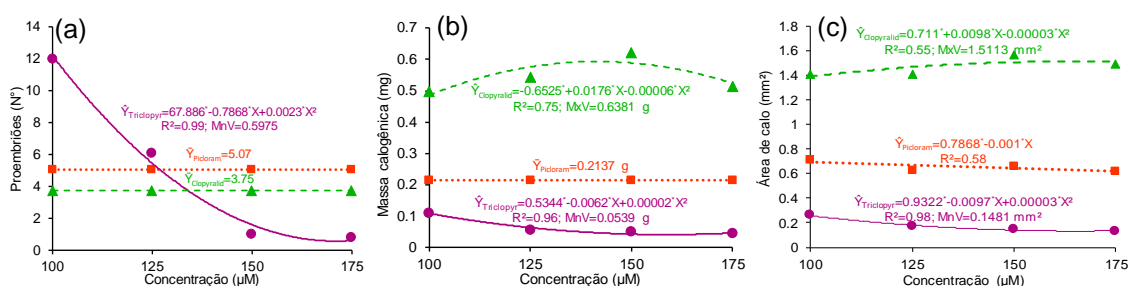
O indutor triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ) se destacou dos demais indutores na formação de proembriões (12) (Figura 4a), diminuindo com o aumento das concentrações (Figura 5a). No entanto, obteve as menores médias de massa calogênica e área de calo comparado aos outros indutores (picloram e clopyralid) e concentrações (100, 125, 150 e 175  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4b, c). Apesar do clopyralid possuir as maiores médias de massa calogênica e área de calo, as estruturas eram não-embriogênicas formadas por plântulas anormais, em todas as concentrações.



**Figura 4.** Número de proembrões somáticos (a), massa calogênica (mg) (b) e área de calo ( $\text{mm}^2$ )

(c) de *E. edulis* após 170 dias submetidos a meio de cultura com três indutores embriogênicos (clopyralid – Clop, picloram – Pic, triclopyr – Tri) em diferentes concentrações (100, 125, 150 e 175  $\mu\text{M}$ ). \*Médias não seguidas de mesma letra na comparação entre os indutores diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

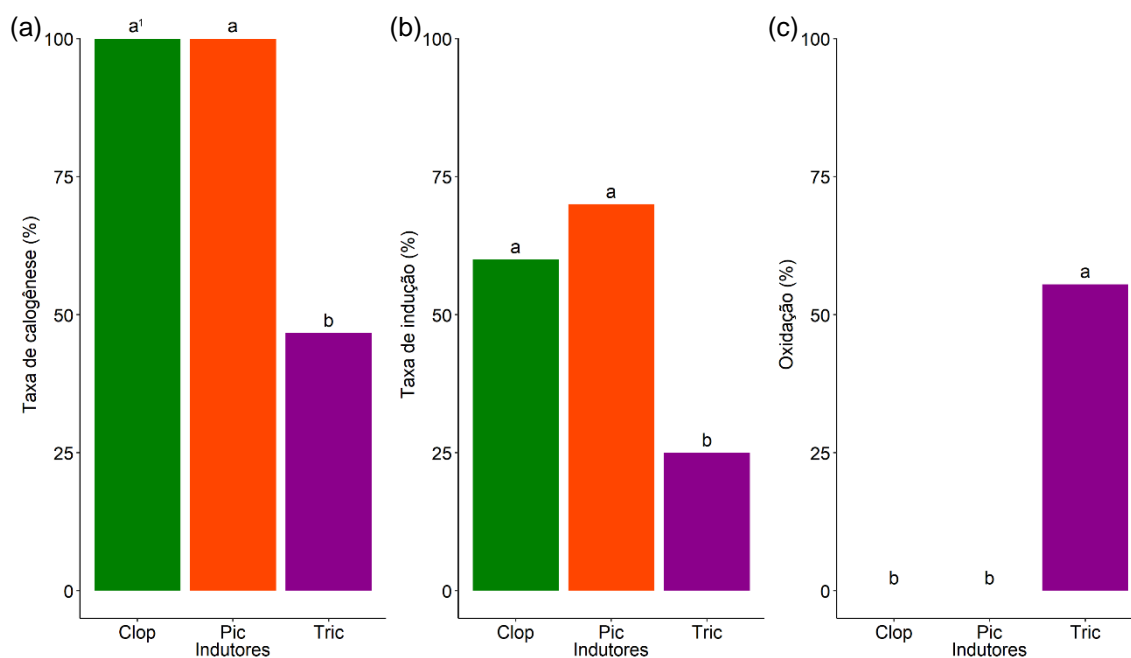
Os indutores apresentam resultados completamente distintos entre si, nas concentrações testadas (Figura 5). O número de proembriões e a massa calogênica entre as concentrações de picloram não diferiram, apresentando uma média de 5,07 proembriões e 0,2137 g (Figura 5a, b). Já o triclopyr diminui seu número de proembriões, e massa e área calogênica com o aumento das concentrações testadas, enquanto o clopyralid apresentou uma formação de massa e área calogênica quadrática (Figura 5b, c).



**Figura 5.** Número de proembriões somáticos (a), massa calogênica (g) (b) e área de calo ( $\text{mm}^2$ ) (c) de *E. edulis* após 170 dias submetidos a meio de cultura com três indutores embriogênicos (clopyralid, triclopyr e picloram) em diferentes concentrações (100, 125, 150 e 175  $\mu\text{M}$ ). \*Coeficiente estatisticamente significativo a 5% pelo teste t). MxV. Valor máximo; MnV. Valor mínimo.

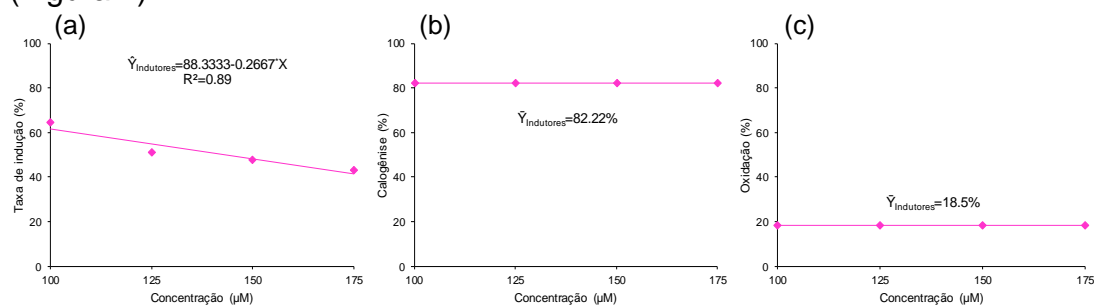
O clopyralid e picloram apresentaram as maiores médias de taxa calogênica e de indução, diferindo-se do triclopyr que devido a maior porcentagem de oxidação do explante, obteve menores médias de taxa calogênica e de indução (Figura 6).





**Figura 6.** Calogênese (%) (a), taxa de indução (%) (b) e oxidação (%) (c) de *E. edulis* após 170 dias submetidos a meio de cultura com três indutores embriogênicos (clopýralid, picloram e triclopyr) em diferentes concentrações (100, 125, 150 e 175  $\mu\text{M}$ ). <sup>1</sup>Médias não seguidas de mesma letra na comparação entre os indutores diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

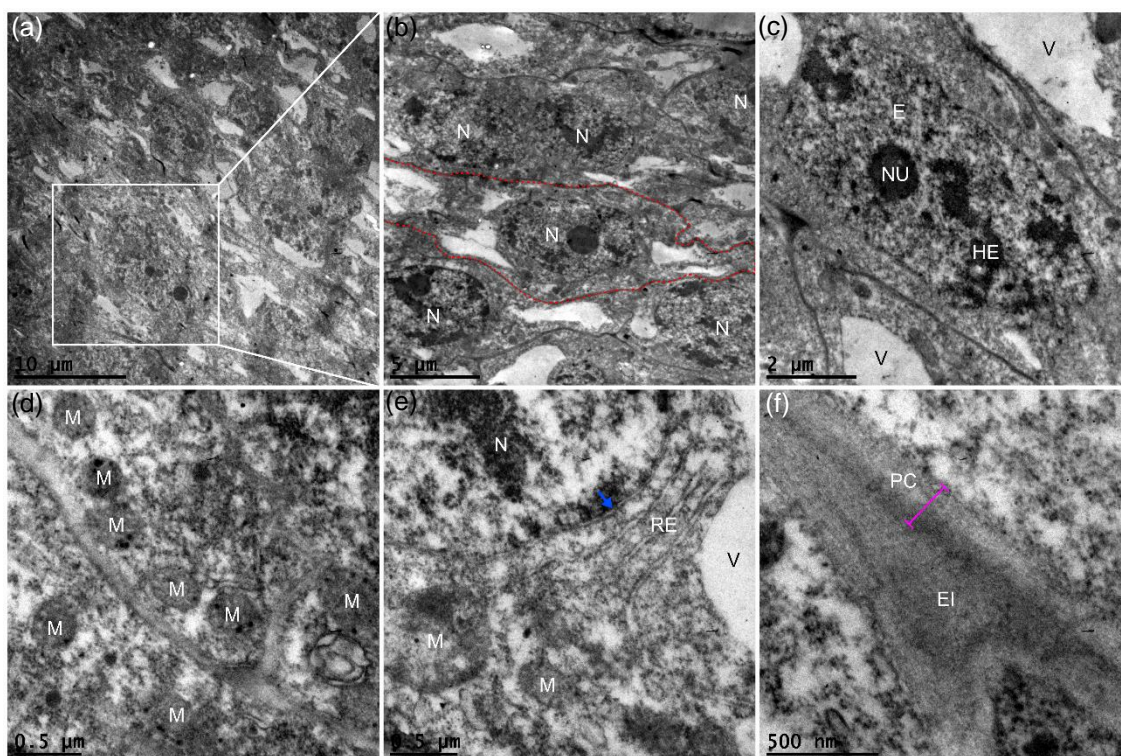
A taxa de indução diminui linearmente com o aumento das concentrações dos indutores, enquanto a calogênese e oxidação não diferem entre as concentrações dos indutores, com média de 82,22% e 18,5%, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7.** Taxa de indução (%), calogênese (%) (a), (b) e oxidação (%) (c) de *E. edulis* após 170 dias submetidos a meio de cultura com três reguladores de crescimento (clopýralid, picloram e triclopyr) em diferentes concentrações (100, 125, 150 e 175  $\mu\text{M}$ ). \*Coeficiente estatisticamente significativo a 5% pelo teste t.

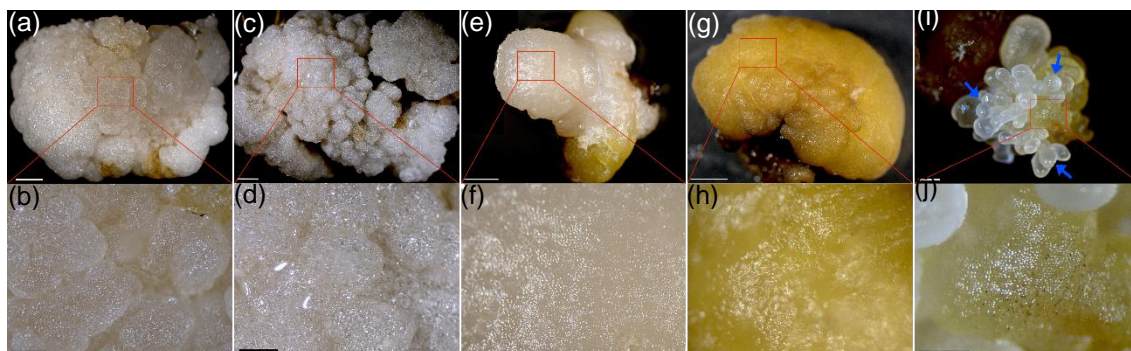
Os calos embriogênicos tratados com triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ) possuem células com características embriogênicas, com citoplasma denso, núcleos e nucléolos

evidentes, grandes e elétron-densos, núcleos com formato irregular, maior relação núcleo/citoplasma, com vacuome fragmentado (Figuras 8 a, b); menor teor de heterocromatina x eucromatina, numerosas mitocôndrias, e retículo endoplasmático visível (Figuras 8c, d, e); e componentes celulares intimamente ligados a parede celular, com paredes celulares espessas e espaço intercelular visível (Figura 8f).



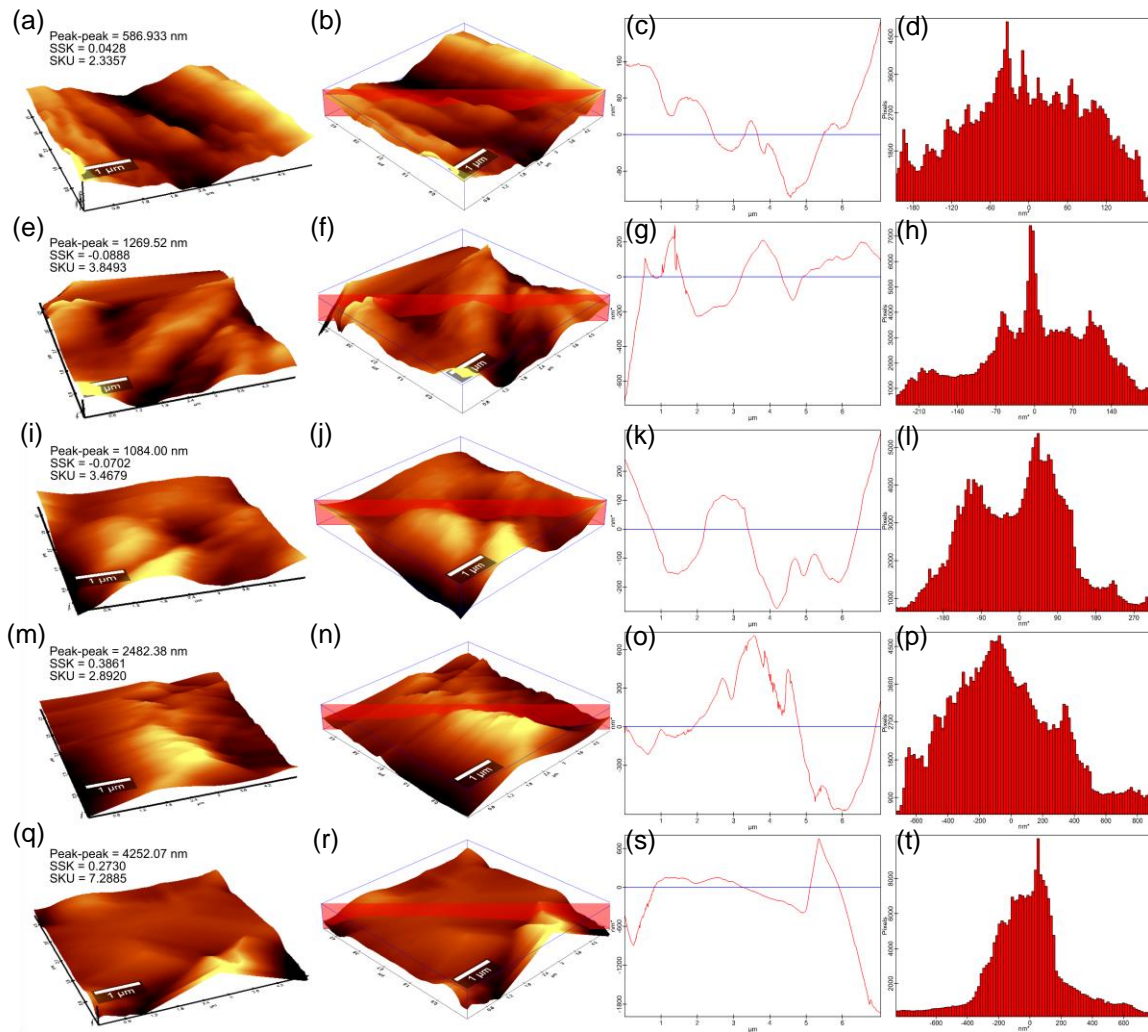
**Figura 8.** Tecido embriogênico de calos tratados com triclopyr (100 µM) (a), célula (tracejado em vermelho) e núcleos (N) (b), nucléolo (NU), heterocromatina (HE), eucromatina (E) e vacúolos (V) (c), mitocôndria (M) (d), núcleo com destaque da membrana nuclear (seta azul), retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias (e), parede celular (PC), espaço intercelular (EI) (f).

O picloram induziu a formação de diferentes tipos de calos, calos não-embriogênicos, como calos rugosos brancos opacos, rugosos brancos esponjosos, lisos brancos, e lisos amarelos (Figuras 9a-h); e calos embriogênicos, rugosos amarelos (Figuras 9i, j).



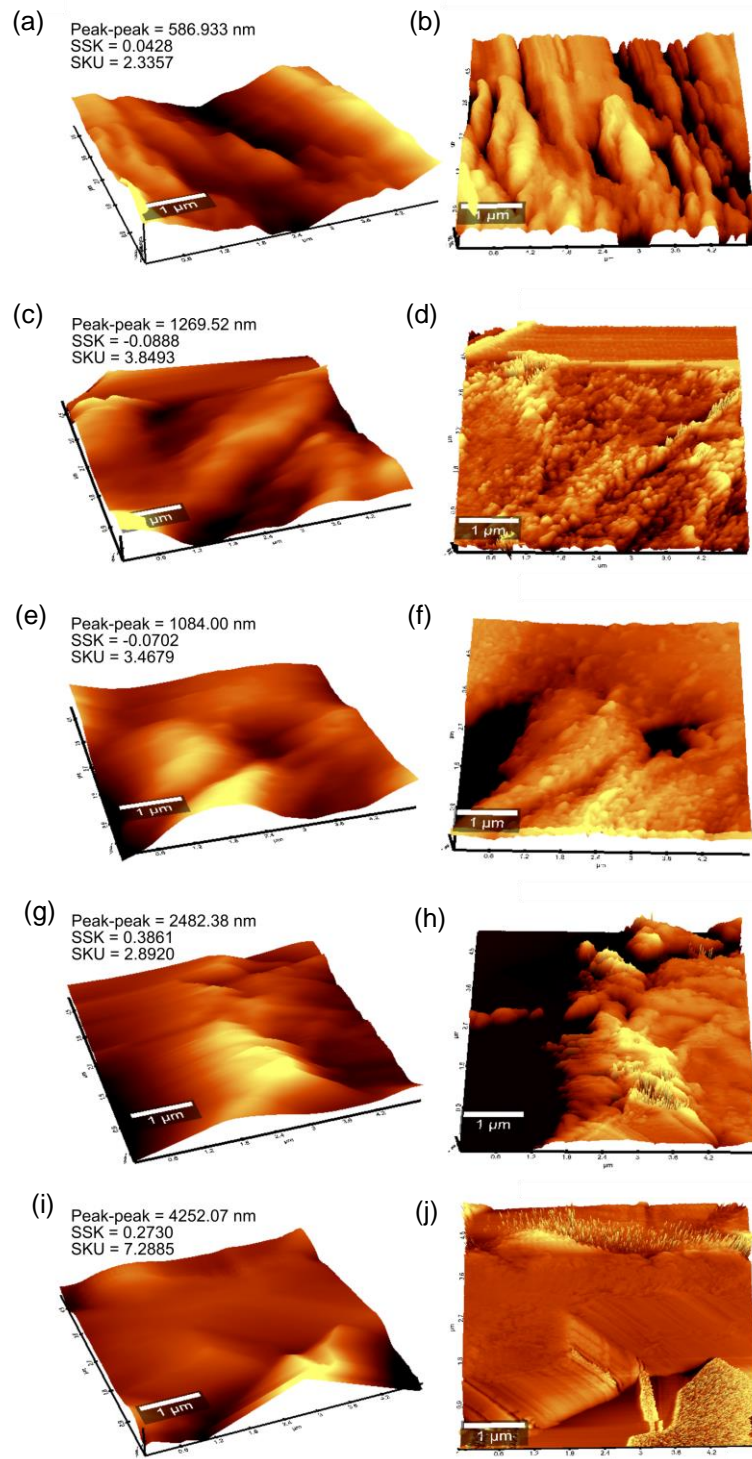
**Figura 9.** Calos oriundos de indução embriogênica de *E. edulis* com picloram (150  $\mu\text{M}$ ) não-embriogênicos: calo rugoso branco opaco (a, b), calo rugoso branco esponjoso (c, d), calo liso branco (e, f), calo liso amarelo (g, h); e calo embriogênico, calo rugoso amarelo (i, j), com embriões somáticos (setas azuis). Barra de escala: 2000  $\mu\text{M}$  (a, c, e, g), 1000  $\mu\text{M}$  (b, d), 500  $\mu\text{M}$  (f, h, i), 200  $\mu\text{M}$  (j).

Com a análise ultraestrutural AFM, foi possível observar a diferença de topografia, perfil e elasticidade de cada tipo de calo, podendo identificar um padrão de rugosidade (Figura 10). O calo rugoso branco opaco, possui o menor pico a pico (586,933 nm), comparado aos demais calos (Figura 10). Os calos rugoso branco esponjoso e liso branco possuem características semelhantes, com pico a pico de 1269,52 e 1084,00 nm (respectivamente), com predominância e vales ( $\text{SSK} < 0$ ), e simetria semelhante ( $\text{SKU}$ ). Já o calo liso amarelo foi o mais simétrico ( $\text{SKU} \approx 3$ ), com maior equilíbrio entre picos e vales (Figura 10o). Apesar das diferenças entre os calos não-embriogênicos, há um padrão de rugosidade e simetria, diferenciando do calo embriogênico (rugoso amarelo), com o maior pico a pico (4252,07 nm), com predominância de picos, e a maior assimetria ( $\text{SKU} = 7,2885$ ) (Figuras 2q-t).



**Figura 10.** Imagem da superfície do calo por AFM. Topografia (a-q), *cross section* (b-r), gráfico (c-s) e histograma da imagem de topografia de calo não-embriogênico (d-t): rugoso branco opaco (a-d), rugoso branco esponjoso (e-h), liso branco (i-l), liso amarelo (m-p); e calo embriogênico, calo rugoso amarelo (q-t).

Com o gráfico de fase foi possível observar a variação de elasticidade de cada calo (Figura 11). Entre os calos não-embriogênicos, a maior variação de fases ocorreu no calo rugoso branco opaco, enquanto o calo embriogênico não houve muitas alterações (Figura 11j).

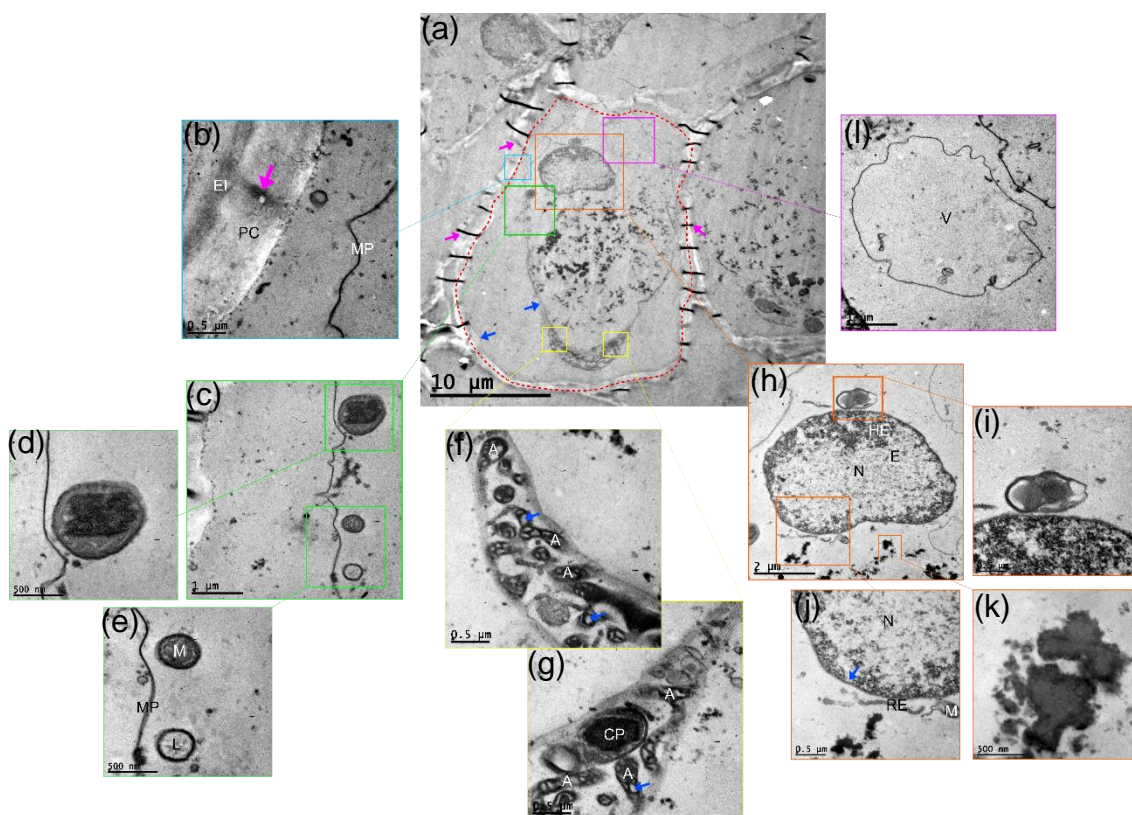


**Figura 11.** Imagem da superfície do calo por AFM. Topografia e fase de calo não-embriogênico: rugoso branco opaco (a, b), rugoso branco esponjoso (c, d), liso branco (e, f), liso amarelo (g, h); e calo embriogênico, calo rugoso amarelo (i, j).

### 3.2 Maturação e germinação

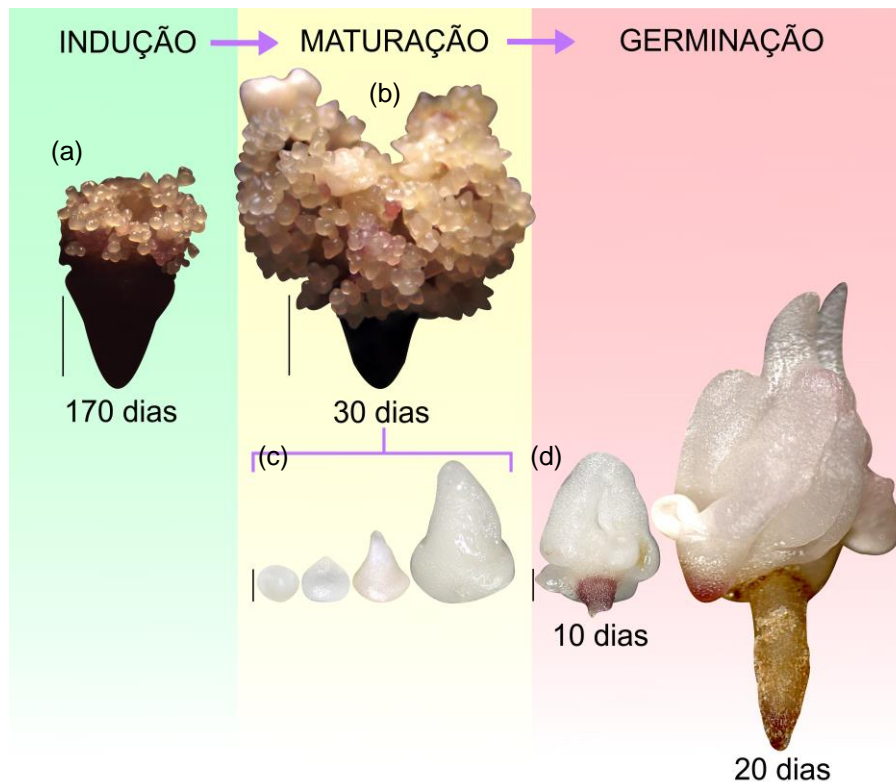
Os calos embriogênicos oriundos do tratamento com picloram não houve modificações visíveis ao longo da maturação. No entanto em nível celular, as

células apresentaram plasmolizadas e com características de morte celular, como organelas escassas, com raras mitocôndrias, lisossomos, amiloplastos, e retículo endoplasmático, e a degeneração do citoplasma (Figura 12).



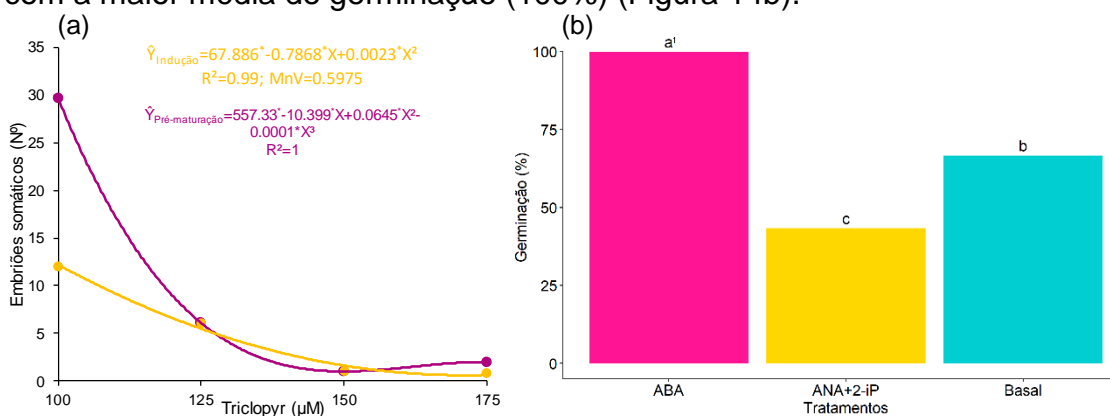
**Figura 12.** Célula (tracejado em vermelho) de calos embriogênicos na maturação, oriundos da indução de picloram ( $150 \mu\text{M}$ ), parede celular, membrana plasmática (setas azuis) e plasmodesmos (setas rosas) (a). Parede celular (PC), espaço intercelular (EI), membrana plasmática (MP) e plasmodesmo (seta rosa) (b), organelas próximas a membrana plasmática (c), plastídeo (d), mitocôndria (M) e lisossomo (L) (e), amiloplastos (A) e amidos (setas azuis) (f, g), corpo proteico (CP) (g), núcleo (N), heterocromatina (HE), eucromatina (E) (h), plastídeo (i), retículo endoplasmático (RE), membrana nuclear - seta azul (j), degeneração do citoplasma (k), vacúolo (V) (l).

Após 30 dias dos calos oriundos do triclopyr ( $100 \mu\text{M}$ ) em pré-maturação (meio basal), os embriões somáticos multiplicaram 153,44% em relação ao número de embriões somáticos em meio de indução (Figuras 13a, b, 14a). No entanto, os embriões somáticos permaneceram com o crescimento assíncrono, podendo observar embriões nos diferentes estádios (globular, escutelar e coleoptilar) e diferentes tamanhos (Figura 13c).



**Figura 13.** Calo embriogênico tratado com triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ) na indução, com surgimento de embriões somáticos (a); calo embriogênico na maturação, após 30 dias em meio de cultura basal (b) com embriões somáticos assíncronos (c), embrião somático na germinação após 10 e 20 dias (d). Barra: 2000  $\mu\text{m}$  (a, b), 500  $\mu\text{m}$  (c, d).

Os embriões somáticos começaram a germinar após 10 dias nos meios de cultura suplementado com ABA, ANA+2-iP e em basal, e após 20 dias foi possível observar a formação de uma plântula somática normal (parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos) (Figura 13d). Os embriões somáticos no meio de cultura suplementado com ABA destacaram-se dos demais tratamentos com a maior média de germinação (100%) (Figura 14b).

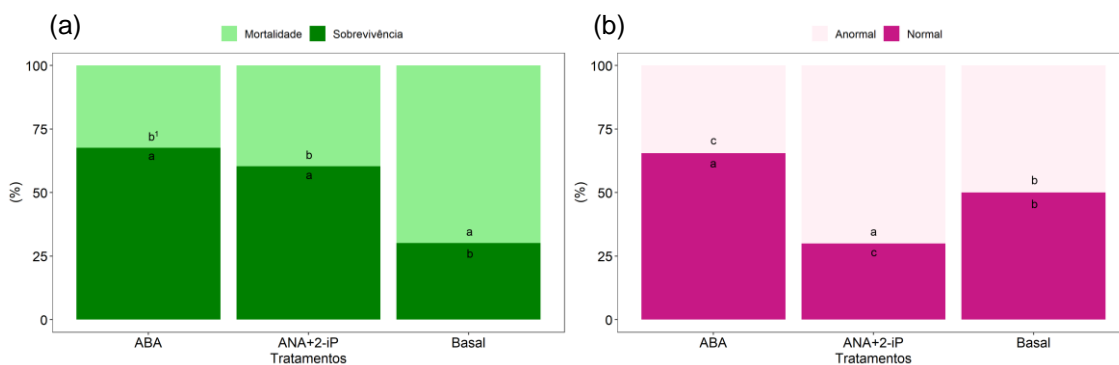


**Figura 14.** Número de embriões somáticos oriundos da indução de triclopyr de *E. edulis* em

diferentes concentrações (100, 125, 150 e 175  $\mu\text{M}$ ), na indução e após 30 dias em meio de cultura basal (a). Germinação de embriões somáticos oriundos do tratamento com triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ) nos diferentes tratamentos de maturação (ABA, ANA+2-iP e meio de cultura basal). \*Coeficiente estatisticamente significativo a 5% pelo teste t. <sup>1</sup>Médias não seguidas de mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Crescimento e aclimatização de plântulas somáticas

Após a transferência das plântulas somáticas recém germinadas para o meio basal em tubos de ensaio para o seu crescimento, a maior sobrevivência ocorreu nas plântulas somáticas oriundas do meio de cultura suplementado com ABA e ANA+2-iP (67,58 e 60,32%, respectivamente), conseqüentemente, a maior mortalidade ocorreu no meio basal (69,84%) (Figura 15a).



**Figura 15.** Porcentagem de mortalidade e sobrevivência de embriões somáticos germinados (a) e plântulas somáticas anormais e normais (b), oriundos do tratamento com triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ) nos diferentes tratamentos de maturação (ABA, ANA+2-iP e meio de cultura basal). <sup>1</sup>Médias não seguidas de mesma letra diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As plântulas somáticas oriundas do meio de cultura com ABA também se destacaram com a maior média de plântulas somáticas normais (65,48%) (Figura 15b). No entanto, a maior média de plântulas somáticas anormais ocorreu no meio de cultura com ANA+2-iP (70%) (Figura 15b), com a formação de plântulas somáticas com coleto espesso e/ou a ausência da formação da parte aérea ou de raiz. As plântulas somáticas permaneceram verdes durante todo o processo de aclimatização (Figura 16).





**Figura 16.** Acclimatização de plântulas oriundas da indução com triclopyr ( $100 \mu\text{M}$ ) nos diferentes tratamentos de maturação (ABA, ANA+2-iP e meio de cultura basal) (a-e). Barra: 1 cm (b-d), 2 cm (a, e).

#### 4 DISCUSSÃO

Anormalidades em embriões somáticos (SE) podem ser geradas por alterações genéticas ou epigenéticas no DNA. Essas alterações no DNA podem ser influenciadas por fatores externos como o uso de reguladores de crescimento de plantas (RCP) e substâncias mutagênicas ou fatores de estresse aplicados ao tecido vegetal como altas e baixas temperaturas, seca, salinidade e metais pesados (GARCIA et al., 2019). Segundo esses autores, o 2,4-D é uma auxina potente que permanece no tecido por um longo período (residual alto), de difícil remoção.

No presente trabalho, com o uso dos indutores auxínicos 2,4-D e picloram (PIC), verificou-se baixíssima eficiência do 2,4-D e alta do PIC ( $150 \mu\text{M}$ ) na

embriogênese somática de *E. edulis*. Uma das explicações da baixa efetividade do 2,4-D é a alta taxa de oxidação principalmente nas concentrações mais elevadas, também observado por Ferreira et al. (2022) em embriões zigóticos de *E. precatória*, onde a eficiência do PIC foi 3,7 vezes maior do que o 2,4-D.

O 2,4-D presente em baixa concentração durante a fase de indução é necessário para a formação de calo embriogênico na linhagem M9-10a de *Medicago truncatula* Gaertn. e conseqüentemente para o desenvolvimento embrionário (Orlowska; Kępczyńska, 2020). Entretanto, 2,4-D em maior concentração causa aumento no acúmulo de  $O_2^{\cdot-}$  que perturba a formação de calos e embriões, acompanhado por um aumento na expressão dos genes *CLF*, *MSI1*, *FIE* e *VRN2*, codificam proteínas do complexo PRC2, que pode ser a causa de distúrbios no calo e desenvolvimento embrionário em *M. truncatula*. Oliveira et al. (2022), verificaram resultados superiores com o uso do PIC (300  $\mu$ M, 76,33 embriões) em relação ao 2,4-D (159,42  $\mu$ M, 44,33 embriões), na embriogênese somática de *E. edulis*.

Quimicamente, o 2,4-D é um ácido fenoxiacético, obtido do composto fenol e classificado como fenoxialcanoatos dentro da classe das auxinas sintéticas. Já os picloram, triclopyr e clopyralid pertencem à classe dos piridinacarboxilatos, tendo em comum o anel piridínio e o grupo carboxílico (DUKE; DAYAN, 2011), diferenciando-os, quimicamente, do 2,4-D. A presença do grupo carboxílico pode ter grande importância na sua atuação mais efetiva na embriogênese somática em *E. edulis*, e o nitrogênio presente no referido anel, pode ser importante no mecanismo de ação do picloram e de seus análogos.

O picloram e o triclopyr também apresentam em comum a presença de três átomos de cloro, já o 2,4-D e o clopyralid, apesar de serem de classes diferentes, possuem em comum dois átomos de cloro. O triclopyr apresentou a melhor atividade na embriogênese somática em *E. edulis*, devido as especificidades do meio biológico, a sua estrutura contém os ligantes que contribuem para sua atuação como auxina sintética mais efetiva nesse caso. Em *Carica papaya* L. verificou-se uma responsividade embriogênica muito superior com o uso do 4-CPA (4-clorofenoxiacético) se comparado ao 2,4-D, indicando que há diferença entre as duas moléculas é o número de átomos de cloro (CIPRIANO et al., 2018).

O triclopyr é rapidamente translocado na planta, principalmente pela via simplástica, o que permite uma absorção seletiva dos solutos, e se acumula no tecido meristemático (CESSNA; GROVER; WAITE, 2002), onde se encontra a maior quantidade de tecidos pouco diferenciados e/ou não diferenciados, com células com núcleos grandes e citoplasma denso (como visualizado nas células tratadas com triclopyr (100  $\mu$ M) (Figura 8), em processo de divisão celular (GOMES; BARTOS, SCHERWINSKI-PEREIRA, 2017; MEIRA et al., 2020). Já o clopyralid, também induz respostas do tipo auxina, no entanto, seus efeitos sobre a síntese de RNA e proteínas assemelha-se ao 2,4-D (TURNBULL; STEPHENSON, 1985). Portanto, o triclopyr, utilizado principalmente como herbicida, torna-se um promissor indutor embriogênico e inédito, sobretudo para espécies responsivas ao picloram.

A resposta da indução embriogênica indireta inicialmente é investigada em calos utilizando de análises diversas, dentre estas utilizou-se da microscopia eletrônica de força atômica (AFM) que é inédita na cultura de tecidos vegetais e diferente da microscopia eletrônica de varredura (MEV), por exemplo, é uma metodologia que não exige preparações onerosas de amostras. Os calos seguem diretamente da cultura de tecidos para a análise no AFM, ou apenas necessitam que sejam desidratados e secos, o que facilita, além de ser um procedimento não oneroso. Com a AFM foram identificadas diferenças qualitativas e quantitativas entre os tipos de calos, como topografia, perfil, elasticidade, rugosidade e simetria. Mediante este conjunto de dados, é eficiente para diferenciar calos embriogênicos dos não-embriogênicos. Confirmando, portanto, a validação desta metodologia, para investigar diferentes tipos de calos na embriogênese somática de *E. edulis*.

O meio de pré-maturação (sem reguladores) foi essencial para o crescimento e desenvolvimento dos embriões somáticos, podendo ser observados embriões com aspecto leitoso em todos os estádios de maturação em 30 dias. E auxiliou para que ocorresse a germinação dos embriões em estágios mais avançados, no meio de maturação após 10 dias, e obtenção de plântulas após 20 dias. Em um estudo com *E. oleracea*, após 30 dias de cultivo em meio de diferenciação e maturação, detectou-se apenas o desenvolvimento

de embriões globulares brancos e compactos, e embriões somáticos com aspecto translúcido e em estágio de torpedo, e somente após 80 dias, estes apresentaram aspecto leitoso (FREITAS et al., 2016). Já em *E. precatoria*, após 60 dias em meio de diferenciação e maturação, a maioria dos embriões somáticos apresentou forma alongada, coloração esbranquiçada e tom opaco, semelhante ao estágio de desenvolvimento de torpedo (FERREIRA et al., 2022).

Na maturação e germinação dos embriões somáticos no presente estudo, 100% dos embriões isolados em meio suplementado com ABA (5  $\mu\text{M}$ ) germinaram, com 67,48% de sobrevivência e 65,48% de normalidade, sendo superior ao uso de ANA+2-iP (0,53+12,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente) e ao meio sem reguladores. As pesquisas com *E. edulis* começaram com Guerra e Handro (1988) em que, para o desenvolvimento dos embriões em plântulas somáticas, foi utilizado a suplementação do meio de cultura com ANA (2,68  $\mu\text{M}$ ) e 2-iP (24,6  $\mu\text{M}$ ), e posteriormente, os mesmos autores (1998) utilizaram ANA (0,53  $\mu\text{M}$ ) e 2-iP (12,3  $\mu\text{M}$ ), seguido de Oliveira et al. (2022), e Scherwinski-Pereira et al. (2012) e Freitas et al. (2016) com *E. oleracea*, e Ferreira et al. (2022) em *E. precatoria*.

A maioria dos estudos de embriogênese somática com *Euterpe* spp., a fase de germinação não é analisada quantitativamente, e sim apenas descrito que os embriões formaram plântulas somáticas normais (GUERRA; HANDRO, 1988; 1998; SALDANHA et al., 2006; 2012; FERREIRA et al., 2022). Somente Ledo et al. (2002) e Scherwinski-Pereira et al. (2012) quantificaram 14,2 e 20,2 embriões somáticos germinados por calo (respectivamente); e Freitas et al. (2016) obtiveram 58,7% de conversão de embriões somáticos em plantas.

## 5 CONCLUSÕES

Não se recomenda o uso do 2,4-D na embriogênese somática de *E. edulis*. E sim, picloram (150  $\mu\text{M}$ ) e, principalmente, seu análogo triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ).

Validação metodológica da microscopia de força atômica é inédita para a identificação de calos embriogênicos e não-embriogênicos na espécie *E. edulis*.

Embriões somáticos de *E. edulis* em pré-maturação (meio basal), provenientes de calos induzidos com triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ), multiplicaram cinco vezes mais.

A maturação e germinação dos embriões somáticos de *E. edulis* foi máxima em meio com ABA (5  $\mu$ M).

## 6 REFERÊNCIAS

BEULÉ, T.; CAMPS, C.; DEBIESSE, S.; TRANCHANT, C.; DUSSERT, S.; SABAU, X.; JALIGOT, E.; ALWEE, S. S. R. S.; TREGGAR, J. W. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormally in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 7, n. 1, p. 169-182, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0323-9>

CESSNA, A. J.; GROVER, R.; WAITE, D. T. **Environmental fate of triclopyr**. In: WARE, G. W. (eds). Reviews of environmental contamination and toxicology. New York: Springer, v. 174, p. 19-48, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4260-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4260-2_2)

CIPRIANO, J. L. D.; CRUZ, A. C. F.; MANCINI, K. C.; SCHMILDT, E. R.; LOPES, J. C.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S. Somatic embryogenesis in *Carica papaya* as affected by auxins and explants, and morphoanatomical-related aspects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 385-400, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160252>

CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe dulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 2, p. 134-142, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v32n2847>

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. **Bioactivity of herbicides**. In: MOO-YOUNG, M. (eds). Comprehensive Biotechnology (second edition). Pergamon: Elsevier, v. 4, p. 23-35, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00273-7>

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. x, p. y-y, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>

FREITAS, E. DE O.; MONTEIRO, T. R.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, n. 14, p. 126-135, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.044>

GARCIA, C.; ALMEIDA, A-A. F.; COSTA, M.; BRITTO, D.; VALLE, R.; ROYAERT, S.; MARELLI, J-P. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 193-212, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8>

GOH, D. K. S.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; MONTEUUIS, O.; BOM, M-C.

Evidence of somatic embryogenesis from root tip explants of the rattan *Calamus manan*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 35, n. 5, p. 424-427, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0060-7>

GOH, D. K. S.; BOM, M-C.; ALIOTTI, F.; ESCOUTE, J.; FERRIÈRE N.; MONTEUUIS, O. *In vitro* somatic embryogenesis in two major rattan species: *Calamus merrillii* and *Calamus subinermis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 37, n. 3, p. 375-381, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0066-2>

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Dynamics of morphological and anatomical changes in leaf tissues of an interspecific hybrid of oil palm during acquisition and development of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 131, p. 269-282, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1282-8>

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 7, p. 550-552, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00272754>

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 65-71. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02507151>

KARUN, A.; SIRIL, E. A.; RADHA, E.; PARTHASARATHY, V. A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v. 86, n. 12, p. 1623-1628, 2004.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000300004>

MARCO-BROWNA, J. L.; ARECOA, M. M.; SÁNCHEZ, R. M. T.; AFONSO, M. S. Adsorption of picloram herbicide on montmorillonite: Kinetic and equilibrium studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 449, n. 14, p.121-128, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.038>

MEIRA, F. S.; LUIS, Z. G.; CARDOSO, M. A. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 92, n. 3, p. e20180709, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180709>

MURASHIGE, T. M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and**

**select methods.** Melbourne: Termarcarphi Pty, 1981, 45p.

OLIVEIRA, L. B.; MELLO, T.; ARAUJO, C. P.; OLIVEIRA, J. P. B.; FERREIRA, A.; ZANARDO, E. C.; VIEIRA, L. M.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S.; CARVALHO, V. S. Morphoanatomical aspects of auxinic herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius - a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. , p. xx-yy, 2022. DOI: <https://doi.org/>

ORŁOWSKA, A.; KEPCZYŃSKA, E. Involvement of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the regulation of *Polycomb*, *Trithorax* and *LEC1*, *L1L*, *WUS*, *WOX5*, *STM* gene expression during somatic embryogenesis induction in *M. truncatula*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 142, p. 201-212, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01854-x>

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ROSE, R. J.; MANTIRI, F. R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S. K.; WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; SHEAHAN, M. B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: PUA, E. C.; DAVEY, M. R. (eds.). **Plant developmental biology biotechnological perspectives**. Springer-Verlag, Heidelberg, v. 2, p. 3-26, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02301-9>

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 228-235, 2006. DOI: <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v06n03a07>

SALDANHA, C. W.; 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, n. 3, p. 171-178, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-70332012000300002>

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, J. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 3, p. 501-508, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0115-z>

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, n. 1, 14-26, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

STEINMACHER, D. A.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, n. 1, p. 15-22, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9207-6>

TURNBULL, G. C.; STEPHENSON, G. R. Translocation of clopyralid and 2,4-D

in Canada thistle (*Cirsium arvense*). **Weed Science**, v. 33, n. 2, p. 143-147, 1985.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* HBK). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, n. 2, p. 149-156, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00035913>



## CAPÍTULO VII

### **Picloram na polaridade de segmentos de caulículo de plântulas em diferentes meios de cultura na embriogênese somática direta de *Euterpe edulis* Martius**

**Resumo:** *Euterpe edulis* Martius, mais conhecido como palmito juçara, é considerado uma iguaria e possui alto valor econômico, além de seu fruto ser considerado uma “super-fruta”, devido aos altos índices de antioxidantes. É uma espécie ameaçada de extinção, em que, seu único meio de propagação é via seminífera. Portanto, objetivou-se nessa pesquisa, analisar a responsividade de explantes de plântulas de *E. edulis* em relação a sua polaridade e, ao tipo e concentração de indutores embriogênicos. Foram colhidas sementes imaturas de uma matriz selecionada em Pedra Menina - ES/MG, Brasil, e colocadas para germinar *in vitro*. As plântulas com seis meses, foram segmentadas em quatro explantes, identificado de acordo com sua polaridade e dispostas em meio de cultura suplementado com picloram (PIC - 50, 100, 150, 200, 250, 300, 450 e 600  $\mu\text{M}$ ). E após a indução, os explantes foram transferidos para meio de maturação suplementado com 0,53  $\mu\text{M}$  de ácido 1-naftalenoacético e 12,3  $\mu\text{M}$  de 2-isopenteniladenina, avaliando dois tempos na maturação (30 e 60 dias). Após 60 dias na indução, ocorreu o surgimento de proembriões diretamente dos segmentos cauliculares, de forma assincrônica. Após a transferência para a maturação verificou-se, nos dois tempos, uma maior quantidade de embriões somáticos e massa. A polaridade do explante não influenciou à sua indução embriogênica, podendo serem utilizados quatro segmentos de caulículo por plântula. A indução da embriogênese somática ocorreu via direta por meio do regulador de crescimento auxínico PIC (150  $\mu\text{M}$ ). Em que, posteriormente na maturação, gerou uma maior quantidade de embriões somáticos. É recomendando a retirada dos explantes do meio de maturação após 30 dias.

**Palavras-chave:** juçara, indutores embriogênicos, picloram, ANA, 2-iP, cultura de tecidos vegetais.

**Abstract:** *Euterpe edulis* Martius, better known as juçara palm heart, is considered a delicacy and has high economic value, in addition to its fruit being considered a "super-fruit", due to the high levels of antioxidants. It is an endangered species, in which its only means of propagation is via seminiferous. Therefore, the objective of this research was to analyze the responsiveness of explants from *E. edulis* seedlings in relation to their polarity and to the type and concentration of embryogenic inducers. Immature seeds were collected from a selected matrix in Pedra Menina - ES/MG, Brazil, and placed to germinate *in vitro*. The six-month-old seedlings were segmented into four explants, identified according to their polarity and placed in a culture medium supplemented with picloram (PIC - 50, 100, 150, 200, 250, 300, 450 and 600  $\mu\text{M}$ ). And after induction, the explants were transferred to maturation medium supplemented with 0.53  $\mu\text{M}$  of 1-naphthaleneacetic acid and 12.3  $\mu\text{M}$  of 2-isopentenyladenine, evaluating two maturation times (30 and 60 days). After 60 days of induction, proembryos appeared directly from the stem segments, asynchronously. After the transfer for maturation, there was, at both times, a greater number of somatic embryos and mass. The polarity of the explant did not influence its embryogenic induction, and four stem segments per seedling could be used. The induction of somatic embryogenesis occurred directly through the auxinic growth regulator PIC (150  $\mu\text{M}$ ). In which, later in the maturation, it generated a greater number of somatic embryos. It is recommended to remove the explants from the maturation medium after 30 days.

**Keywords:** juçara, embryogenic inducers, picloram, NAA, 2-iP, plant tissue culture.

## 1 INTRODUÇÃO

*Euterpe edulis* Martius, mais conhecido como palmito juçara, é considerado uma iguaria e possui alto valor econômico, sendo o segundo produto não madeireiro mais exportado da Floresta Atlântica (BARROSO et al., 2019). Sua intensa exploração desde o final da década de 60, contribuiu para a degradação do meio ambiente e a ser uma espécie ameaçada de extinção (SCHULZ et al., 2016). Além do palmito, a fruta também tem chamado a atenção por apresentar semelhanças com *E. oleracea* Martius (açai), sendo considerado uma “super-fruta”, por apresentar propriedades nutricionais superiores ao açai, com a presença de compostos como a antocianinas, caracterizando-a como alimento funcional (SCHULZ et al., 2015).

O uso do fruto tem sido implementado como uma possibilidade sustentável de amenizar a exploração do palmito, uma vez que a colheita do fruto aumenta a renda econômica e o uso racional contribuindo para a conscientização ambiental e conseqüentemente a sua preservação (BIAZOTTO et al., 2019; SCHULZ et al., 2021), a considerar que é uma espécie que não perfilha diferentemente do açai (propagação natural). A sua propagação ainda é limitada somente ao uso de sementes, pois a espécie não emite brotações laterais (SCHULZ et al., 2016). Portanto, necessitando de desenvolvimento de protocolos de propagação que forneça mudas de qualidade, uniformes, e em larga escala.

A embriogênese somática, é um meio de produzir milhares de plantas idênticas a partir de um único explante (REE et al., 2020), podendo ser qualquer parte da planta. Essa técnica tem sido desafiadora para muitas espécies, principalmente *E. edulis*. Os únicos protocolos de embriogênese somática, para a espécie, foi desenvolvido por Guerra e Handro (1988; 1998), seguido por Saldanha et al. (2006; 2012), que utilizaram como explantes embriões zigóticos, inflorescências jovens, folhas jovens e parte aérea de plantas com 150 dias, e 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) como principal indutor. No entanto, nenhum protocolo foi satisfatório, exigindo novos estudos quanto à explantes mais responsivos e, tipo e concentração de indutores embriogênicos.

A concentração do indutor responsivo, normalmente, irá depender do tipo de explante, em virtude do gradiente hormonal local. O principal fluxo polar é o

da auxina e citocinina, a auxina pode ser rastreada a partir de tecidos apicais em direção à base da planta e posteriormente à ponta da raiz (SUN et al., 2013), o inverso para a citocinina.

Em explantes de segmentos do caulículo de plântulas de *E. edulis*, espera-se que sejam mais responsivos na base, próximo do coleto. Portanto, objetivou-se nessa pesquisa, analisar a responsividade de caulículo de plântulas de *E. edulis* em relação a sua polaridade e, ao tipo e concentração de indutores embriogênicos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta, desinfestação e estabelecimento

Os frutos de *E. edulis* foram colhidos de uma planta matriz de 6,7 m de altura e 13,4 cm de DAP (diâmetro na altura do peito - 1,30 m), localizada no distrito de Pedra Menina, no município de Dores do Rio Preto, Espírito Santo, Brasil próximo ao Parque Nacional do Caparaó, nas coordenadas 20°32'45,4" S, 41°49'35,7" W, e na altitude 951 m. A matriz foi selecionada devido ao maiores valores de diâmetro de fruto (14,52 e 14,46 mm), porcentagem de emergência (96%), massa seca de parte aérea (3,35 g) e raiz (1,63 g), acidez titulável (1,37% ácido cítrico) antocianinas (0,459 mg de cianidina 3-glicosídeo 100g<sup>-1</sup> de massa fresca) (os dados completos são apresentados no Capítulo I). A colheita dos frutos ocorreu com aproximadamente 164 dias após a antese, e encaminhados para Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES).

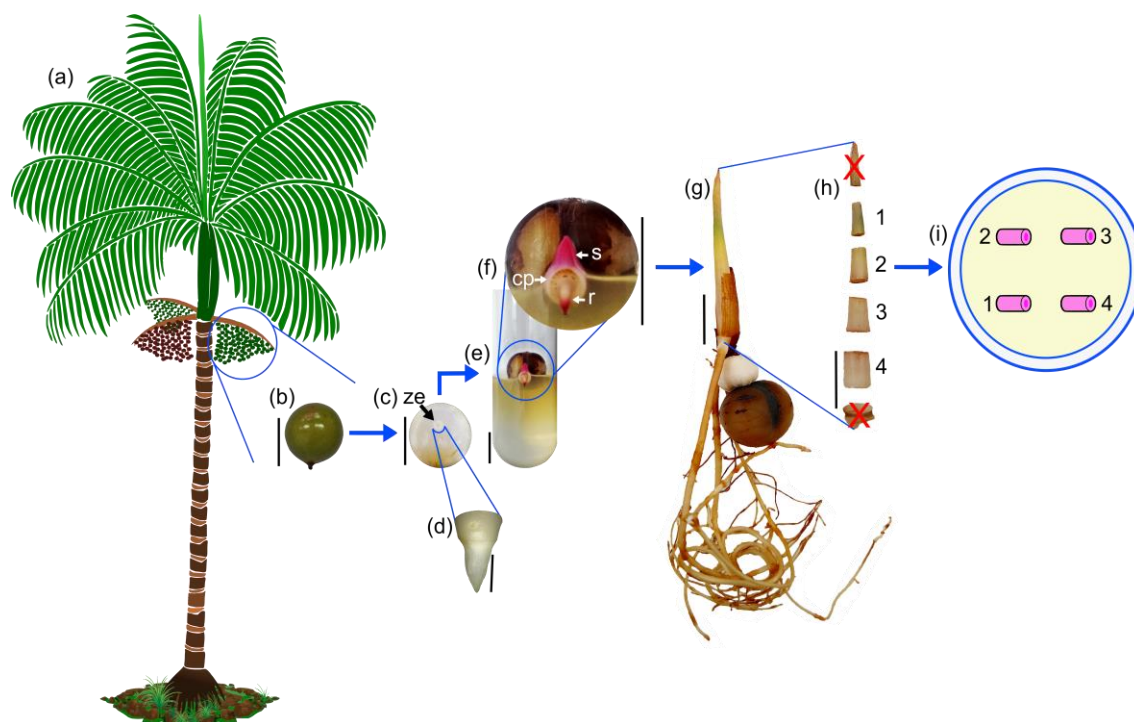
Após a limpeza dos frutos com água e detergente neutro, foi retirado o tegumento, e em seguida, os mesmos foram imersos em solução de ácido ascórbico (Dinâmica<sup>®</sup>) 2%. Na câmara de fluxo laminar, as sementes de *E. edulis* foram imersas em álcool etílico 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) (Candura<sup>®</sup>) 2,5% por 10 minutos e em solução de amoxicilina (Germed<sup>®</sup>) a 3 g L<sup>-1</sup> por 10 minutos, realizando-se a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada após cada agente desinfestante.

As sementes foram dispostas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma<sup>®</sup>),

suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) (Synth<sup>®</sup>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica<sup>®</sup>), 0,1 g L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma<sup>®</sup>), e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Kasvi<sup>®</sup>). O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  com hidróxido de potássio (KOH) (Alphatec<sup>®</sup>) e/ou ácido clorídrico (HCl) (Vetec<sup>®</sup>) a 1,0 N, antes da autoclavagem (Lufenco<sup>®</sup>). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 8/16 horas luz/escuro, intensidade luminosa de 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  até a obtenção de plântulas (seis meses) (Figuras 1 a-g).

## 2.2 Indução

A partir de sementes imaturas germinadas *in vitro* (MELLO et al., 2021), obteve-se as plântulas com seis meses de idade, que foram segmentas em quatro explantes, identificado de acordo com sua polaridade (1-4), descartando o ápice e a base. Os segmentos foram dispostos na horizontal em placas de polietileno 90 x 15 mm (Global Trade Technology, Brasil<sup>®</sup>) com 20 mL de meio de cultura (Figuras 1g-i).



**Figura 1.** Resumo metodológico de indução embriogênica de segmentos de bainha de plântulas de *Euterpe edulis*. Ilustração botânica da palmeira, em destaque o cacho de frutos imaturos (a) e fruto imaturo com  $\approx 180$  DAA (b). Germinação *in vitro* evidenciando a semente sem tegumento

(ze. Embrião zigótico na semente) (c) e o embrião zigótico destacado da semente (d), protrusão da raiz primária (e) e semente germinada (cp. Pecíolo cotiledonar; s. Brotação; r. Raiz primária) (f). Plântulas com seis meses (g) e excisão dos segmentos do caulículo, conforme sua polaridade (1-4) (h), seguido da transferência dos explantes para placa de Petri, com meio de cultura (i). Bar: 1,0 cm (b, c, e, f, g, h), 2,0 mm (d).

O meio de cultura foi o MS, com  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  mio-inositol,  $1 \text{ g L}^{-1}$  PVP, e  $30 \text{ g L}^{-1}$  sacarose. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da adição do ágar-ágar ( $5,5 \text{ g L}^{-1}$ ). Após autoclavagem, o meio foi suplementado com ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinocarboxílico (picloram - PIC) (Sigma®) filtrado, nas concentrações: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 450 ou  $600 \mu\text{M}$ .

O experimento foi mantido em sala de crescimento a  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  no escuro, por 60 dias. Analisou-se, a oxidação (%), centro embriogênico, em explantes com crescimento longitudinal (%), número de pró-embriões e massa do explante (g).

### 2.2.1 Análises histológicas e estruturais

Para os estudos anatômicos, as amostras foram desidratadas em série etílica e embebidas em metacrilato (Historesin®, Leica). Os cortes transversais e longitudinais (espessura de  $5 \mu\text{m}$ ) foram obtidos com um micrótomo de rotação automática (RM2155, Leica), equipado com navalha de vidro descartável, e corados com azul de toluidina em pH 4,0 (O'BRIEN; McCULLY, 1981), por 15 minutos. As lâminas foram montadas em resina sintética (Permound®). A análise e fotodocumentação foram realizadas em microscópio de luz (Olympus-AX 70) acoplado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo) do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### 2.2.2 Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado, conduzido em esquema fatorial  $4 \times 8$  (polaridades x concentrações de PIC), com quatro repetições de quatro explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de de média, Tukey ( $p < 0,05$ ), com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2020).

## 2.3 Maturação

Os explantes da indução do exp. I foram transferidos para meio de cultura MS, com 0,1 g L<sup>-1</sup> mio-inositol, 1 g L<sup>-1</sup> PVP, e 30 g L<sup>-1</sup> sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da adição do ágar-ágar (5,5 g L<sup>-1</sup>). O meio foi suplementado com 0,53 µM de ácido 1-naftalenoacético (ANA) (Sigma®) e 12,3 µM de 2-isopenteniladenina (2-iP) (Sigma®) (GUERRA; HANDRO, 1998).

O experimento foi mantido em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 60 dias. Analisou-se aos 30 e 60 dias o número de embriões e massa do explante (g).

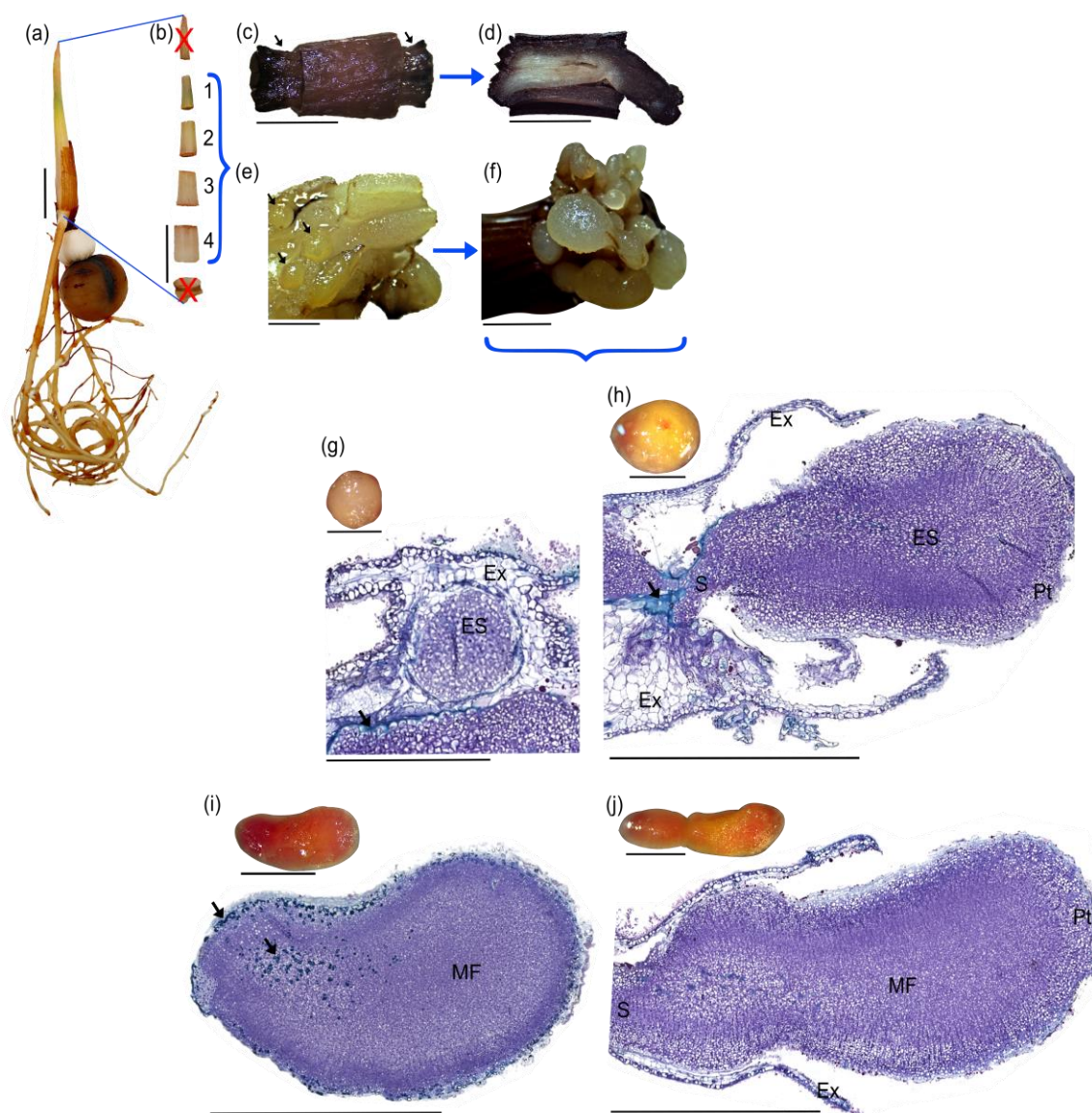
### 2.3.1 Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado, em fatorial 8x2 (concentrações de PIC (indução) x tempo de avaliação), com quatro repetições de quatro explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de média, Tukey (p<0,05), quando não houve ajuste de modelo, com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2020).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Indução

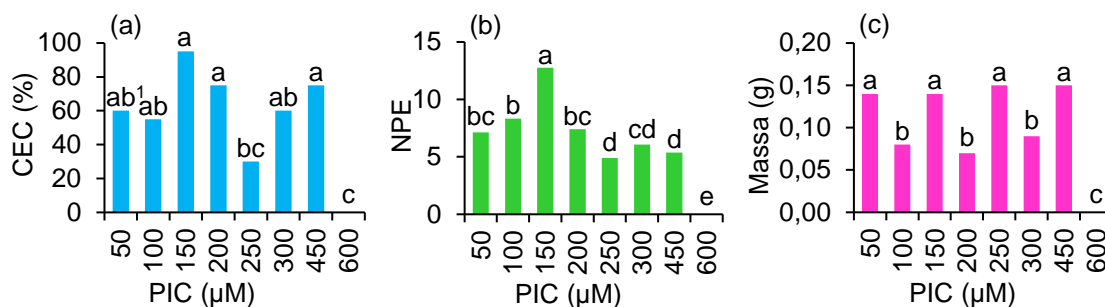
Os segmentos das plântulas (Figuras 2a, b) após sete dias de transferidos para o meio de indução começaram a crescer longitudinalmente (59,37%) com uma oxidação média de 40% (Figuras 2c, d), ambas variáveis não diferiram estatisticamente. Após 60 dias, ocorreu o surgimento de estruturas embriogênicas (proembriões) diretamente dos segmentos cauliculares que cresceram e não oxidaram, de forma assincrônica (Figuras 2e, f). Em que pode observar embriões somáticos em diferentes estádios, como os globulares emergindo do explante, escutelares preso ao explante pelo suspensor ou se desprendendo facilmente e o coleoptilar com protoderme e meristema fundamental diferenciado (Figuras 2g, h, i, j).



**Figura 2.** Indução embriogênica de *E. edulis* após 60 dias. Origem dos explantes (a) e sua segmentação (b). Explantes oxidados após crescimento longitudinal (setas pretas) (c) e região interna (d). Surgimento direto de proembriões somáticos (setas pretas) na região de crescimento longitudinal do explante (e). Embriões somáticos assíncronos (f), globular (g), escutelar preso ao explante (h), escutelar sem conexão com o explante (i), e coleoptilar (j). Ex. Explante; ES. Embrião somático; S. suspensor; Pt. Protoderme; MF. Meristema fundamental; setas pretas (composto fenólico). Bar: 1 cm (a, b), 5 mm (c, d), 2 mm (e, f, g, h, i, j).

Não houve interação significativa entre a polaridade e as concentrações de PIC, e não houve diferença significativa entre as polaridades. Para o fator concentração, houve diferença significativa para as variáveis centro embriogênico no crescimento longitudinal (%), número de proembriões, e massa dos explantes (Figuras 3 a-c).



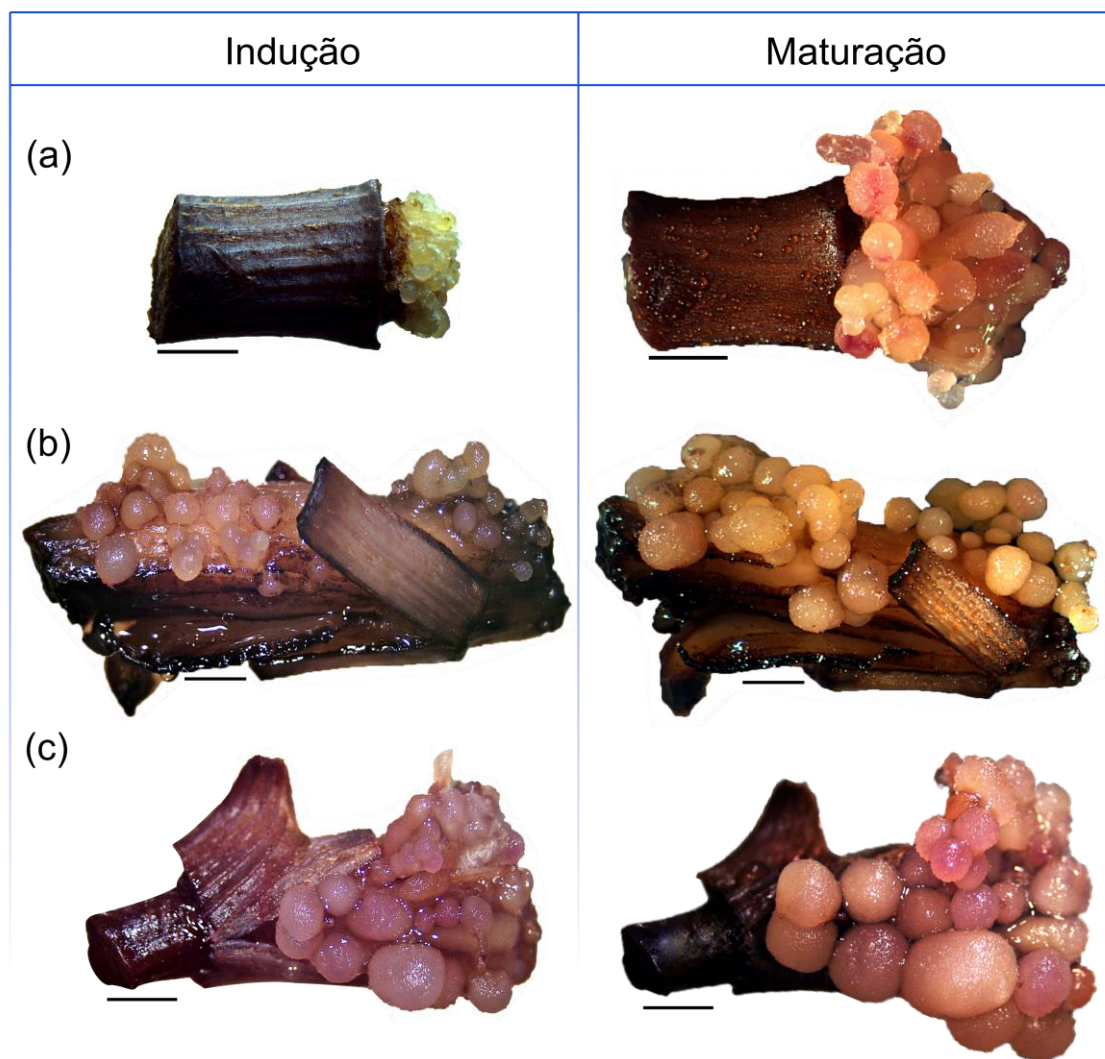


**Figura 3.** Indução de embriogênese somática de explantes juvenis de *E. edulis* após tratamentos com PIC, (a) porcentagem de explantes com centro embriogênico no crescimento longitudinal (CEC), (b) número de proembriões (NPE), e (c) massa dos explantes (g). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra minúscula, entre as concentrações, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As concentrações de 150; 200 e 450  $\mu\text{M}$  de PIC resultou em maior formação de centros embriogênicos em caulículos de plântulas de *E. edulis* (Figura 3a), onde a concentração de 150  $\mu\text{M}$  estimulou a maior formação de proembriões (Figura 3b).

### 3.2 Maturação

Os explantes foram transferidos para o meio de maturação após 60 dias no meio de indução, com a formação de embriões globulares de diferentes tamanhos (Figura 4). Após 30 dias no meio de maturação, os embriões somáticos cresceram significativamente (Figura 4), aumentando em massa e em número. No entanto, o crescimento permaneceu assíncrono.

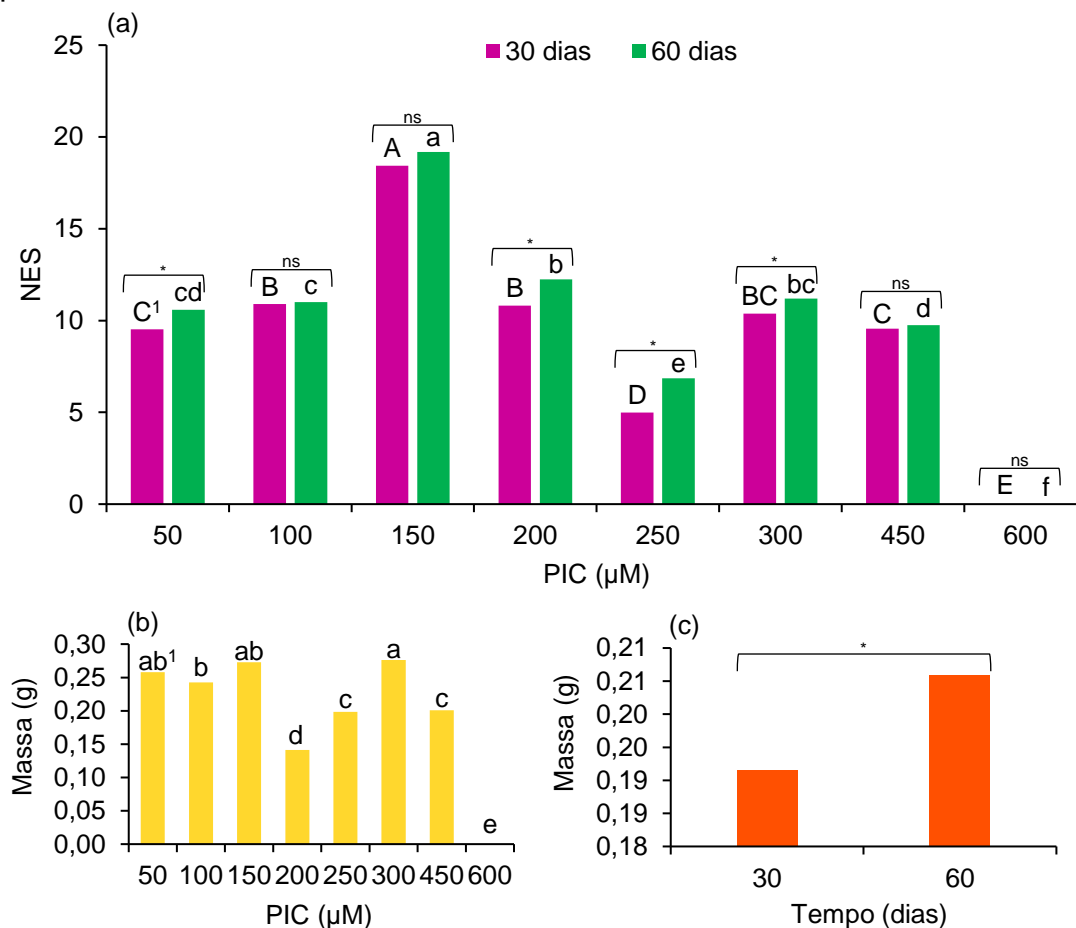


**Figura 4.** Embriões somáticos derivados de segmentos de caulículo de plântulas de *E. edulis* após 30 dias em meio de maturação (ANA (0,53  $\mu\text{M}$ ) + 2iP (12,3  $\mu\text{M}$ )), com explantes oriundos de meio de indução com PIC 100  $\mu\text{M}$  (a), 150  $\mu\text{M}$  (b) e 450  $\mu\text{M}$  (c). Bar: 2.0 mm.

Segmentos de caulículo de plântulas de *E. edulis* nas diferentes concentrações de PIC foram transferidos para o meio de maturação suplementado com ANA (0,53  $\mu\text{M}$ ) + 2-iP (12,3  $\mu\text{M}$ ), onde foram avaliados aos 30 e 60 dias. Verificou-se, nestes dois tempos uma maior quantidade de embriões somáticos ( $\cong 19$ ) (Figura 5a) originados diretamente de segmentos de caulículos em meio de maturação suplementado com ANA (0,53  $\mu\text{M}$ ) + 2-iP (12,3  $\mu\text{M}$ ), cuja indução foi em meio com PIC (150  $\mu\text{M}$ ) (Figura 5a).

Houve interação significativa, entre os fatores concentrações de PIC da indução e tempo de maturação, apenas para o número de embriões somáticos

(NES) (Figura 5a). Para a massa dos explantes (g) não houve interação, no entanto, os fatores foram significativos quando analisados individualmente (Figuras 5b, c), apesar da maior massa obtidas aos 60 dias, os embriões apresentavam características oxidativas.



**Figura 5.** Maturação dos embriões somáticos de *E. edulis* provenientes da indução com PIC, aos 30 e 60 dias na maturação. (a) número de embriões somáticos (NES), (b) massa dos explantes para as concentrações de PIC (g), e (c) massa dos explantes durante o tempo de maturação (g). <sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra maiúscula (30 dias) e minúscula (60 dias), entre as concentrações e tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \*Significativo ( $p < 0,05$ ) e <sup>ns</sup>não significativo pelo teste F, entre os dois tempos de maturação.

#### 4 DISCUSSÃO

Observou-se exclusivamente a ocorrência de embriogênese somática direta (ESD), com menor grau de reprogramação que a via indireta, a partir de células competentes de segmentos de caulículos de plântulas de *E. edulis* (Arecaceae), induzidas com PIC (Figura 2). A atividade morfogenética, via indução embriogênica direta estimulou células alvo do caulículo de plântulas de

*E. edulis*, por meio do regulador de crescimento auxínico PIC mais eficientemente na concentração de 150  $\mu\text{M}$  (Figura 3).

Tipos e concentrações de reguladores de crescimento de plantas (PGRs) como as auxínicas 2,4-D, 4-CPA, dicamba e PIC dentre outros fatores, influenciam o estado da transição de células somáticas induzidas a formar células embriogênicas totipotentes (Figura 2e; PHILLIPS; GARDA, 2019). A aquisição de competência embriogênica depende amplamente da desdiferenciação, um processo pelo qual os perfis de transcrição e tradução existentes são apagados, silenciados ou alterados para permitir que as células estabeleçam um novo programa de desenvolvimento (FEHÉR et al., 2003). Cada espécie irá responder melhor a algum PGRs auxínicos, no caso da *E. edulis*, no presente trabalho, foram testados 2,4-D e 4-CPA (25-600  $\mu\text{M}$ ), dicamba (100-600  $\mu\text{M}$ ) (dados não amostrados) e somente no PIC (50-600  $\mu\text{M}$ ) foi responsivo, até a concentração 450  $\mu\text{M}$ .

O histórico da embriogênese somática em *E. edulis*, iniciou-se em 1988 com a indução de embriões zigóticos de frutos imaturos, com 2,4-D ( $>50 \text{ mg L}^{-1}$ ), com embriões surgindo de forma direta da superfície dos tecidos (GUERRA; HANDRO, 1988). Dez anos após, a embriogênese em *E. edulis* foi induzida semelhantemente com 2,4-D ( $50\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$ ), em que embriões somáticos surgem diretamente da superfície do nó cotiledonar ou de tecidos subepidérmicos, mas também em inflorescências, em que um tecido proembriogênico é formado na região do primórdio floral e, nas folhas a proliferação celular iniciou-se a partir do parênquima vascular (GUERRA; HANDRO, 1998). Oito anos depois embriões somáticos indiretos foram induzidos a partir de embriões zigóticos em meio de cultura com 2,4-D ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) (SALDANHA et al., 2006). Atualmente Oliveira et al. (2022) e no presente trabalho, iniciaram um novo ciclo, em que a embriogênese somática indireta (ESI) foi induzida em embriões zigóticos de frutos imaturos de *E. edulis*, com PIC (300 e 125-175  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Continuamente, no presente trabalho, verificou-se a ocorrência da ESD a partir de plântulas de *E. edulis*.

Diferentemente de *E. edulis*, na espécie *E. oleracea* iniciou-se estudos com embriões zigóticos imaturos com a indução por meio do PIC (225  $\mu\text{M}$ ) (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012) e PIC (450  $\mu\text{M}$ ) (FREITAS et al., 2016),

com 44,9 e 84,7% de calos embriogênicos, respectivamente.

Quanto a maturação, o meio de cultura empregado nesta pesquisa para *E. edulis* foi o MS suplementado com ANA (0,53  $\mu\text{M}$ ) + 2-iP (12,3  $\mu\text{M}$ ) (GUERRA; HANDRO, 1998; SHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016). Guerra e Handro (1988) já haviam utilizado os PGRs (ANA (2,6  $\mu\text{M}$ ) e 2iP (24,6  $\mu\text{M}$ )) na maturação de embriões somáticos de *E. edulis*, só que em concentrações 4,9 e 2 vezes superiores de ANA e 2iP, respectivamente. Portanto, a razão auxina:citocinina empregada no presente trabalho é menor 2,44 vezes (produzindo em média 19 embriões somáticos diretamente por cada segmento de caulículo de plântula oriundo de meio de indução com PIC, 150  $\mu\text{M}$ ) em relação a utilizada inicialmente por Guerra e Handro (1988), sendo suficiente para a maturação dos embriões somáticos. Como o total de segmentos de caulículo por plântula utilizado foram quatro, é possível produzir em média 76 embriões.

Folhas jovens de mudas de *C. canephora* pré-condicionadas *in vitro* com ANA (0,54  $\mu\text{M}$ ) e cinetina (CIN) (2,32  $\mu\text{M}$ ) por duas semanas apresentaram aumento importante tanto no ácido indol-3-acético (AIA) livre quanto no conjugado, bem como no ácido indol-3-butírico (AIB). Portanto, é dependente deste pré-condicionamento a indução de SE em meio líquido com BA (5  $\mu\text{M}$ ) com o aparecimento das primeiras estruturas embriogênicas globulares após 21 dias (AYIL-GUTIÉRREZ et al., 2013). Calabuig-Serna et al. (2021) verificaram uma menor taxa de embriões derivados de micrósporos (MDE) de *Solanum melongena* L. com uso contínuo de ANA (2,68  $\mu\text{M}$ ) + BAP (2,21  $\mu\text{M}$ ), entretanto, houve elevação drástica na razão auxina:citocinina endógena dos micrósporos. Segundo estes autores, isto afeta negativamente a progressão embriogênica, sendo estes embriões globulares transformados em calos indiferenciados, ao invés de transitarem para a fase cordiforme. Entretanto, uma redução de 20% de ANA e BAP diminuiu o número de embriões, mas produziu estruturas mais anatomicamente semelhantes aos embriões.

## 5 CONCLUSÕES

A polaridade do explante não influenciou à sua indução embriogênica, podendo ser utilizado quatro segmentos de caulículo por plântula. Portanto, com

apenas um embrião zigótico que gerou uma plântula, é possível produzir em média 76 embriões somáticos.

A indução da embriogênica somática ocorreu via direta em caulículos de plântulas de *E. edulis*, por meio do regulador de crescimento auxínico PIC, e dentre as concentrações testadas, a mais eficientemente foi 150  $\mu\text{M}$ . Em que, posteriormente na maturação suplementado com ANA (0,53  $\mu\text{M}$ ) + 2-iP (12,3  $\mu\text{M}$ ), gerou uma maior quantidade de embriões somáticos ( $\cong 19$  por explante).

Apesar da maior massa dos explantes obtidas aos 60 dias de maturação, os embriões apresentavam características oxidativas. Portanto, é recomendando a retirada dos explantes do meio de maturação após 30 dias.

## 6 REFERÊNCIAS

- AYIL-GUTIÉRREZ, B.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; PEÑA-CABRERA, E.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Signaling Behavior**, v. 8, n. 11, e26998, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.26998>
- 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, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.036>
- BIAZOTTO, K. R.; MESQUITA S. L. M.; NEVES, B. V.; BRAGA, A. R. C.; TANGERINA, M. M. P.; VILEGAS, W.; MERCADANTE, A. Z.; ROSSO, V. V. Brazilian biodiversity fruits: discovering bioactive compounds from underexplored sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 1860-1876, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05815>
- CALABUIG-SERNA, A.; CAMACHO-FERÁNDEZ, C.; MIR, R.; PORCEL, R.; CARRERA, E.; LÓPEZ-DÍAZ, I.; SEQUÍ-SIMARRO, J. M. Quantitative and qualitative study of endogenous and exogenous growth regulators in eggplant (*Solanum melongena*) microspore cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 1, p. xx-yy, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00780-y>
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>
- FREITAS, E. O.; MONTEIRO, T. R.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-

PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p. 126-135, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.044>

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 7, p. 550-552, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00272754>

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 65-71, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02507151>

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., p. xx-yy, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02216-6>

MURASHIGE, T. M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty, 1981, 45p.

OLIVEIRA, L. B.; MELLO, T.; ARAUJO, C. P.; OLIVEIRA, J. P. B.; FERREIRA, A.; ZANARDO, T. E. C.; VIEIRA, L. M.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S.; CARVALHO, V. S. Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. , p. xx-yy, 2022. DOI:

REE, J. F.; POLES, L. G.; BACK, F.; BERTOLAZI, A. A.; SILVEIRA, V.; GUERRA, M. P. Aging peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures lose embryogenic potential and metabolic cellular function due to continuous culture in hypoxic environments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 140, p. 49-67, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01710-7>

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 55, p. 242-257, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SALDANHA, C. W.; MARTINS-CORDER, M. P.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 228-235, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.12702/1984-7033.v06n03a07>

SALDANHA, C. W.; 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, n. 3, p. 171-178, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-70332012000300002>

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, J. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 3, p. 501-508, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0115-z>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; NEHRING, P.; GOIS, J. S. DE; ALMEIDA, T. S. DE; 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.006>

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, n. 1, p. 14-26, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

SCHULZ, M.; BRUGNEROTTO, P.; SERAGLIO, S. K. T.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. S. C.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Aliphatic organic acids and sugars in seven edible ripening stages of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103683, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103683>

SUN, J.; QI, L.; LI, C. Hormonal control of polar auxin transport. In: CHEN, R.; BALUŠKA, F. **Polar auxin transport**. Springer: Berlin Heidelberg, 2013, p. 119-127. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-35299-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-35299-7_6)



## CAPÍTULO VIII

### **Resposta embriogênica direta de explantes de *Euterpe edulis* Martius mediante lesão e orientação do explante no meio de cultura, cultura em suspensão, e o uso de aminoácidos**

**Resumo:** O extrativismo ilegal ao longo dos anos do palmito da palmeira *Euterpe edulis* Martius, levou a espécie a ser ameaçada de extinção, tendo como único meio de propagação, suas sementes. Portanto, objetivou-se com este estudo analisar a indução embriogênica em segmentos de plântulas de *E. edulis*, mediante lesões e orientação do explante no meio de cultura, seguido de culturas de suspensão de células, e diferentes fontes de aminoácidos. Foram colhidos sementes imaturas e postas para germinar *in vitro*, em que, após seis meses, as plântulas foram excisadas a parte mediana do caulículo, e transversalmente em dois explantes, deixando-os com ferimento transversal (TW), e longitudinalmente com a superfície ferida voltada para baixo (LWD), para cima (LWU), ou de lado (LWS) na superfície do meio de cultura. Os calos friáveis formados a partir dos explantes LWU foram transferidos 0,2 g para cultura de suspensão, com diferentes concentrações de picloram (15, 25, 35 e 45  $\mu\text{M}$ ). E em um terceiro experimento, explantes LWU foram dispostos em meio de cultura com L-glutamina ou caseína hidrolisada (0,0, 0,5 ou 1,0  $\text{g L}^{-1}$ ). A maturação das culturas foi em cultura de suspensão, suplementado com ácido abscísico (ABA) (1, 5, 10, e 20  $\mu\text{M}$ ). Na indução, caulículos com ferimentos longitudinais, posicionados para cima e, ou para o lado no meio MS+picloram (150  $\mu\text{M}$ ) proporcionou maiores taxas de indução. Os calos friáveis em meio líquido apresentaram maior crescimento em meio MS+picloram (15  $\mu\text{M}$ ). Não há necessidade do uso dos aminoácidos L-glutamina e caseína hidrolisada. Na maturação, o uso de 1  $\mu\text{M}$  de ABA proporcionou a maior taxa de crescimento. Portanto, recomenda-se a utilização de segmentos de caulículos de *E. edulis* LWU, com picloram (150  $\mu\text{M}$ ) e na cultura de suspensão (15  $\mu\text{M}$ ).

**Palavras-chave:** ferimento, L-glutamina, caseína hidrolisada, picloram, juçara, *in vitro*, cultura de tecidos vegetais.

**Abstract:** The illegal extraction over the years of the palm heart of the *Euterpe edulis* Martius palm, led the species to be threatened with extinction, with its seeds as the only means of propagation. Therefore, the objective of this study was to analyze embryogenic induction in segments of *E. edulis* seedlings, through lesions and explant orientation in the culture medium, followed by cell suspension cultures, and different source of amino acids. Immature seeds were collected and set to germinate *in vitro*, in which, after six months, the seedlings were excised from the median part of the stem, and transversally in two explants, leaving them with a transverse wound (TW), and longitudinally with the wound surface facing down (LWD), up (LWU), or sideways (LWS) on the surface of the culture medium. Friable callus formed from LWU explants were transferred 0.2 g to suspension culture with different concentrations of picloram (15, 25, 35 and 45  $\mu\text{M}$ ). And in a third experiment, LWU explants were placed in culture medium with L-glutamine or hydrolyzed casein (0.0, 0.5 or 1.0  $\text{g L}^{-1}$ ). Cultures were matured in suspension culture, supplemented with abscisic acid (ABA) (1, 5, 10, and 20  $\mu\text{M}$ ). At induction, stems with longitudinal wounds, positioned up and/or to the side in MS+picloram (150  $\mu\text{M}$ ) medium, provided higher induction rates. Friable callus in liquid medium showed greater growth in MS+picloram medium (15  $\mu\text{M}$ ). There is no need to use the amino acids L-glutamine and hydrolyzed casein. At maturation, the use of 1  $\mu\text{M}$  of ABA provided the highest growth rate. Therefore, it is recommended to use stem segments of *E. edulis* LWU, with picloram (150  $\mu\text{M}$ ) and in suspension culture (15  $\mu\text{M}$ ).

**Keywords:** wound, L-glutamine, hydrolyzed casein, picloram, juçara, *in vitro*, plant tissue culture.

## 1 INTRODUÇÃO

*Euterpe edulis* Martius é uma palmeira nativa da Floresta Atlântica, muito conhecida pela produção de palmito doce, um alimento gourmet e de alto valor monetário. No entanto, o palmito inclui o meristema apical, e sua colheita leva a morte da planta, que o levou a entrar na lista de espécies ameaçadas de extinção (WENDT et al., 2011; SCHULZ et al., 2016). Além do palmito, seu fruto possui características sensoriais comparáveis às do açaí (*E. oleracea* Martius), mas com composição nutricional superior, destacando-se pelos seus efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e cardioprotetores (SCHULZ et al., 2016; CARDOSO et al., 2018), o que diminui a pressão antrópica sobre o palmito e, de forma sustentável incentiva a cadeia produtiva do açaí.

Por ser uma palmeira que não perfilha, sua propagação natural se dá única e exclusivamente por sementes, classificadas como recalcitrante, perdem seu vigor rapidamente após colheita, além de possuir uma germinação lenta e desuniforme (CURSI; CICERO, 2014; SCHULZ et al., 2016). Uma via de propagação viável seria a técnica de embriogênese somática, que além de perpetuar a espécie sem a destruir, poderia ser utilizada para obtenção de progênies superiores para plantios comerciais.

A indução de estruturas complexas como um embrião somático, em explantes após um ferimento, requer o início de um programa de desenvolvimento geneticamente codificado para cicatrização das lesões, desdiferenciação celular, proliferação celular e formação de novos órgãos (LUP et al., 2016). Quando segmentos caulinares são cortados pela metade, a auxina transportada do ápice caulinar se acumula na extremidade superior do local da ferida e é esgotada na extremidade inferior, induzindo uma expressão gênica e ativando o local da proliferação celular para curar a lacuna no local da ferida (IKEUCHI et al., 2013). Os genes da família DESDIFERENCIAÇÃO INDUZIDA POR FERIDA (*WIND1*, *WIND2*, *WIND3* e *WIND4*) são os reguladores centrais desta resposta, pois a lesão promove alterações na metilação do genoma na região do ferimento (IKEUCHI et al., 2013; IWASE et al., 2017; FARIA et al., 2019). A ativação sequencial do gene *WIND1* e um regulador embrionário, como o *LEAFY COTYLEDON2* (*LEC2*), irá induzir a embriogênese somática em locais excisados ou não (IWASE et al., 2015).

O ferimento e a orientação do explante no meio de cultura podem aumentar a responsividade, necessária para a plasticidade de desenvolvimento e morfogênese de novos órgãos (FARIA et al., 2019). Além disso, esses novos órgãos podem ser utilizados no estabelecimento de culturas de suspensão de células embriogênicas altamente produtivas, e serem a base para novas pesquisas. Portanto, o objetivou-se com este estudo analisar a resposta embriogênica em segmentos de plântulas de *E. edulis*, mediante lesões e orientação do explante no meio de cultura, seguido de culturas de suspensão de células, e fontes de aminoácidos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta, desinfestação e estabelecimento

Os frutos de *E. edulis* foram colhidos de uma planta matriz de 6,7 m de altura e 13,4 cm de DAP (altura na altura do peito – 1,30 m), localizada no distrito de Pedra Menina, no município de Dores do Rio Preto, Espírito Santo, Brasil próximo ao Parque Nacional do Caparaó, nas coordenadas 20°32'45.4" S, 41°49'35.7" W, e na altitude 951 m. A colheita dos frutos ocorreu com aproximadamente 168 dias após a antese, e encaminhados para Laboratório de Sementes Florestais e Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES).

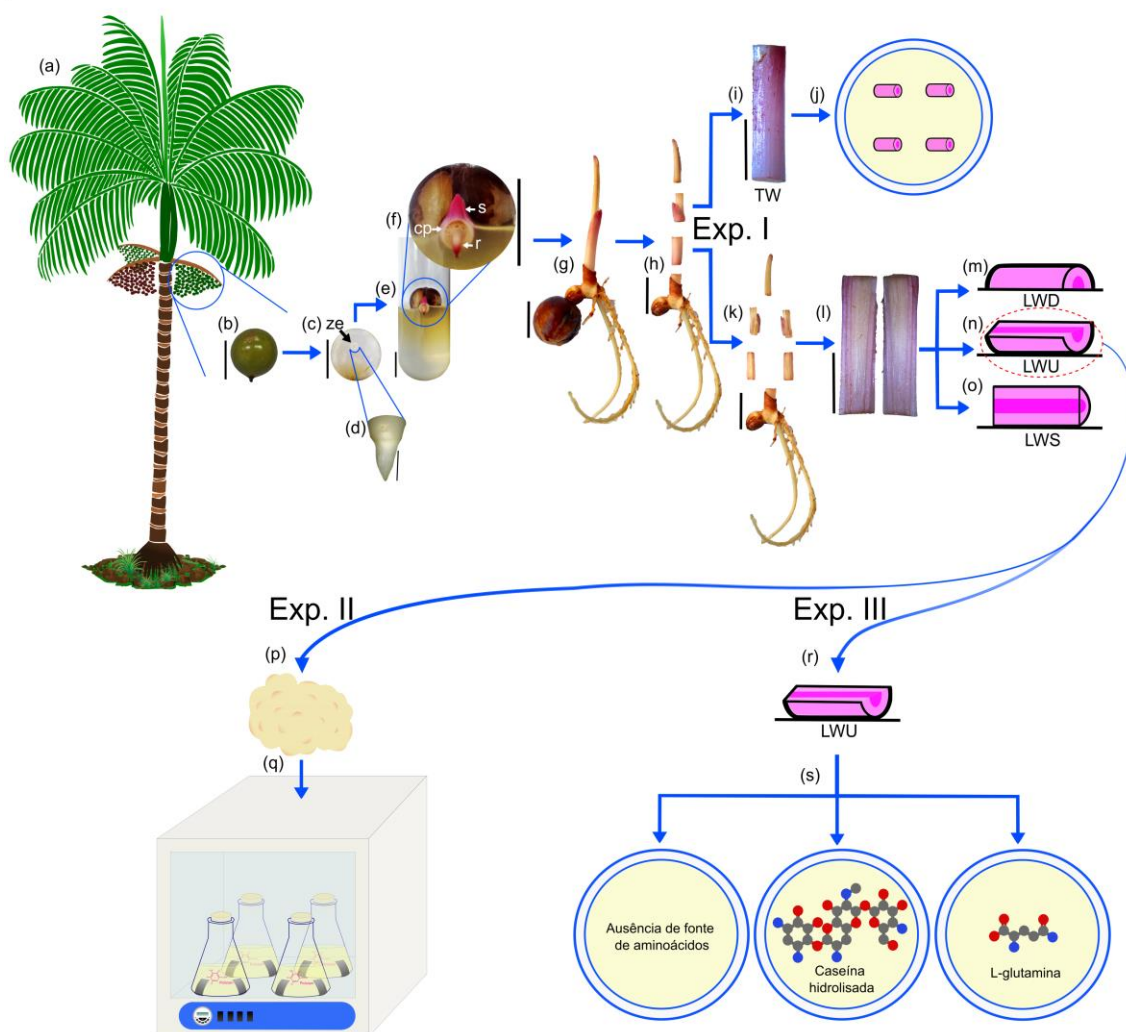
Após a limpeza dos frutos, foi retirado o tegumento, e em seguida, imersos em solução de ácido ascórbico à 2%, para impedir a oxidação fenólica. Na câmara de fluxo laminar, as sementes de *E. edulis* foram imersas em álcool etílico à 70% por um minuto, hipoclorito de sódio-NaOCl (Candura®) a 2,5% por 10 minutos e em solução de amoxicilina (Germed®) a 3 g L<sup>-1</sup> por 10 minutos, realizando-se a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada após cada etapa.

As sementes foram dispostas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma®), suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) (Synth®), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica®), 0,1 g L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma®), e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Kasvi®). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 com hidróxido de potássio

(KOH) (Alphatec®) e/ou ácido clorídrico (HCl) (Vetec®) a 1,0 N, antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 8/16 horas luz/escuro, intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  até a obtenção de plântulas (6 meses).

## 2.2 Indução

Em câmara de fluxo, as plântulas foram excisadas no coleto e ápice, deixando a parte mediana com aproximadamente 20 mm (Figura 1). Este foi seccionado transversalmente em dois explantes de 10 mm, deixando-os com ferimento transversal (TW), ou seccionando longitudinalmente com a superfície ferida voltada para baixo (LWD), para cima (LWU), ou de lado (LWS) na superfície do meio de cultura (experimento I) (Figura 1h).



**Figura 1.** Ilustração botânica da palmeira *E. edulis* em frutificação (a), fruto imaturo (b), semente imatura (ze. embrião zigótico) (c), destaque do embrião zigótico (d), germinação *in vitro* (e),

semente germinada (cp. pecíolo cotiledonar; s. brotação; r. raiz primária) (f), plântula normal (g). Experimento I (Exp. I): plântula seccionada em dois explantes (h), explante de 10 mm, com ferimento transversal - TW (i), organização dos explantes na placa de Petri (j), plântula seccionada em quatro explantes (k), explante com 10 mm, com ferimento longitudinal (l), ferimento longitudinal voltado para baixo - LWD (m), voltado para cima - LWU (n) e, de lado - LWS (o) no meio de cultura. Exp. II: calos friáveis originados do explante LWU (p) transferidos para cultura de suspensão (q). Exp. III: explante LWU (r), no meio de cultura com ausência e presença de fonte de aminoácidos (caseína hidrolisada e L-glutamina) (s). Barra: 10 mm (b, c, e, f, g, h, k), 5 mm (i, l), 2 mm (d).

Os explantes foram colocados em placas de Petri (90 x 15 mm), com MS basal (Sigma<sup>®</sup>), suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) (Synth<sup>®</sup>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica<sup>®</sup>), 0,1 g L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma<sup>®</sup>). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 KOH (Alphatec<sup>®</sup>) e/ou HCl (Vetec<sup>®</sup>) a 1,0 N, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Kasvi<sup>®</sup>). Após autoclavagem o meio foi suplementado com 150 µM de PIC-picloram (Sigma<sup>®</sup>), adicionado ao meio em processo de resfriamento, sob fluxo laminar. O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 27±2 °C, e no escuro por 60 dias.

Após 60 dias, os explantes foram transferidos para MS basal, onde permaneceram por 30 dias. Após esse período, os calos friáveis formados a partir dos explantes LWU foram transferidos 0,2 g para Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de MS basal, líquido, suplementado com PIC (15, 25, 35 e 45 µM) filtrado (Exp. II). O experimento foi mantido em câmara incubadora com agitação orbital (shaker) (Solab<sup>®</sup>), com rotação de 100 rpm, temperatura de 27 °C, no escuro (Figuras 1p, q), por 12 semanas, com subcultura e análise de massa (g) a cada 14 dias. Ao final, foi analisado a massa final (g), o índice de crescimento ((massa final (g)-massa inicial (g))/massa inicial (g)), e a taxa de crescimento (%) (índice de crescimento×100).

No terceiro experimento (Exp. III) (Figuras 1r, s), os explantes LWU foram colocados em placas de Petri (90 x 15 mm), com MS basal, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar autoclavado, e suplementado com 150 µM de PIC filtro-estéril, após autoclavagem, e com L-glutamina ou caseína hidrolisada após autoclavagem nas concentrações 0,0, 0,5 ou 1,0 g L<sup>-1</sup>. O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, e no escuro por 60 dias.

### 2.2.1. Diversidade genética por meio de marcadores ISSR

#### *Extração do DNA genômico*

O DNA foi extraído das raízes de cada plântula utilizada na indução embriogênica, sendo estas maceradas em nitrogênio líquido seguindo a metodologia de Doyle e Doyle (1990). Foram transferidos 50 mg do tecido vegetal macerado para microtubos, e adicionado 700  $\mu\text{L}$  de solução tampão de extração Tris-HCl pH 7.5 na concentração de 200 mM, cloreto de sódio (NaCl) a 288 mM, brometo de cetiltrimetilamônio (EDTA) a 25 mM, dodecilsulfato de sódio (SDS) a 0,5%, beta-mercaptoetanol 0,2% e polivinilpirrolidona (PVP) a 1%.

Em seguida as amostras foram levadas para banho seco a 65 °C 30 min<sup>-1</sup>, homogeneizando a cada 10 min. Foi então adicionado 650  $\mu\text{L}$  de Cia (clorofórmio:álcool isoamílico) 24:1 (v:v), homogeneizando durante 5 min e centrifugando a 12000 rpm 10 min<sup>-1</sup>. O processo de transferência do sobrenadante e a adição de Cia + centrifugação foi repetido por duas vezes.

O DNA foi então precipitado com isopropanol gelado + 230  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio, e centrifugado a 12000 rpm 10 min<sup>-1</sup>. O precipitado de DNA foi lavado com 250  $\mu\text{L}$  de álcool 70°, centrifugado a 12000 rpm 3 min<sup>-1</sup>, repetindo este processo por duas vezes. Em seguida, as amostras secaram em banho seco, ressuspendidas em 40  $\mu\text{L}$  de tampão TE com RNase (40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e deixando em banho seco a 37 °C 30 min<sup>-1</sup>.

Utilizou-se o equipamento Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®) para analisar a qualidade e quantidade de DNA. Já a integridade do DNA foi analisada por meio do fotodocumentador Biorad Gel Doc™ XR, com gel de agarose a 1,2%.

#### *Reação de amplificação do DNA e eletroforese*

Após a extração do DNA genômico, utilizaram-se 11 primers ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) com suas respectivas temperaturas de anelamento para a análise da variabilidade genética das plântulas, sendo eles UBC 826 (56 °C), UBC 841 (50 °C), UBC 852 (50 °C), UBC 853 (50 °C), UBC 868 (50 °C), UBC 873 (50 °C), UBC 880 (50 °C), UBC 812 (50 °C), UBC 818 (50 °C), UBC 808 (56 °C) e UBC 811 (58 ou 56 °C).

As condições de amplificação foram: tampão 1x; taq DNA polimerase 1U em 0.2  $\mu\text{L}$ ; primer 0,8  $\mu\text{M}$ , dNTPs 0,8 mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; DNA genômico 7 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  e 7,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  para um volume final de 15  $\mu\text{L}$ . Para a amplificação utilizou-se o termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®) com a seguinte programação: 4 min de desnaturação a 94 °C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94 °C de desnaturação, 1 min a T °C de anelamento específica de cada primer, 1 min a 72 °C para a extensão e 5 min a 72 °C de extensão final.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,2% submetido a 80 volts 2 h<sup>-1</sup> e os padrões de bandas foram corados pelo corante GelRed®. Foi utilizado o fotodocumentador Biorad Gel Doc™ XR para fotodocumentação do gel.

#### 2.2.2. Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado, no primeiro experimento foram quatro tratamentos (TW, LWU, LWD e LWS), 10 repetições com quatro explantes. No segundo, quatro tratamentos (PIC: 15, 25, 35 e 45  $\mu\text{M}$ ), com quatro repetições. E no terceiro, em fatorial 2x3 (fonte de aminoácido: caseína hidrolisada ou L-glutamina x concentrações: 0,0, 0,5 ou 1,0 g L<sup>-1</sup>), com 10 repetições com quatro explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (R CORE TEAM, 2020).

### 2.3 Maturação

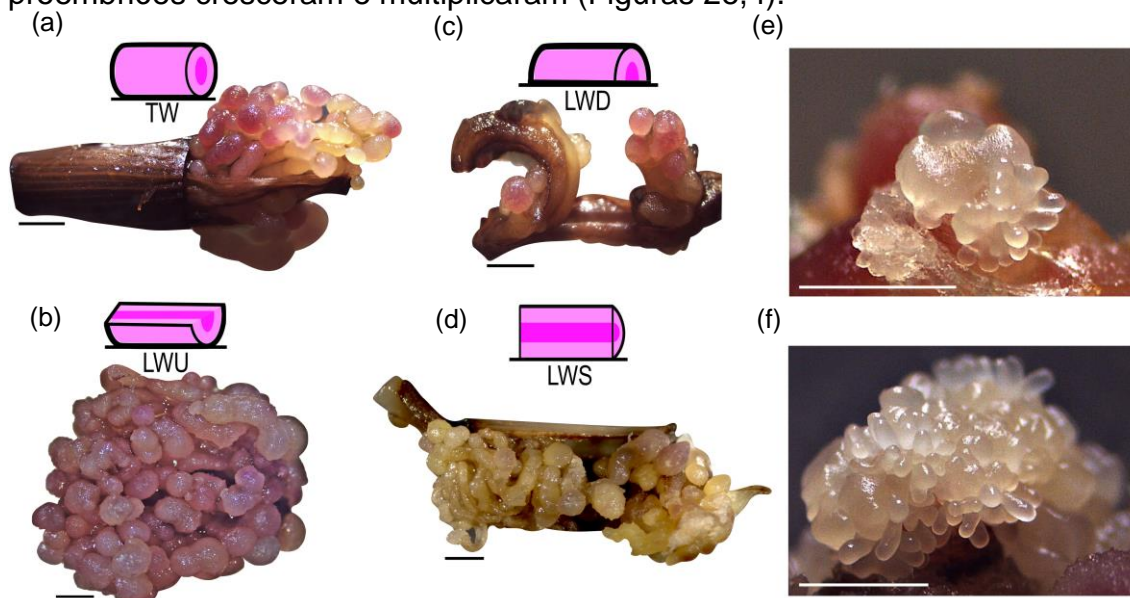
Calos friáveis (0,2 g) dos melhores tratamentos do exp. III (LWD e LWU) foram transferidos para Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio basal de maturação líquido, suplementado com ácido abscísico (ABA) (1, 5, 10, e 20  $\mu\text{M}$ ) (Sigma®) filtrado. O experimento foi mantido em câmara incubadora com agitação orbital (shaker) (Solab®), com rotação de 100 rpm, temperatura de 27 °C, no escuro, por 8 semanas, com subcultura e análise de massa (g) a cada duas semanas. Ao final, foi analisado a massa final (g), índice e taxa de crescimento (%).



### 3 RESULTADOS

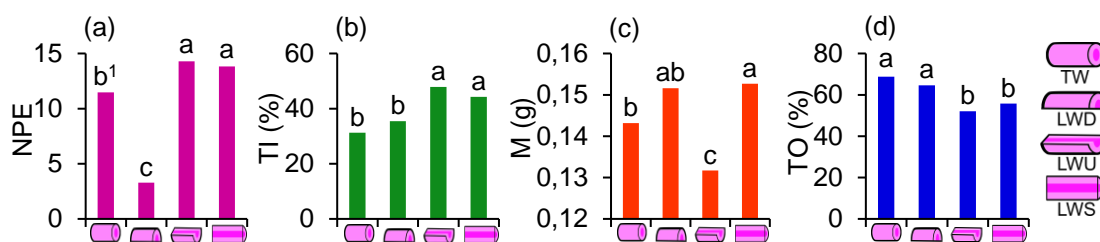
#### 3.1 Indução embriogênica: ferimentos em caulículo de plântulas de *E. edulis* em meio sólido com PIC

Os segmentos das plântulas após sete dias de transferidos para o meio de indução ( $150 \mu\text{M}$  de PIC) começaram a crescer longitudinalmente, e após 60 dias surgiram proembriões somáticos. Após 60 dias, ocorreu o surgimento de proembriões diretamente dos segmentos cauliculares que cresceram e não oxidaram. No entanto, apenas nos explantes com ferimento transversalmente (TW) surgiram proembriões somente no segmento que cresceu (Figura 2a), já os explantes com ferimento longitudinal (LW), surgiram proembriões em toda sua extensão (Figuras 2b-d). Após 30 dias em meio basal, os explantes com proembriões cresceram e multiplicaram (Figuras 2e, f).



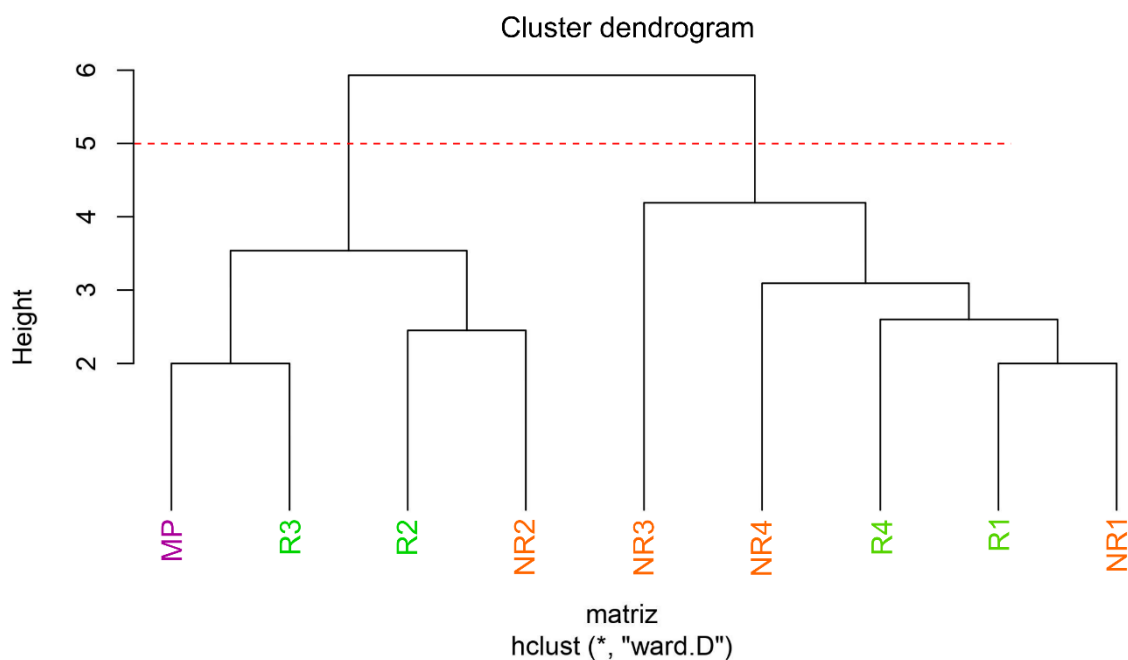
**Figura 2.** Segmentos de caulículos de plântulas de *E. edulis* na indução embriogênica ( $150 \mu\text{M}$  de PIC) após 60 dias, com ferimento transversal - TW (a), longitudinal voltado para cima - LWU (b), voltado para baixo - LWD (c), e de lado - LWS no meio de cultura (d). Formação de embriões somáticos com 60 dias (e) e após 30 dias em meio basal (f). Barra: 2 mm (a-d, f), 1 mm (e).

Após os 60 dias em meio de indução embriogênica, os explantes obtiveram médias máximas de proembriões (NPE=14) e taxa de indução (TI=48 e 44%) com os explantes LWU e LWS, respectivamente (Figuras 3a, b), corroborando com as menores médias de taxa de oxidação (TO=52 e 56%) (Figura 3c).



**Figura 3.** Indução de embriogênese somática (150  $\mu$ M de PIC) de explantes juvenis de *E. edulis* com ferimento transversal - TW (i), longitudinal voltado para baixo - LWD, voltado para cima - LWU e de lado - LWS no meio de cultura; número de proembriões - NPE (a), taxa de indução - TI (b), massa - M (c), e taxa de oxidação - TO (d). <sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

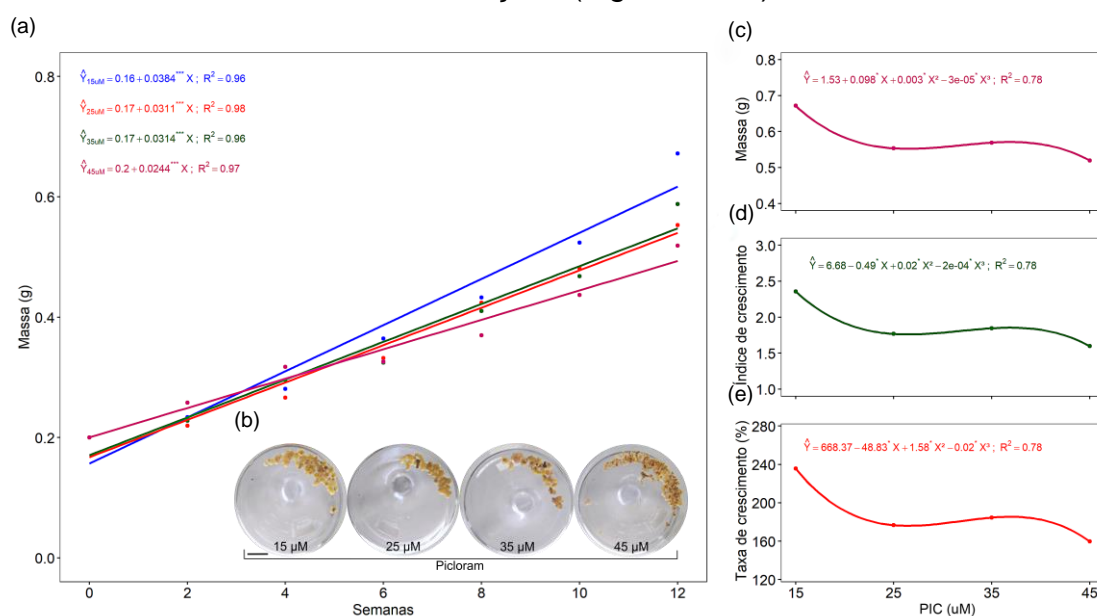
Por meio da análise do dendrograma, baseado no método ward.D, foi possível detectar dois grupos (Figura 4). O grupo 1 ficou a planta matriz e as plântulas que foram responsivas na indução embriogênica R2 e R3, e a não-responsiva NR2. No grupo 2 ficaram as plântulas que foram responsivas na indução embriogênica R1 e R4, e a não-responsiva NR1, NR3 e NR4.



**Figura 4.** Dendrograma obtido pelo método ward.D da planta matriz (MP) e as plântulas que foram responsivas na indução embriogênica (R1, R2, R3 e R4) e não-responsivas (NR1, NR2, NR3 e NR4).

### 3.2 Indução embriogênica: calos friáveis de LWU em meio líquido sob agitação com PIC

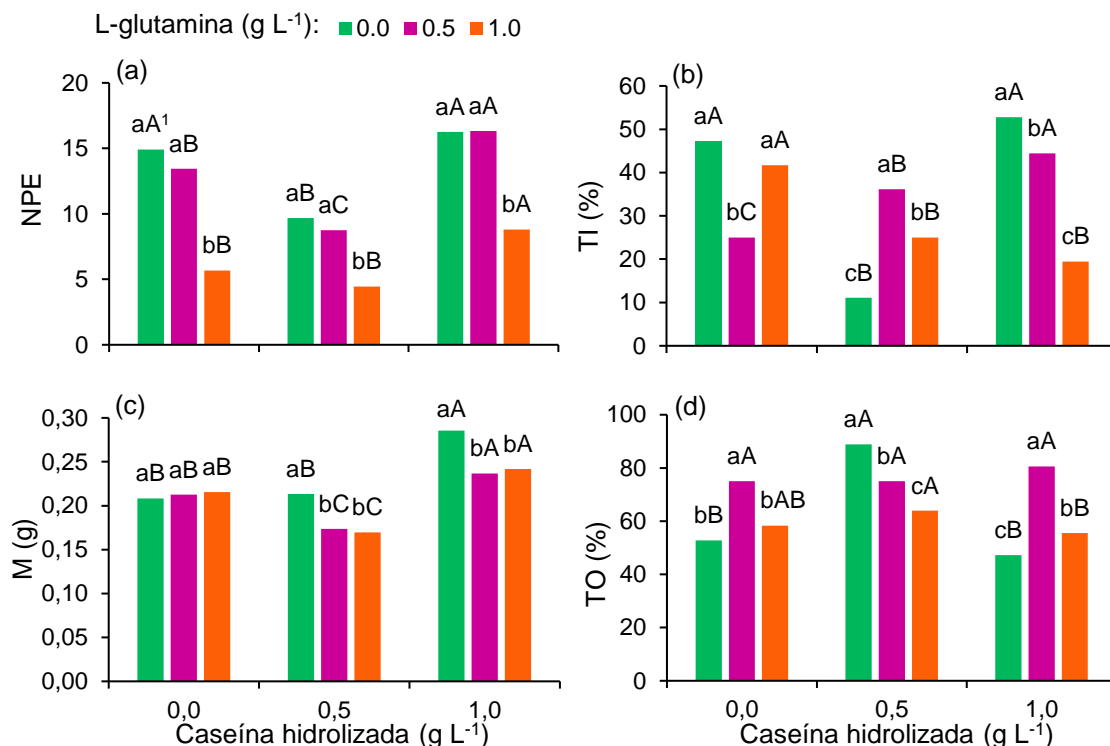
Os calos friáveis na cultura de suspensão começaram a crescer logo na segunda semana, e após a quarta semana era visível sua multiplicação com o surgimento de novas estruturas globulares com tons rosáceos (Figura 5a). Após 12 semanas, as estruturas globulares da concentração mais elevada de PIC (45  $\mu\text{M}$ ) começaram a mudar de cor (escurecer) e apresentar característica de oxidação (Figura 5b). A maior média de massa, índice e taxa de crescimento (0,6716 g, 2,358 e 235,8%, respectivamente) foi obtida com PIC (15  $\mu\text{M}$ ), decrescendo nas demais concentrações (Figuras 5c-e).



**Figura 5.** Crescimento da cultura de suspensão de *E. edulis* ao longo de 12 semanas (a), e calos ao final do período (barra: 2 cm) (b), massa final (c), índice de crescimento (d), e taxa de crescimento (e) na indução com PIC (15, 25, 35 e 45  $\mu\text{M}$ ). Coeficiente estatisticamente significativo a \*\*\*0,1 e \*5% pelo teste t.

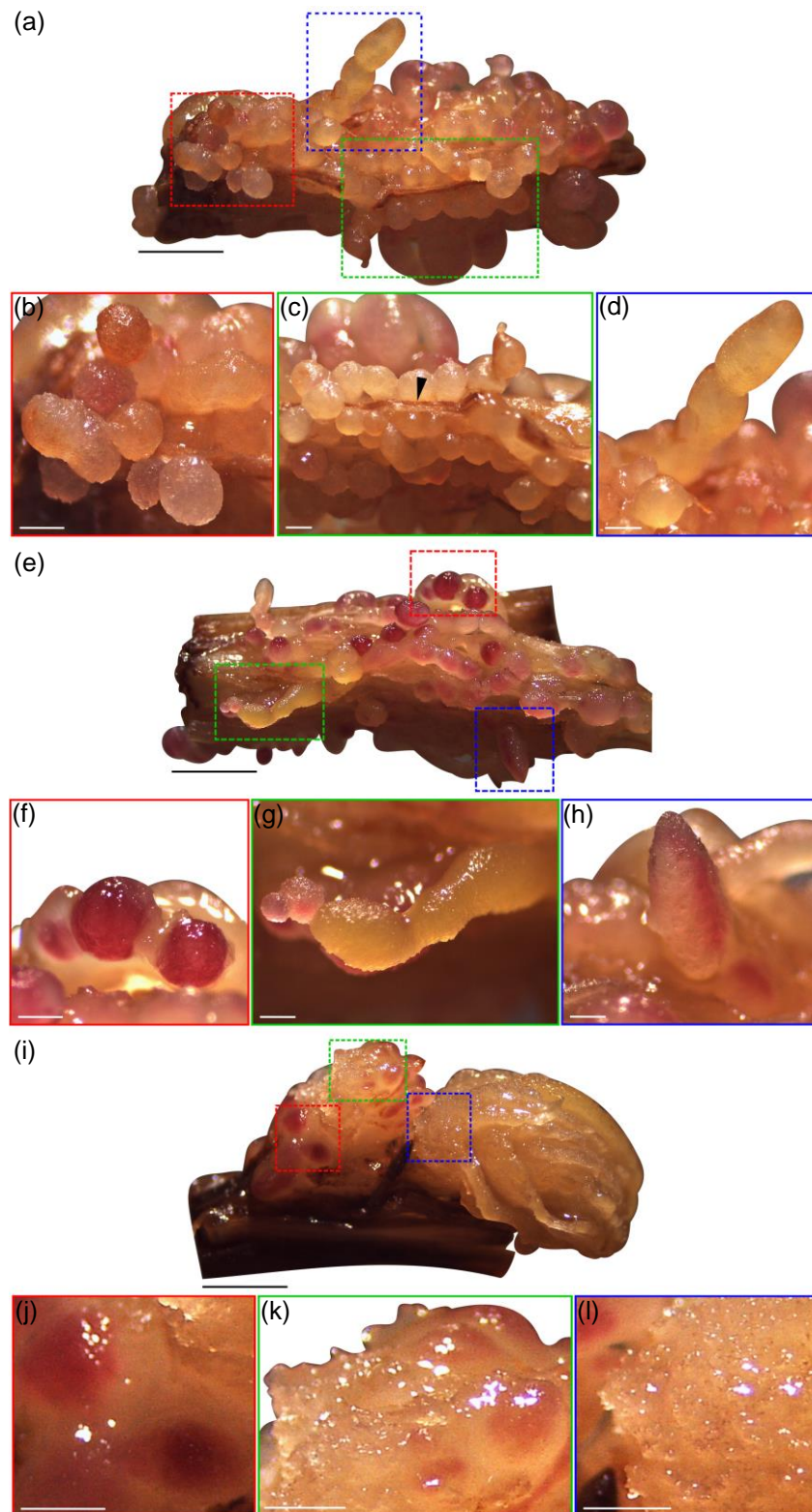
### 3.3 Indução embriogênica: LWU em meio sólido com aminoácidos

Houve interação entre os fatores concentrações de L-glutamina e caseína hidrolisada. A resposta de cada variável depende da combinação de concentrações de L-glutamina e caseína hidrolisada. As maiores médias de número de proembriões (NPE) foram obtidas na ausência dos aminoácidos (14,92), 1,0 g L<sup>-1</sup> caseína hidrolisada (16,25) e 0,5 g L<sup>-1</sup> L-glutamina e 1,0 g L<sup>-1</sup> caseína hidrolisada (16,33), não diferindo estatisticamente (Figura 6).



**Figura 6.** Indução de embriogênese somática com explantes de *E. edulis* após tratamentos com PIC e fontes de aminoácidos (L-glutamina e caseína hidrolisada). Número de proembriões - NPE (a), taxa de indução - TI, % (b), massa dos explantes - M, g (c), e taxa de oxidação - TO, % (d). <sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra minúscula (concentrações de L-glutamina) e maiúscula (concentrações de caseína hidrolisada), não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

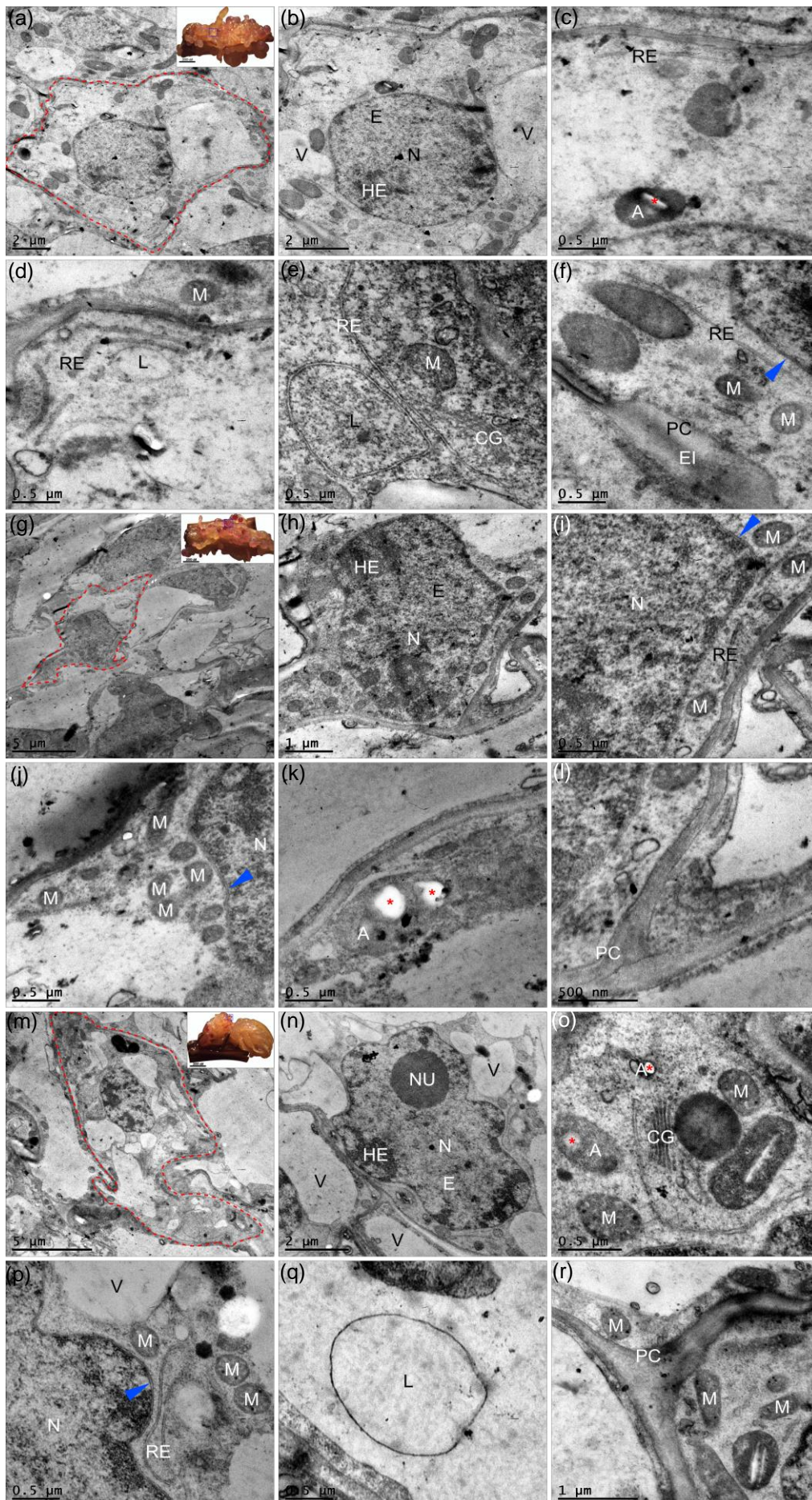
Entre a ausência e a concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup> L-glutamina não há diferença estatística para a variável NPE, o que pode ser observado pela semelhança a nível morfológico e celular entre os dois tratamentos, distinguindo de 1,0 g L<sup>-1</sup> L-glutamina (Figuras 7 e 8). Tanto na ausência quanto na presença de L-glutamina (0,5 g L<sup>-1</sup>) há formação de embriões somáticos globulares diretamente do tecido do explante, e embriogênese secundária direta (Figuras 7 a-h). Enquanto na concentração 1,0 g L<sup>-1</sup> L-glutamina há formação de calo com regiões com o surgimento de embriões globulares e regiões não-embriogênicas (Figuras 7 i-l).



**Figura 7.** Segmentos de caulículos de plântulas de *E. edulis* na indução embriogênica após 60 dias, sem adição de fonte de aminoácidos (a), em destaque a formação de embriões somáticos globulares (tracejado em vermelho) (b), sequência de embriões somáticos globulares surgindo diretamente do tecido do explante (seta - tracejado em verde) (c), e embrião somático escutelar (tracejado em azul) (d). Segmentos de caulículos de plântulas induzido com  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de L-glutamina (e), em destaque a formação de embriões somáticos globulares (tracejado em

vermelho) (f), embriogênese secundária (tracejado em verde) (g), e embrião somático escutelar (tracejado em azul) (h). Segmentos de caulículos de plântulas induzido com  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de L-glutamina (i), em destaque a formação de embriões somáticos globulares (tracejado em vermelho) (j), embriões somáticos globulares adjacente ao tecido não-embriogênico (tracejado em verde) (k), e tecido não-embriogênico (tracejado em azul) (l). Barra: 2 mm (a, e, i), 500  $\mu\text{m}$  (b-d, f-h, j-l).

Os explantes induzidos com L-glutamina possuem células com características semelhantes na ausência ou na concentração de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  (Figuras 8a-f, g-l), com citoplasma denso, núcleos e nucléolos evidentes, grandes e elétron-densos, núcleos com formato irregular, vacúolo grande, menor teor de heterocromatina x eucromatina (Figuras 8a, b, g, h), numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e amiloplastos com grânulos de amido visíveis (Figuras 8c-f, i-k); e componentes celulares intimamente ligados a parede celular, com paredes celulares espessas e espaço intercelular visível (Figuras 8f, e). Já na concentração de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  L-glutamina, a célula possui características de calo embriogênico, diferenciando das células na ausência desse aminoácido e na concentração de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  pela fragmentação de vacúolos (Figuras 8m, n).

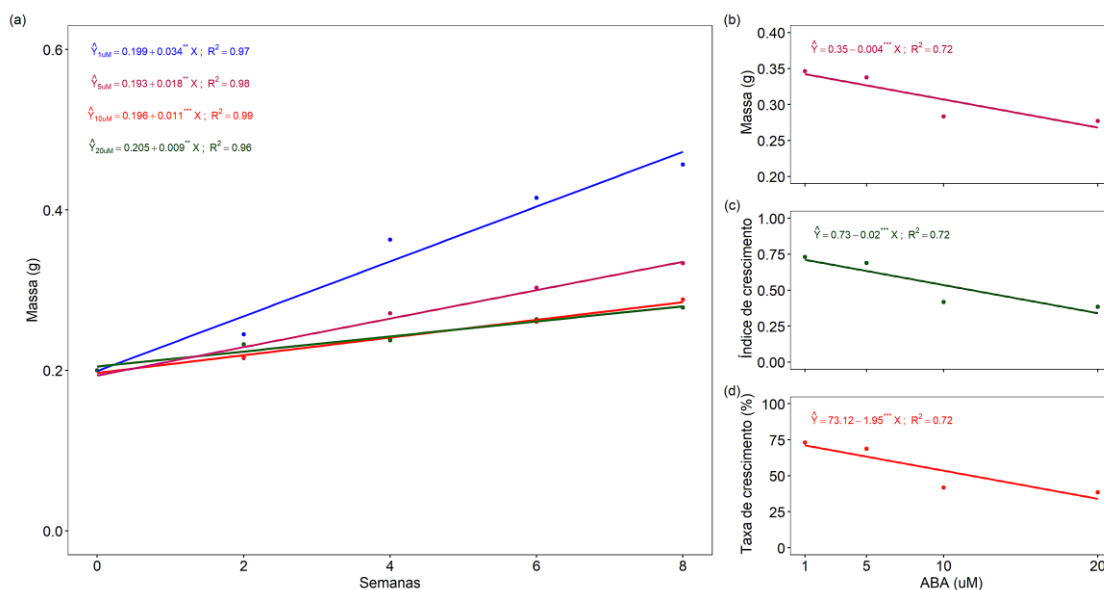


**Figura 8.** Segmentos de caulículos de plântulas induzido sem adição de fonte de aminoácidos de *E. edulis*, em destaque amostra utilizada para o MET (tracejado em azul), e célula (tracejado em vermelho) do tecido embriogênico (a), núcleo (N), heterocromatina (HE), eucromatina (E), e vacúolo (V) (b), retículo endoplasmático (RE), amiloplastos (A) e amidos (asteriscos vermelhos) (c), retículo endoplasmático e lisossomo (L) (d), retículo endoplasmático, lisossomo, mitocôndria (M), complexo de Golgi (CG) (e), retículo endoplasmático com destaque da membrana nuclear (seta azul), mitocôndrias, parede celular (PC) e espaço intercelular (EI). Segmentos de caulículos de plântulas induzido com  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de L-glutamina, em destaque amostra utilizada para o MET (tracejado em azul), e célula (tracejado em vermelho) do tecido embriogênico (g), núcleo, heterocromatina, eucromatina (h), núcleo com destaque da membrana nuclear (seta azul), mitocôndrias, retículo endoplasmático (i), núcleo com destaque da membrana nuclear (seta azul), mitocôndrias, (j), amiloplastos e amidos (asteriscos vermelhos) (k), parede celular (l). Segmentos de caulículos de plântulas induzido com  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  de L-glutamina, em destaque amostra utilizada para o MET (tracejado em azul), e célula (tracejado em vermelho) do tecido embriogênico (m), núcleo, nucléolo, heterocromatina, eucromatina e vacúolo (n), mitocôndrias, amiloplastos e amidos (asteriscos vermelhos), complexo de Golgi (o), núcleo com destaque da membrana nuclear (seta azul), retículo endoplasmático, mitocôndrias, vacúolo (p), lisossomo (q), parede celular (r).

### 3.4 Maturação

Os embriões somáticos na cultura de suspensão começaram a crescer logo na segunda semana, e após a quarta semana, os embriões na concentração  $1 \mu\text{M}$  de ABA começaram a multiplicar-se, com o surgimento de novas estruturas globulares, se destacando das demais concentrações (Figura 9a). Após oito semanas, a concentração de  $1 \mu\text{M}$  de ABA apresentou as maiores médias de massa final, índice e taxa de crescimento (0,35; 0,73 e 73,11%, respectivamente), decrescendo linearmente à medida que aumenta a concentração de ABA. Os embriões somáticos globulares nas concentrações 10 e  $20 \mu\text{M}$  de ABA começaram a apresentar características de oxidação a partir da sétima semana, o que influenciou as menores médias de massa final, índice e taxa de crescimento (Figuras 9b-d).





**Figura 9.** Crescimento da cultura de suspensão de *E. edulis* ao longo de 12 semanas (a), massa final (b), índice de crescimento (c), e taxa de crescimento (d) na maturação com ABA (1, 5, 10 e 20  $\mu$ M). Coeficiente estatisticamente significativo a \*\*\*0,01 e \*\*1% pelo teste t.

#### 4 DISCUSSÃO

Caulículos de *E. edulis* cortados longitudinalmente e dispostos para cima e/ou de lado no meio MS suplementado com PIC (150  $\mu$ M), foi a condição mais adequada para induzir a embriogênese somática, sendo o uso do explante dispostos para cima mais prático. Em *Medicago truncatula* Gaertn., a resposta ao estresse induzida por ferimento e a reação de defesa durante a primeira semana de crescimento do calo envolvem primeiro um aumento na atividade de SOD e CAT, depois APX (ORLOWSKA; KĘPCZYŃSKA, 2020). Em *Arabidopsis* o fator de transcrição AP2/ERF, WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1 (WIND1) e seus homólogos próximos (WIND2-4), são rapidamente induzido no local da ferida, promovendo a dediferenciação e subsequente proliferação celular para formar uma massa de células pluripotentes denominada calo (IWASE et al., 2011a,b). E segundo estes autores, a superexpressão ectópica de WIND1 é suficiente para estabelecer e manter o status indiferenciado de células somáticas sem auxina e citocinina exógenas, dois hormônios vegetais que são normalmente necessários para a dediferenciação celular. De acordo com Iwase et al. (2015), a ativação sequencial de *WIND1* e um regulador embrionário *LEAF COTYLEDON2 (LEC2)*, induz a embriogênese somática em

locais cortados e não cortados, enquanto a ativação única de LEC2 permite a embriogênese apenas em locais cortados.

Os segmentos de caulículo de plântulas de *E. edulis* seccionados longitudinalmente (espessura de  $\cong 0,2$  mm) com o corte disposto para cima e/ou de lado no meio MS obtiveram resultados superiores ao explante seccionado apenas transversalmente (Figuras 2, 3). Pois, um outro fator importante na resposta *in vitro* é o tamanho do explante utilizado, o uso de camada de células finas (*thin cell layer* - TCL), consiste em explantes de pequenos tamanhos de 1 mm x 0,5 ou 10 mm, que incluem apenas um tipo de tecido, como uma monocamada de células epidérmicas; ou 0,2/0,5 mm com várias (3-6) camadas de células de diferentes tipos de tecidos (VAN; GENDY, 1996). O uso dessa técnica mostrou-se eficiente quando utilizada em explantes de *Bactris gasipaes*, em que foi observada baixa indução de calos quando utilizado explantes com 1 cm de espessura, e quando utilizados TCL a indução de calos primários foi de 83-97% (STEINMACHER et al., 2007).

Explantes maiores mantêm interações teciduais normais, que podem inibir a divisão celular por meio da manutenção de domínios simplastos. Já em explantes menores ocorre maior contato superficial com o meio de cultura, maior nível de estresse, aumentando conseqüentemente o metabolismo celular. Além disso, ocorre a síntese de novos componentes da parede celular, como oligossacarídeos, atuando como sinais para a célula entrar em ciclo mitótico (STEINMACHER et al., 2007).

Além dos fatores externos que influenciam a indução embriogênica, os fatores genéticos também são muito importantes. No presente trabalho, o genótipo do pai (doador de pólen) pode ter sido primordial para a resposta embriogênica, visto que, a análise de dissimilaridade das plântulas filhas responsivas e não-responsivas em relação a planta mãe foi dividida em dois grupos, e em ambos conteve plântulas que foram responsivas e não-responsivas.

A cultura de calos em meio de suspensão (MS líquido) suplementado com 15  $\mu$ M de PIC foi superior às concentrações maiores testadas, justamente aquela 10 vezes menor à utilizada no meio sólido. A agitação do meio líquido permitiu uma multiplicação mais rápida de calos previamente obtidos em meio sólido,

permitindo a embriogênese somática secundária, manifestada pela neoformação de novos pequenos nódulos embriogênicos isolados e o desenvolvimento de proembriões.

A cultura em suspensão de células é considerada superior à cultura de calo, pois possui maior contato do meio com o tecido, transferência rápida e uniforme de nutrientes, acesso mais fácil ao regulador de crescimento, redução do efeito de de toxinas que são comumente liberadas pelos tecidos, com a troca constante do meio líquido, promovendo assim, uma rápida taxa de multiplicação do tecido (KONG et al., 2020).

A cultura em suspensão celular tem sido utilizada em várias espécies de palmeiras para propagação via embriogênese somática e posterior regeneração de plântulas. No entanto, a pesquisa tem se concentrado nas espécies *Elaeis guineensis* Jacq, *Phoenix dactylifera* L., *Cocos nucifera* L. e *Bactris gasipaes* Kunth (KONG et al., 2020). Esta é a primeira pesquisa com cultura em suspensão com o gênero *Euterpe*.

A L-glutamina e a caseína hidrolisada também vem sendo utilizadas em meio de cultura em muitas espécies da família Arecaceae (LEDO et al., 2002; STEINMACHER et al., 2007; ZOUINE; EL HADRAMI, 2007; MOURA et al., 2009; KONAN et al., 2010; SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016; FERREIRA et al., 2022), como uma alternativa de adicionar nitrogênio orgânico, para aumentar o metabolismo celular, síntese das proteínas de reserva e açúcares, diferenciação e crescimento celular nos tecidos vegetais (ZOUINE; EL HADRAMI, 2007; PARAST et al., 2011). No presente estudo, apesar da diferença estatística, essa é baixa, tanto que a nível celular são semelhantes entre as concentrações e ausência de L-glutamina (Figura 8). Portanto, economicamente é mais viável não utilizar L-glutamina e a caseína hidrolisada no meio de cultura para indução embriogênica de segmentos caulinares de plântulas de *E. edulis*.

Em estudos de maturação de embriões somáticos de *Phoenix dactylifera* L. em cultura de suspensão a adição de ABA ao meio de cultura aumentou a produção e a maturidade embriões somáticos e aumentou o acúmulo de proteínas, lipídios e amido nos embriões somáticos (ALWAEEL; NAIK; AL-KHAYRI, 2017). Além disso, o uso de ABA suprime a formação de estruturas

embrionárias anormais e impede que o embrião em maturação germine precocemente (ZOUINE et al., 2005, RAI et al., 2011).

## 5 CONCLUSÕES

Caulículos com ferimentos longitudinais, posicionados para cima e no meio MS+picloram (150  $\mu$ M) proporcionou maiores taxas de indução embriogênica.

Calos friáveis em meio líquido sob agitação é inédito para a espécie *E. edulis*, em que apresentaram maior crescimento em meio MS+picloram (15  $\mu$ M).

Não há necessidade do uso dos aminoácidos L-glutamina e caseína hidrolisada na indução embriogênica de caulículos de *E. edulis*.

Na maturação 1  $\mu$ M de ABA proporcionou a maior massa final, índice e taxa de crescimento.

## 6 REFERÊNCIAS

ALWAEL, H. A.; NAIK, P. M.; AL-KHAYRI, J. M. **Synchronization of somatic embryogenesis in date palm suspension culture using abscisic acid**. In: AL-KHAYRI, J.; JAIN, S.; JOHNSON, D. (eds) Date palm biotechnology protocols. Humana Press: New York, 2017. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_18)

CARDOSO, A.; LIZ, S.; RIEGER, D.; FARAH, A.; VIEIRA, F. K.; ASSIS, M. A.; DI PIETRO, P. An update on the biological activities of *Euterpe edulis* (juçara). **Planta Medica**, v. 84, n. 8, p. 487-499, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0044-101624>

CURSI, P. R.; CICERO, S. M. Fruit processing and the physiological quality of *Euterpe dulis* Martius seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, p. 134-142, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v32n2847>

FARIA, D. V.; CORREIA, L. N. F.; MATOS, E. M.; SOUZA, M. V. C.; BATISTA, D. S.; COSTA, M. G. C.; PAIVA NETO, V. B.; XAVIER, A.; ROGALSKI, M.; OTONI, W. C. Wounding and medium formulation affect de novo shoot organogenic responses in hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 277-289, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09978-2>

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. x, p. y-y, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>

FREITAS, E. DE O.; MONTEIRO, T. R.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, n. 14, p. 126-135, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.044>

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3159-3173, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>

IWASE, A.; HARASHIMA, H.; IKEUCHI, M.; RYMEN, B.; OHNUMA, M.; KOMAKI, S.; MOROHASHI, K.; KURATA, T.; NAKATA, M.; OHME-TAKAGI, M.; GROTEWOLD, E.; GROTEWOLD, E.; SUGIMOTO, K. WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 29, p. 54-69, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00623>

IWASE, A.; MITSUDA, N.; KOYAMA, T.; HIRATSU, K.; KOJIMA, M.; ARAI, T.; INOUE, Y.; SEKI, M.; SAKAKIBARA, H.; SUGIMOTO, K.; OHME-TAKAGI, M. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 21, p. 508-514, 2011a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.020>

IWASE, A.; OHME-TAKAGI, M.; SUGIMOTO, K. WIND1: A key molecular switch for plant cell dedifferentiation. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 12, p. 1943-1945. 2011b. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.6.12.18266>

IWASE, A.; MITA, K.; NONAKA, S.; IKEUCHI, M.; KOIZUKA, C.; OHNUMA, M.; EZURA, H.; IMAMURA, J.; SUGIMOTO, K. WIND1-based acquisition of regeneration competency in Arabidopsis and rapeseed. **Journal of Plant Research**, v.128, p.389-397, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0714-y>

KONAN, E. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 1-13, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0787-y>

KONG, E. Y. Y.; BIDDLE, J.; FOALE, M.; ADKINS, S. W. Cell suspension culture: A potential *in vitro* culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112125, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112125>

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000300004>

LUP, S. D.; TIAN, X.; XU, J.; PÉREZ-PÉREZ, J. M. Wound signalling of regenerative cell reprogramming. **Plant Science**, v. 250, p. 178-187, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.012>

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

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENDRELLA, M. C.; SÁ, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 447-454, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.033>

ORŁOWSKA, A.; KĘPCZYŃSKA, E. Oxidative status in *Medicago truncatula* Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues with particular reference to somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 140, p. 35-48, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01709-0>

PARAST, B. M.; CHETRI, S. K.; SHARMA, K.; AGRAWAL, V. *In vitro* isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1138-1146, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.03.017>

RAI, M. K.; SHEKHAWAT, N. S.; HARISH; GUPTA, A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 179-190, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9923-9>

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

SALDANHA, C. W.; 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, n. 3, p. 171-178, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-70332012000300002>

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, J. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 3, p. 501-508, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0115-z>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v. 100, p. 699-709, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcm153>

VAN, K. T. T.; GENDY, C. **Thin cell layer (TCL) method to programme morphogenetic patterns**. In: LINDSEY, K. (eds), Plant tissue culture manual. Dordrecht: Springer, 1996, p. 1065-1089. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0181-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0181-0_5)

WENDT, T.; CRUZ, D. D.; DEMUNER, V. G.; GUILHERME, F. A. G.; BOUDET-FERNANDES, H. An evaluation of the species boundaries of two putative taxonomic entities of *Euterpe* (Arecaceae) based on reproductive and morphological features, **Flora**, v. 206, n. 2, p. 144-150, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2010.03.002>

ZOUINE, J.; BELLAJ, M. E.; MEDDICH, A.; VERDEIL, J. L.; EL HADRAMI, I. Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in *Phoenix dactylifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 83-92, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6914-0>

ZOUINE, J.; EL HADRAMI, I. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 221-226, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.041>

## CAPÍTULO IX

### **Idade cronológica a favor da embriogênese somática direta de *Euterpe edulis* Martius**

**Resumo:** A espécie *Euterpe edulis* Martius é uma palmeira nativa da Floresta Atlântica ameaçada de extinção, pois não perfilha e produz um tipo nobre de palmito fortemente explorado, levando a morte da planta, e sua única forma de propagação é via sementes. Portanto, objetivou-se nesse estudo, analisar a resposta embriogênica de *E. edulis* em virtude do grau de maturidade do explante associado à concentração do indutor embriogênico. Para isso, foram colhidos frutos imaturos e postos para germinar *in vitro*. Após 2, 4, 6, e 8 meses, as plântulas geradas foram excisadas a parte aérea, sendo utilizados segmentos de caulículo para indução embriogênica. Na indução, o meio de cultura MS foi suplementado com picloram nas concentrações 100, 125, 150, 175 e 200  $\mu\text{M}$ , seguido para a maturação suplementado com 5  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico (ABA). Após a indução, foram analisados o número de proembriões, taxa de indução, massa do explante, oxidação, metilação global de DNA, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), prolina, poliaminas, e análise qualitativa das células por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Explantes de plântulas de seis meses obtiveram as maiores médias de número de proembrião e taxa de indução embriogênica na maioria das concentrações de picloram testadas. Explantes com embriões somáticos possuem menor metilação global de DNA comparado a calos não-embriogênicos. Segmentos de caulículo de plântulas mais jovens (dois meses) possuem maior incremento de prolina, que diminui com o aumento da idade. A embriogênese com plântulas de 6 meses foi a que obteve a maior concentração de ACC e o menor incremento de espermina e putrescina (33 e 173%). E, a maturação ocorreu de forma assíncrona, porém eficiente com o uso de ABA (5  $\mu\text{M}$ ). Portanto, é recomendado o uso de plântulas com seis meses de *E. edulis*, sendo a mais responsiva na indução embriogênica com picloram (200  $\mu\text{M}$ ).

**Palavras-chave:** maturidade do explante, picloram, metilação global de DNA, poliaminas, *in vitro*, juçara.



**Abstract:** The species *Euterpe edulis* Martius is a palm tree native to the Atlantic Forest threatened with extinction, as it does not sprout and produces a noble type of palm heart that is heavily exploited, leading to the death of the plant, and its only form of propagation is via seeds. Therefore, the objective of this study was to analyze the embryogenic response of *E. edulis* due to the degree of maturity of the explant associated with the concentration of the embryogenic inducer. For this, immature fruits were harvested and placed to germinate *in vitro*. After 2, 4, 6, and 8 months, the generated seedlings were excised from the shoot, using stem segments for embryogenic induction. At induction, the MS culture medium was supplemented with picloram at concentrations of 100, 125, 150, 175 and 200  $\mu\text{M}$ , followed by maturation supplemented with 5  $\mu\text{M}$  of abscisic acid (ABA). After induction, we analyzed the number of proembryos, induction rate, explant mass, oxidation, global DNA methylation, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), proline, polyamines, and qualitative analysis of cells by means of Transmission electronic microscopy. Six-month-old seedling explants had the highest means of proembryo number and embryogenic induction rate at most tested picloram concentrations. Explants with somatic embryos have lower overall DNA methylation compared to non-embryogenic callus. Stem segments of younger seedlings (two months) have a greater increase in proline, which decreases with increasing age. Embryogenesis with 6-month-old seedlings had the highest concentration of ACC and the lowest increment of spermine and putrescine (33 and 173%). The maturation occurred asynchronously, but efficiently with the use of ABA (5  $\mu\text{M}$ ). Therefore, it is recommended to use seedlings with six months of *E. edulis*, being the most responsive in embryogenic induction with picloram (200  $\mu\text{M}$ ).

**Keywords:** explant maturity, picloram, global DNA methylation, polyamines, *in vitro*, juçara.

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Euterpe edulis* Martius é uma palmeira nativa da Floresta Atlântica ameaçada de extinção, pois não perfilha e produz um tipo nobre de palmito fortemente explorado desde o final da década de 60, levando a morte da planta (SCHULZ et al., 2016). Seus frutos são muito apreciados pelos consumidores de açaí, pelo sabor mais doce que o açaí produzido pelo *E. oleracea* Martius e *E. precatoria* Martius, além da qualidade nutricional superior (BORGES et al., 2013). Portanto, uma espécie extremamente relevante na preservação da Floresta Atlântica e na economia (GARCIA et al., 2019).

Sua propagação se dá unicamente por sementes, normalmente produzidas anualmente, sua coleta é dificultada pela altura da palmeira (5-12 m) e pela alta dispersão pela fauna (SCHULZ et al., 2016). Além disso, a falta de perfilhamento, causa limitações para a reprodução assexuada, impondo barreira à propagação em larga escala.

A técnica de embriogênese somática é considerada a ferramenta de biotecnologia mais eficiente para propagação de plantas selecionadas (CORREDOIRA et al., 2019). Para tornar células somáticas em embriogênicas, são necessários estímulos para que adquiram competência, o que muitas vezes depende da desdiferenciação, requerendo a ativação da divisão celular para a manutenção de um novo destino, de indução de embriões (ISAH, 2016).

A capacidade das células somáticas de um explante converter-se a embriogênicas varia com a condição das plantas parentais, normalmente, diminuindo à medida que as plantas envelhecem, possivelmente devido a uma resposta reduzida aos reguladores de crescimento (IKEUCHI et al., 2016). Logo, o grau de maturidade dos tecidos utilizados pode influenciar nas respostas embriogênicas, no nível fisiológico, pelo estágio do ciclo celular das células dos explantes, sua disponibilidade para transportar reguladores de crescimento para ligar-se aos genes de indução e a capacidade metabólica das células (ISAH, 2016). Assim, a hipótese é que quanto mais juvenil o explante, maior será sua responsividade.

A escolha do explante para a indução de tecido embriogênico requer um estudo minucioso da resposta à condição de cultura pelo material de partida maduro ou juvenil selecionado. Portanto, objetivou-se nesse estudo, analisar a

resposta embriogênica de *E. edulis* em virtude do grau de maturidade do explante assoado à concentração do indutor embriogênico picloram.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta, desinfestação e estabelecimento

Os frutos de *E. edulis* foram colhidos de uma planta matriz de 6,7 m de altura e 13,4 cm de DAP (diâmetro na altura do peito - 1,30 m), localizada no distrito de Pedra Menina, no município de Dores do Rio Preto, Espírito Santo, Brasil próximo ao Parque Nacional do Caparaó, nas coordenadas 20°32'45,4" S, 41°49'35,7" W, e na altitude 951 m. A colheita dos frutos ocorreu com aproximadamente 168 dias após a antese, e encaminhados para o Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAEE-UFES). Onde foram obtidos os dados de massa fresca e seca do fruto (MFF e MSF, g), umidade (U, %), diâmetro médio do fruto (DM, mm) e volume (V, cm<sup>3</sup>).

Após a limpeza dos frutos, foi retirado o tegumento, e em seguida, os mesmos foram imersos em solução de ácido ascórbico à 2%, para impedir a oxidação fenólica dos tecidos vegetais. Na câmara de fluxo laminar, as sementes de *E. edulis* foram imersas em álcool etílico à 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (Candura<sup>®</sup>) a 2,5% por 10 minutos e em solução de amoxicilina (Germed<sup>®</sup>) a 3 g L<sup>-1</sup> por 10 minutos, realizando-se a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada após cada etapa.

As sementes foram dispostas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma<sup>®</sup>), suplementado com 1 g L<sup>-1</sup> PVP (polivinilpirrolidona) (Synth<sup>®</sup>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica<sup>®</sup>), 0,1 g L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma<sup>®</sup>), e 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Kasvi<sup>®</sup>). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 com hidróxido de potássio (KOH) (Alphatec<sup>®</sup>) e/ou ácido clorídrico (HCl) (Vetec<sup>®</sup>) a 1,0 N, antes da autoclavagem.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, e no escuro, até a obtenção das plântulas com 2, 4, 6 e 8 meses. Durante esse período, foram obtidos os dados de porcentagem de germinação (%) (BRASIL, 2009), frequência relativa de germinação (FrG), índice de

velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), e tempo médio de germinação (TMG, d) (LABOURIAU, 1983). Em cada idade, foram avaliados a altura das plântulas (cm), diâmetro do coleto (mm), e massa fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA, g).

## 2.2 Indução

As plântulas de cada idade foram excisadas no coleto e ápice, deixando a parte mediana com aproximadamente 20 mm. Este foi seccionado transversalmente em dois explantes de 10 mm, e em seguida, longitudinalmente. Os explantes foram dispostos com a superfície ferida voltada para cima em meio de cultura MS, com 0,1 g L<sup>-1</sup> mio-inositol, 1 g L<sup>-1</sup> PVP e 30 g L<sup>-1</sup> sacarose. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da adição do ágar-ágar (5,5 g L<sup>-1</sup>). Após autoclavagem, o meio foi suplementado com ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinocarboxílico (PIC-picloram) nas concentrações 100, 125, 150, 175 e 200 µM, filtrado.

Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 60 dias. E analisados, o número de proembriões, taxa de indução (%), massa do explante (g), e oxidação (%).

### 2.2.1. Metilação global de DNA

#### 2.2.3.1. Extração de DNA genômico

Foram utilizados 200 mg de amostras embriogênicas e não-embriogênicas de *E. edulis* cultivados *in vitro*, que inicialmente foram macerados com auxílio de nitrogênio líquido e submetidos ao tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, brometo de cetil trimetil amônio - CTAB 2% (p/v), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8,0, β-mercaptop 0,2% (p/v) e proteinase K 0,1 mg mL<sup>-1</sup>), as amostras foram incubadas por 30 minutos a 65 °C. Em seguida foi adicionado 650 µL da solução CIA (96% (v/v) de clorofórmio e 4% (v/v) de álcool isoamílico), as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12000 rpm 10 min<sup>-1</sup>. A fase aquosa pós centrifugação foi transferida para microtubos limpos, novamente foi adicionado 650 µL da solução CIA e as amostras centrifugadas (12000 rpm 10 min<sup>-1</sup>).

A precipitação do DNA ocorreu por meio da adição de um volume de isopropanol a 4°C, as alíquotas foram centrifugadas por 12.000 rpm 15 min<sup>-1</sup>. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70%, a secagem do *pellet* ocorreu no Concentrator plus/ Vacufuge<sup>®</sup> Plus, durante 10 minutos. No final da extração as amostras foram ressuspensas em 40 µL em solução TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0, RNAase 40 µg mL<sup>-1</sup>), e incubadas durante 30 minutos a 37 °C, para degradação do RNA.

### **2.2.3.2. Determinação do teor global de metilação**

Foram utilizados 30 µg de DNA por amostra de material biológico em solução contendo 100 µL de água ultrapura e 50 µL de ácido perclórico 70% (v/v), que foi aquecido por 60 min a 100 °C. Posteriormente, o pH foi ajustado entre 3 e 5 pela adição de solução de hidróxido de potássio (1,0 mol L<sup>-1</sup>), as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm 5 min<sup>-1</sup>. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, e no microtubo contendo o precipitado foi adicionado 200 µL de água ultrapura, para realização de duas eluições do DNA que restou no precipitado. Novamente, os microtubos foram centrifugados a 10000 rpm 5 min<sup>-1</sup> e o sobrenadante transferido para o tubo novo, as amostras foram secas no Concentrator Plus/Vacufuge<sup>®</sup> Plus, no vácuo durante 5 h.

### **2.2.3.3. Análise na cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE**

As amostras foram ressuspensas em 100 µL de água ultrapura e centrifugadas a 10000 rpm 5 min<sup>-1</sup>, transferidas para *vials* contendo *inserts*, e analisadas no aparelho de CLAE com coluna de aço inox Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, e 5 µm de tamanho de partícula; Agilent), no comprimento de onda monitorado é de 270 nm e fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

Para determinação da quantidade de citosina metilada encontrada nas amostras, foi realizado o cálculo em percentagem de 5-metilcitosina no DNA, segundo a equação:  $\%(5mC) = (A_{5mC} / (A_{5mC} + A_C)) \times 100$ . Em que  $A_{5mC}$  é o valor da área do pico que se refere a 5-metilcitosina e  $A_C$  é o valor da área do pico que se refere a citosina.

### 2.2.2. Análise de microscopia eletrônica de transmissão

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras dos diferentes grupos experimentais foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky contendo 2,5% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído e 0,1 M de tampão cacodilato. Posteriormente, os tecidos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e incluídos em resina epóxi (EMbed 812, Eletron Microscopy Sciences). Cortes ultrafinos (60-80 nm de espessura) foram obtidos em ultramicrotomo (UCT, Leica Microsystems) antes das etapas de coloração em acetato de uranila e citrato de chumbo. Micrografias eletrônicas representativas dos diferentes grupos foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1400, Japão) a 120 kV e ampliação de 12000 x. As análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória-ES.

### 2.2.3. Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, prolina e poliaminas

A extração do precursor do etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), prolina (Pro) e das poliaminas (PA) foram realizadas na parte aérea das plântulas (2, 4, 6 e 8 meses) e nos seus respectivos calos embriogênicos (150  $\mu$ M). A metodologia utilizada foi conforme a de Forcat et al. (2008), para avaliação do ACC, Pro e das poliaminas espermina (Spm), espermidina (Spd), e putrescina (Put).

As amostras de cada tratamento foram maceradas em cadinho com nitrogênio líquido, pesando-se 0,110 g por amostra em eppendorfs de 2 mL. Em seguida adicionou-se 400  $\mu$ L do extrator metanol:isopropanol:ácido acético (20:79:1), agitando em vortex por 20 s, repetindo-se quatro vezes para cada amostra e em seguida foram sonicadas por 10 min.

As amostras permaneceram em repouso durante 30 min em gelo, seguindo por sonicação por 10 min e levadas para centrifuga a 13000 rpm por 10 min/4 °C, coletando-se os sobrenadantes. Em seguida, adiciona-se novamente a solução extratora (400  $\mu$ L) e repete-se todas as etapas. Posteriormente as amostras foram filtradas em filtros de seringa PVDF 13 mm e 0,22  $\mu$ m.

Para a realização da leitura, as amostras foram injetadas no equipamento UHPLC-triploquadropolo (QQQ), através de um vial contendo 300 µL do extrato. Os resultados foram analisados no Software Skyline para a obtenção das áreas de cada pico e a massa do ACC, que foi calculada por meio da equação  $Y = 289,81X + 7,5177$ ,  $R^2 = 0,9995$ , sendo o resultado final convertido em  $\text{ng g}^{-1}$ . A prolina e as poliaminas foram analisadas por abundância relativa (AR), por meio da fórmula  $AR(\%) = (\text{área do tratamento calo} / \text{área do tratamento plântula}) \times 100$ .

#### 2.2.4. Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) em fatorial 4x5 (idades: 2, 4, 6 e 8 meses x PIC: 100, 125, 150, 175 e 200 µM), 10 repetições com quatro explantes, e triplicata para ACC, Pro e poliaminas. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (R CORE TEAM, 2020).

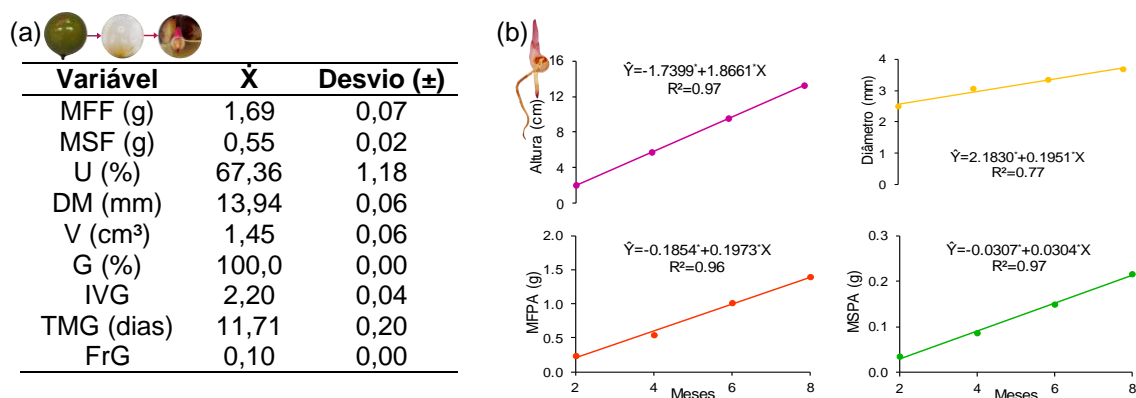
### 2.3 Maturação

Os explantes com embriões somáticos da indução foram transferidos para meio de cultura MS, com 0,1 g L<sup>-1</sup> mio-inositol, 1 g L<sup>-1</sup> PVP, e 30 g L<sup>-1</sup> sacarose. O pH do meio foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da adição do ágar-ágar (5,5 g L<sup>-1</sup>). O meio foi suplementado com 5 µM de ácido abscísico (ABA) (Sigma®). O experimento foi mantido em sala de crescimento a  $27 \pm 2$  °C no escuro, por 60 dias.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Indução

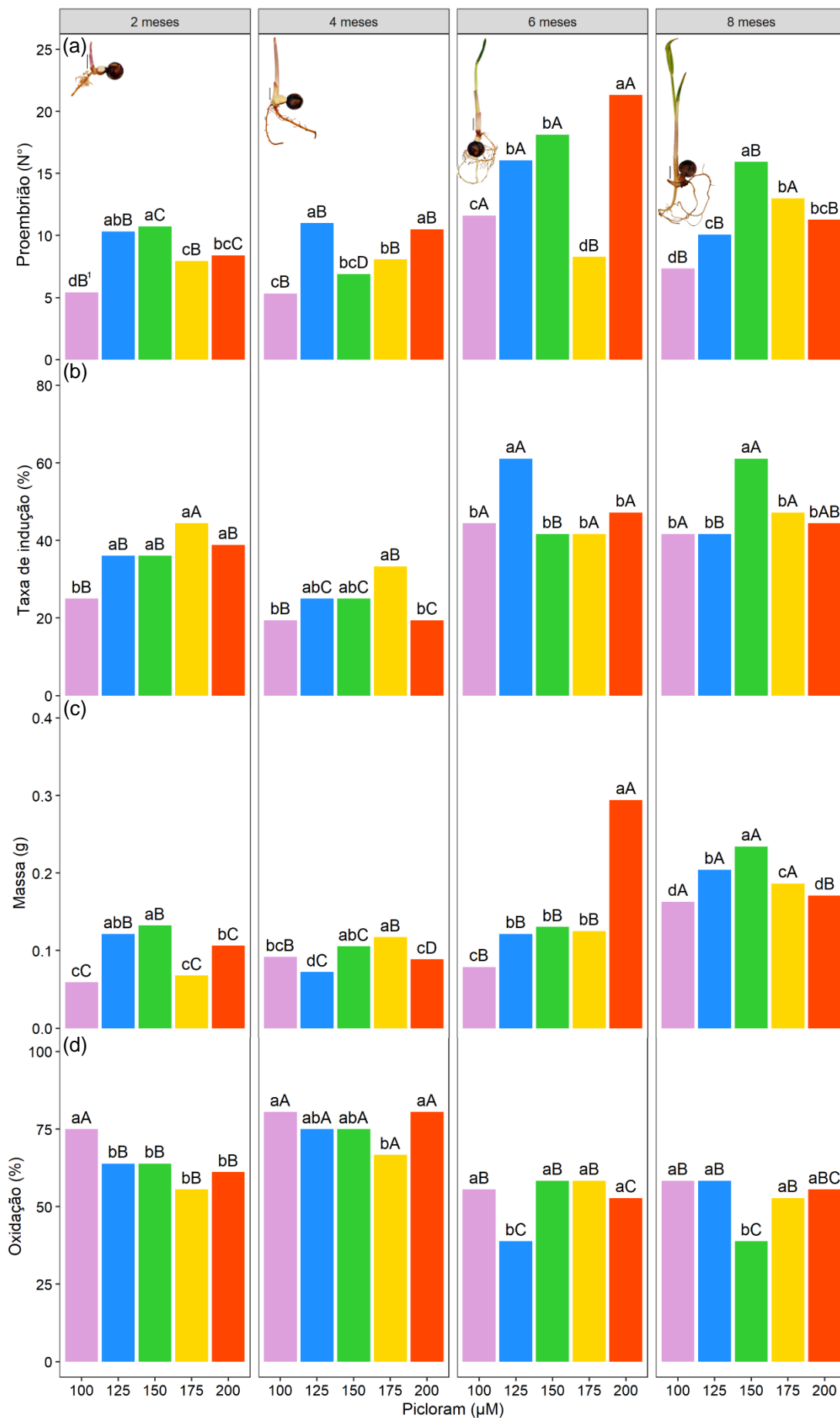
As sementes imaturas (~180 DAA) possuíam em média 1,69 g de massa fresca, com umidade de 67,36%, germinaram 100% *in vitro*, com IVG médio de 2,20 e TMG de 11,71 dias (Figura 1a). Após germinadas, as plântulas cresceram linearmente (Figura 1b).



**Figura 1.** Caracterização das sementes (a) e plântulas de *E. edulis*, com 2, 4, 6 e 8 meses de idade (b). MFF. Massa fresca do fruto (g); MSF. Massa seca do fruto (g); U. Umidade (%); DM. Diâmetro médio (mm); V. Volume do fruto (cm<sup>3</sup>); G. germinação (%); IVG. Índice de velocidade de germinação; TMG. Tempo médio de germinação (dias); FrG. Frequência relativa de germinação; MFFPA. Massa fresca parte aérea (g); e MSPA. Massa seca parte aérea (g). \*Coeficiente estatisticamente significativo a 5% pelo teste t.

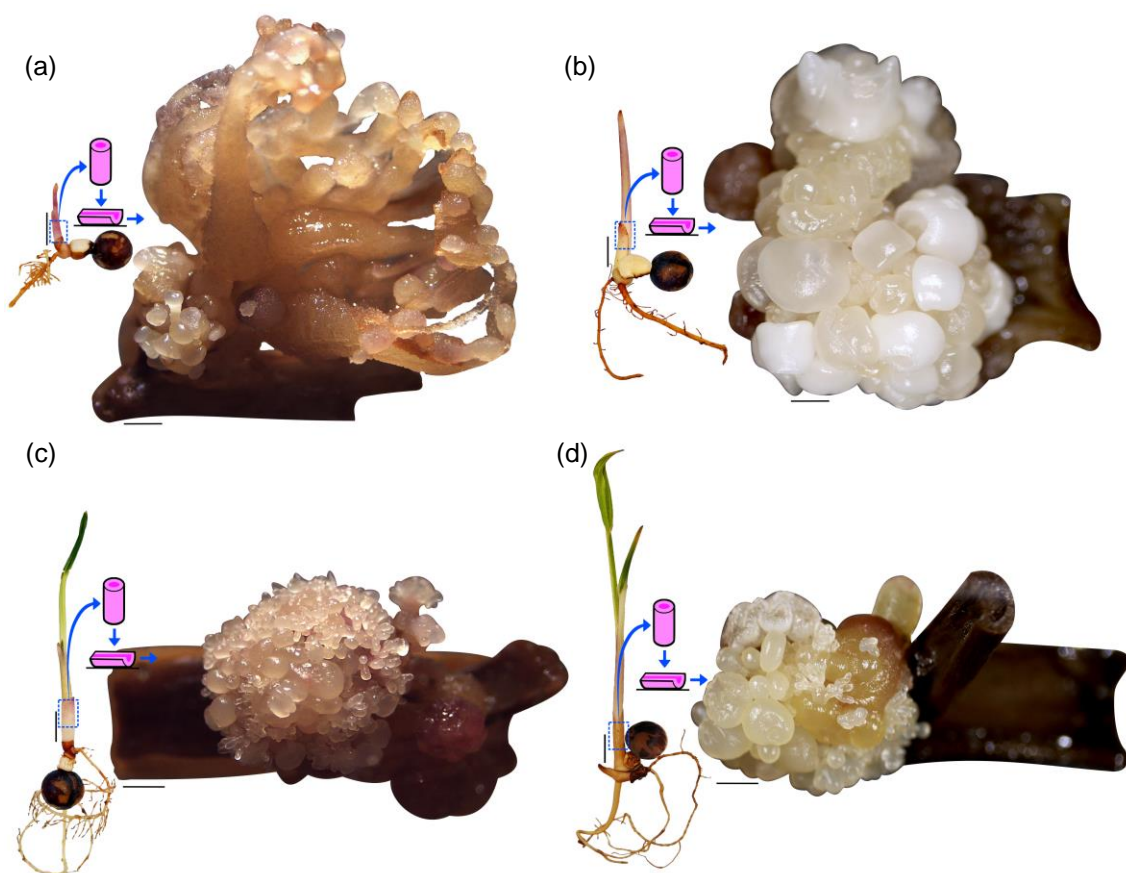
As plântulas de seis meses obtiveram as maiores médias de número de proembrião e taxa de indução embriogênica na maioria das concentrações de PIC testadas (100, 125, 150, e 200  $\mu$ M) (Figuras 2a, b), com destaque para 200  $\mu$ M, que também possui a maior média de massa fresca (Figura 2c). A indução dos segmentos das plântulas com idades de dois e quatro meses foram influenciados negativamente pela maior oxidação dos tecidos, nas concentrações de PIC (Figura 2d). Após seis meses de idade, os resultados de indução embriogênica com as plântulas de *E. edulis* começaram a diminuir.





**Figura 2.** Indução de embriogênese somática com explantes de *E. edulis* de diferentes idades e concentrações de PIC. Número de proembriões (a), taxa de indução - % (b), massa dos explantes - g (c), e oxidação - % (d). <sup>1</sup>Médias não seguidas da mesma letra minúscula (entre concentrações na mesma idade) e maiúscula (entre idades na mesma concentração), diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Barra: 1 cm.

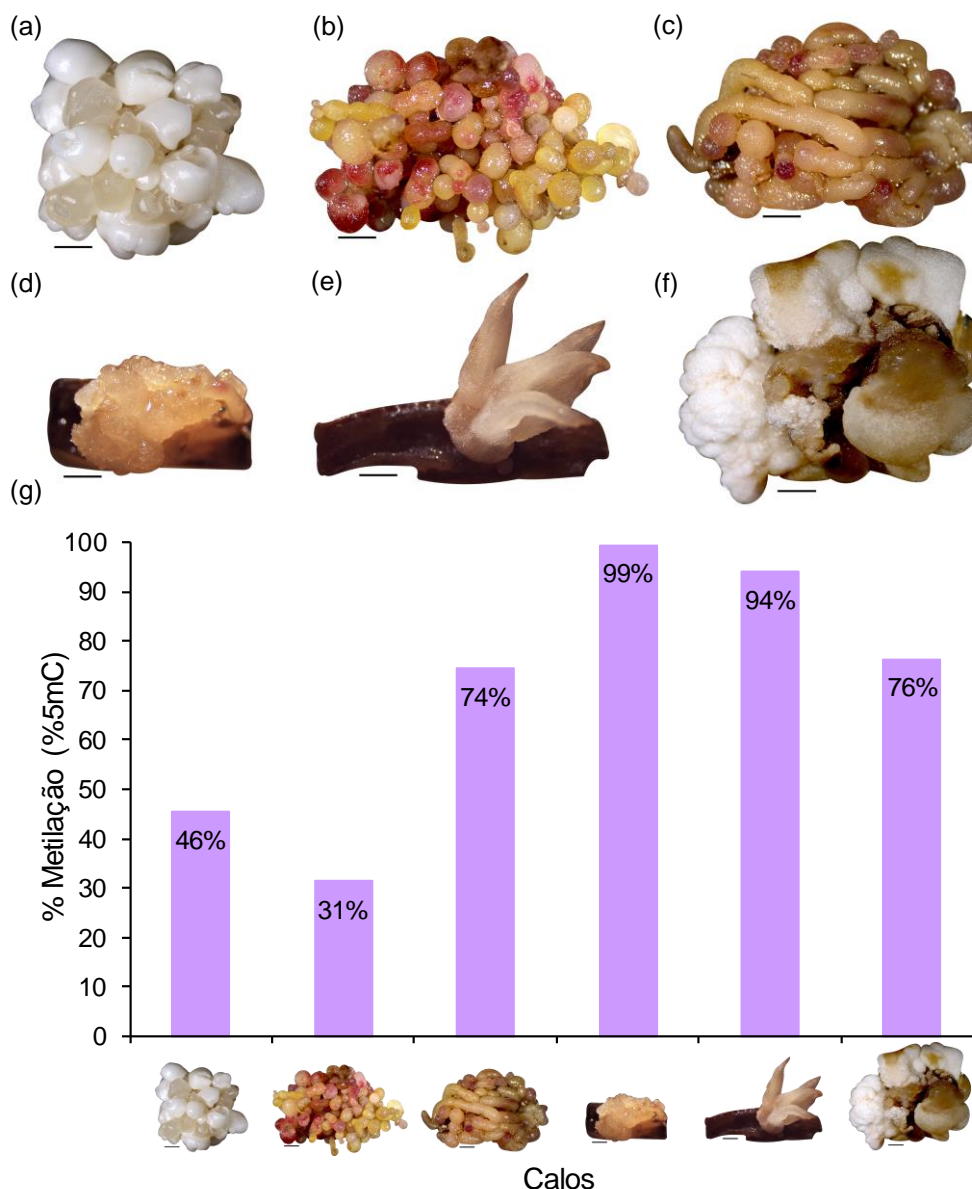
A formação de embriões somáticos ocorreu de forma direta e assíncrona após 60 dias na indução, podendo-se observar embriões em diferentes formas, cor e tamanhos (Figura 3), e visivelmente em maior quantidade nos explantes oriundos de plântulas de seis meses de idade (Figura 3c).



**Figura 3.** Indução de embriogênese somática com segmentos de caulículos de plântulas em diferentes idades de *E. edulis*, após tratamentos com PIC ( $150 \mu\text{M}$ ): dois (a), quatro (b), seis (c), e oito meses (d). Barra: plântulas 1 cm, explantes 1 mm.

Na indução embriogênica ocorreu a formação de diferentes estruturas, embriogênicas, com a presença de embriões somáticos, e não-embriogênicas (Figuras 4a-f). Com a análise de metilação global de DNA foi possível observar uma menor porcentagem em amostras embriogênicas com embriões somáticos

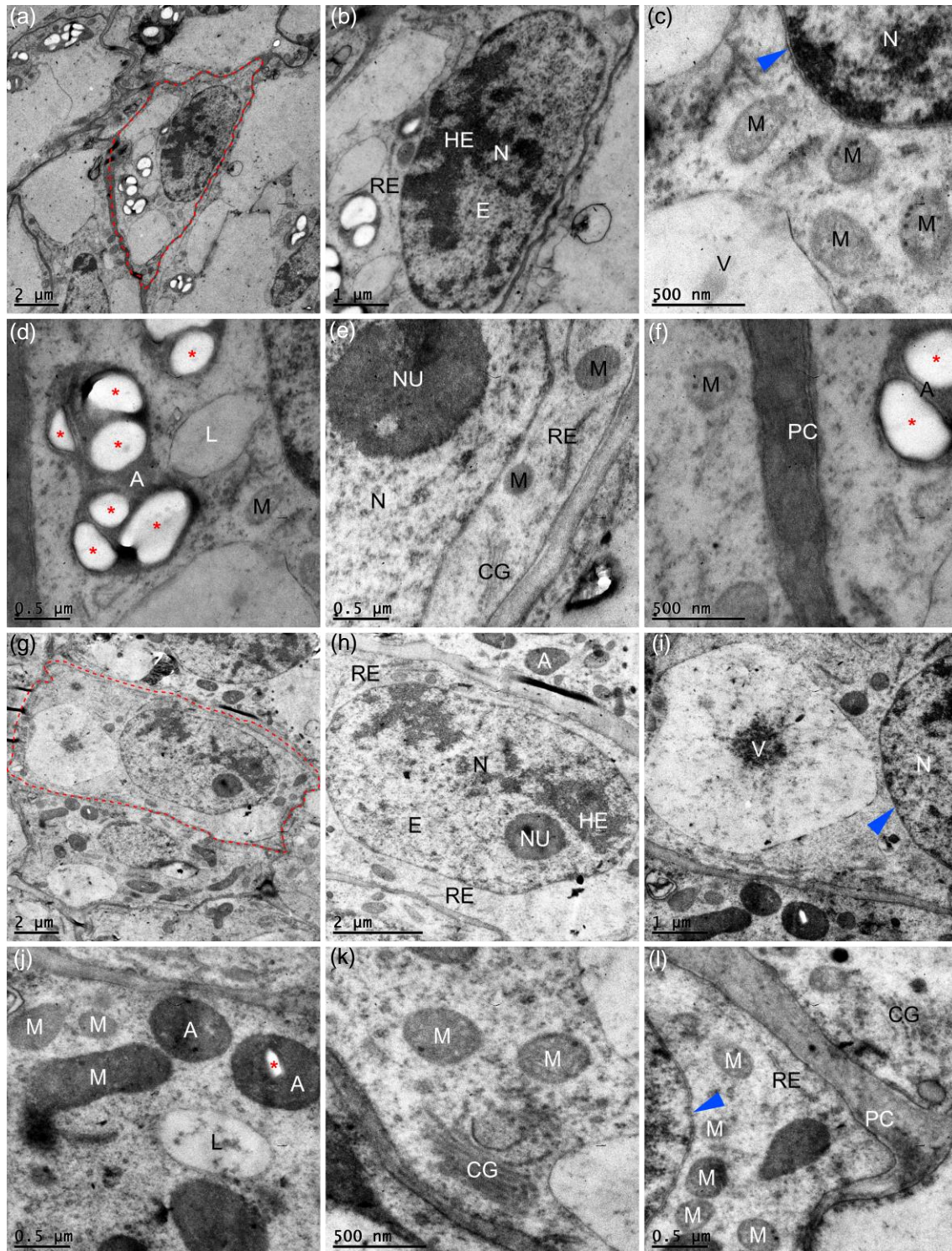
(31 e 45%), e uma alta porcentagem em amostras não-embriogênicas (74-99%) (Figura 4g).



**Figura 4.** Diferentes estruturas produzidas na indução de segmentos de caulículos de plântulas (seis meses) de *E. edulis*, embriogênicas com embriões somáticos brancos (a), amarelos (b); embriogênica e não-embriogênica, com estruturas alongadas (c); e não-embriogênicas, calo compacto amarelo (d), estruturas folhosas (e), e calos brancos (f). Porcentagem da metilação global de DNA (%5mC) de cada tipo de calo (g). Barra: 2000  $\mu$ M (a-g).

A diferença entre as idades também fica nítida ao analisar a nível celular o tecido embriogênico (Figura 5). Os explantes induzidos de plântulas de dois meses possuíam vacúolos mais fragmentados e amiloplastos mais evidentes, com grânulos de amido em destaque, quando comparado com o tecido de

explantes induzidos de plântulas de oito meses (Figuras 5a, d, g, j). Em ambos, possuíam células com características embriogênicas com citoplasma denso, núcleos e nucléolos evidentes, grandes e elétron-densos, núcleos com formato irregular, menor teor de heterocromatina x eucromatina (Figuras 5a, b, g, h), numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi (Figuras 5c, e, j, k); e componentes celulares intimamente ligados a parede celular, com paredes celulares espessas (Figuras 5f, l).

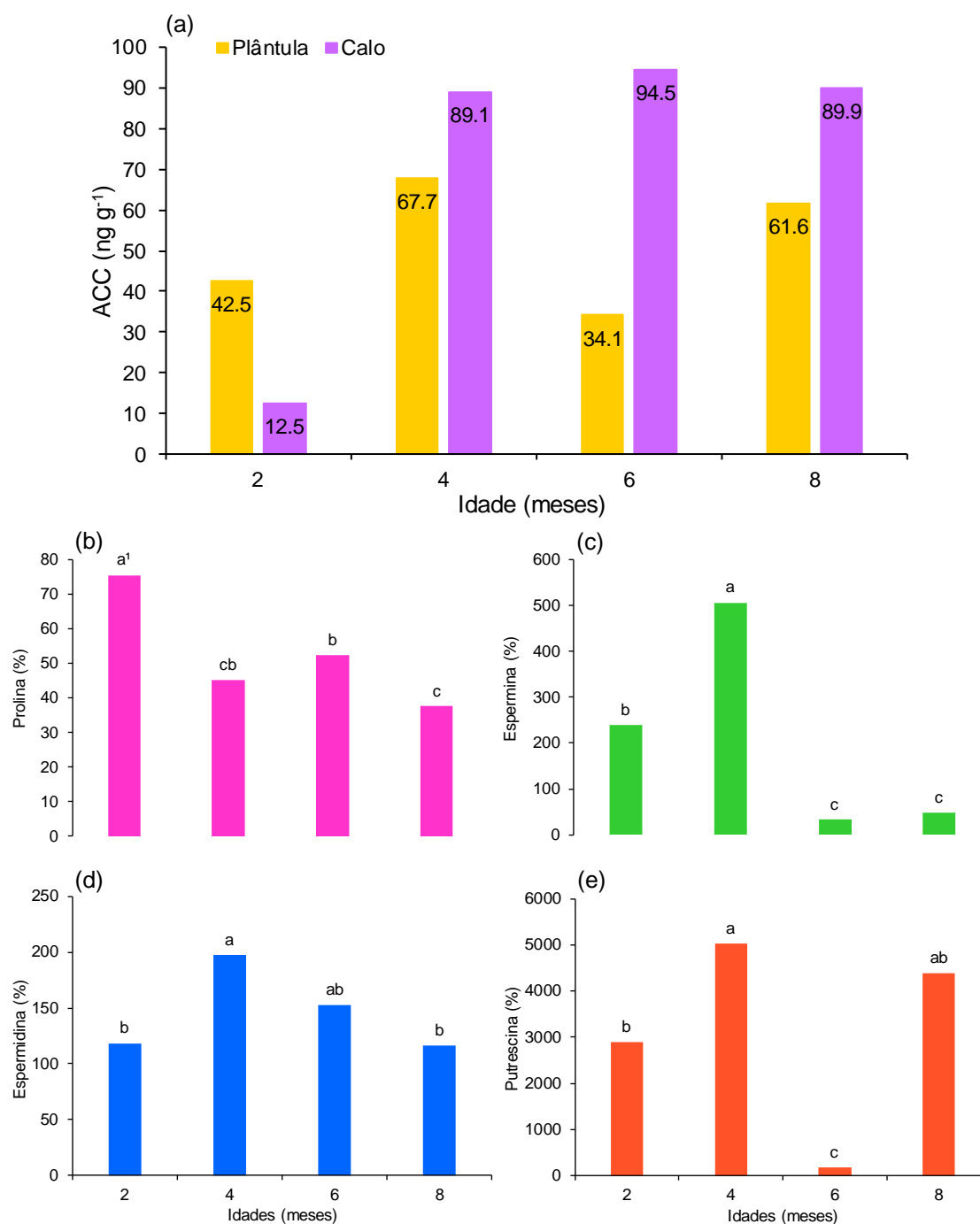


**Figura 5.** Célula (tracejado em vermelho) de tecido embriogênico oriundos da indução de segmentos de caulículos de plântulas de dois meses de *E. edulis*, após tratamento com PIC (150  $\mu\text{M}$ ) (a), núcleo (N), heterocromatina (HE), eucromatina (E), retículo endoplasmático (RE) (b), núcleo com destaque da membrana nuclear (seta azul), mitocôndrias (M), e vacúolo (V) (c), amiloplastos (A) e amidos (asteriscos vermelhos), lisossomo (L) (d), nucléolo (NU) e núcleo com retículo endoplasmático, mitocôndrias e complexo de Golgi (CG) ao seu redor (e), parede celular (PC) (f). Célula (tracejado em vermelho) de tecido embriogênico oriundos da indução de segmentos de caulículos de plântulas de oito meses de *E. edulis*, após tratamento com PIC (150

$\mu\text{M}$ ) (g), núcleo, nucléolo, heterocromatina, eucromatina, retículo endoplasmático (h), núcleo com destaque da membrana nuclear (seta azul), e vacúolo (i), mitocôndrias, amiloplastos e amidos (asteriscos vermelhos), e lisossomo (j), mitocôndrias e complexo de Golgi ao seu redor (k), parede celular (PC) (l).

A concentração de ACC aumentou após a indução para a maioria das idades, exceto na idade de dois meses, que diminuiu ( $42,5$  para  $12,5 \text{ ng g}^{-1}$ ). A parte aérea das plântulas de seis meses conteve a menor concentração de ACC ( $34,1 \text{ ng g}^{-1}$ ) entre as idades de plântulas, e a maior concentração entre os calos ( $94,5 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Figura 6a).

A embriogênese com plântulas de dois meses foi a que obteve o maior incremento em prolina (75%) (Figura 6b). Para espermina e espermidina o maior incremento ocorreu para a idade de quatro meses (507 e 197%, respectivamente) (Figuras 6c, d). A embriogênese com plântulas de seis meses foi a que obteve o menor incremento de espermina e putrescina (33 e 173%), no entanto o incremento em espermina não diferenciou estatisticamente da idade de oito meses (48%) (Figuras 6c, e).

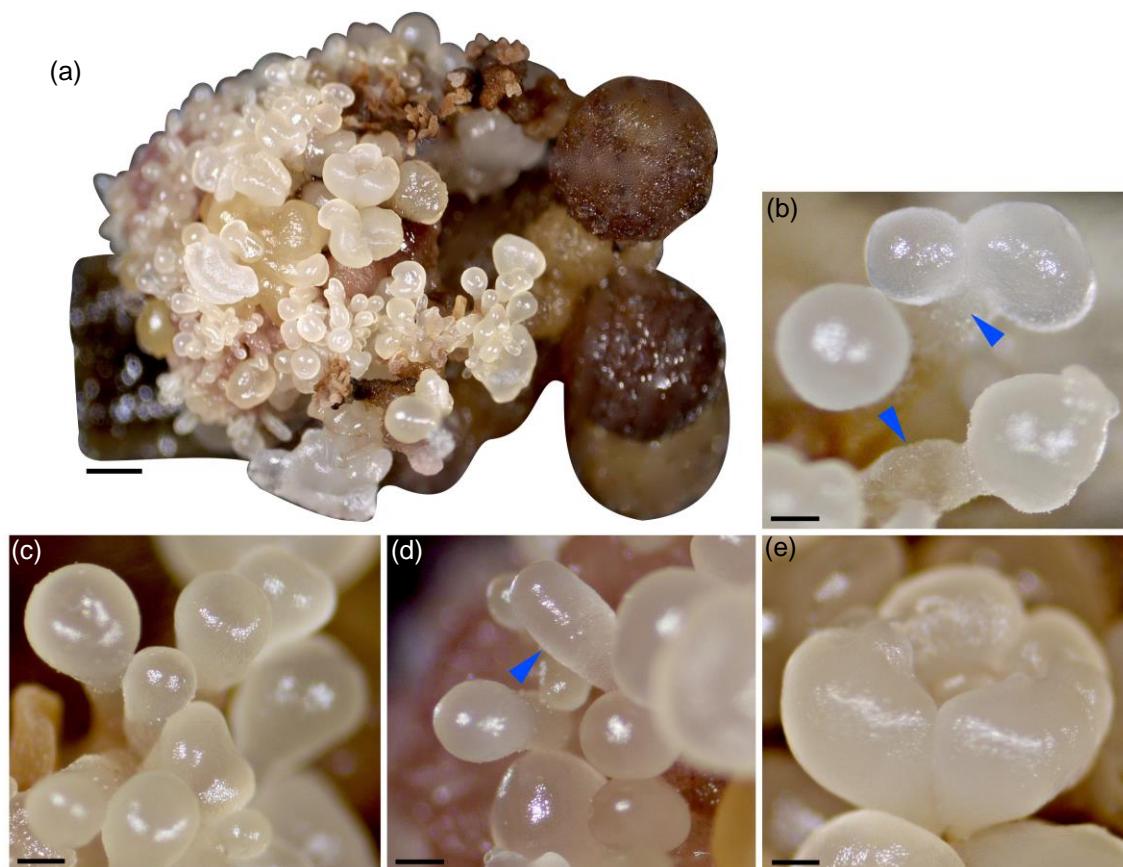


**Figura 6.** Concentração de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico – ACC – ng g<sup>-1</sup>, na parte aérea das plântulas e nos seus respectivos calos (a), e abundância relativa de prolina - % (b), espermina - % (c), espermidina - % (d), e putrescina - % (e) de calos em relação às diferentes idades de plântulas na embriogênese somática de *E. edulis*. <sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

### 3.2 Maturação

Os explantes após 60 dias na maturação permaneceram com crescimento assíncrono, podendo observar embriões somáticos em diferentes fases de

desenvolvimento, globulares com suspensor, embriões em transição entre estádios, e embriões escutelar e coleoptilar (Figuras 6a-e).



**Figura 6.** Maturação de embriões somáticos a partir de segmentos de caulículos de plântulas com seis meses de *E. edulis*, com ABA (5  $\mu$ M) (a), embriões somáticos globulares, em destaque o suspensor (setas) (b), embriões somáticos em transição para escutelar (c), embrião somático escutelar (seta) (d), e embrião somático coleoptilar (e). Barra: 1 mm (a), 200  $\mu$ m (b-e).

#### 4 DISCUSSÃO

Plântulas de *E. edulis* com seis meses de idade apresenta crescimento vertical, radial e normalidade adequada, portanto, sendo indicada para a extração de caulículos para indução embriogênica em PIC (200  $\mu$ M).

As alterações induzidas por cultura de tecidos incluem as moleculares e fenotípicas, devido às condições de estresse e subcultura contínua no ambiente *in vitro*. Variações epigenéticas como padrão de metilação do DNA alterado são induzidas devido aos fatores mencionados acima (GHOSH et al., 2021). No presente trabalho, verificou-se padrões de metilação de DNA mais elevados em calos não-embriogênicos (>74 a 99%), contrário aos calos embriogênicos com



menores valores de %5mC global (31%) (Figura 5). Verifica-se, portanto, que, mesmo em calos embriogênicos já com embriões somáticos há um padrão de metilação, só que em menores concentrações de 5-metilcitosina no DNA (Figura 4b).

Em um estudo com *Coffea canephora* Pierre ex Froehner, as etapas de aquisição de competência, determinação e diferenciação celular foram marcadas por aumentos nos valores médios de %5mC (38,4%), ácido abscísico (ABA) e ácido indol-3-acético (AIA), e diminuições de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e de espermidina (Spd), evidenciando que essas alterações são os gatilhos para regeneração e maturação de embriões somáticos (AMARAL-SILVA et al., 2021).

O conteúdo global de metilação no DNA varia amplamente entre espécies, órgãos e estádios de desenvolvimento. Reduções da metilação em uma massa celular ou órgão específico, chamada desmetilação, está sempre presente antes do início de qualquer programa de diferenciação, como a embriogênese somática. E o aumento da metilação do DNA, pode ocorrer durante o envelhecimento do tecido, juntamente com a perda de competência morfogênica (VALLEDOR et al., 2007).

Alguns estudos em espécies lenhosas comprovam que baixos níveis de metilação do DNA estão associados a capacidades morfogênicas e embriogênicas, exibindo um padrão de diminuição da metilação global do DNA em massas embriogênicas e embriões iniciais em comparação com células não-embriogênicas (CHAKRABARTY; YUK; PAEK, 2003; VALLEDOR et al., 2007; RODRIGUEZ-SANZ et al., 2014; CORREDOIRA et al., 2017).

A diminuição na metilação do DNA correlaciona-se com a descondensação da cromatina nos estágios iniciais da embriogênese, portanto os núcleos de células embriogênicas exibem um padrão de distribuição de %5mC compatível com um menor teor de heterocromatina x eucromatina (como observado no presente trabalho, Figuras 5b, h), enquanto, que núcleos de células não-embriogênicas apresentaram um padrão maior. Essa compactação da cromatina impede que a maquinaria de transcrição acesse o DNA, afetando assim a regulação do gene e silenciando os genes em regiões heterocromáticas (RODRIGUEZ-SANZ et al., 2014).

Portanto, a maior resposta embriogênica dos explantes oriundos de plântulas de maiores idades (seis e oito meses) em relação as menores (dois e quatro meses), pode relacionar-se ao menor teor heterocromatina x eucromatina encontrado no núcleo celular (Figuras 5b, h) de células embriogênicas com embriões somáticos com a menor %5mC (Figura 4g).

A abundância de organelas observada em células embriogênicas, principalmente mitocôndrias e retículo endoplasmático, indicam intensa síntese de RNA e alta atividade metabólica (STEIN et al., 2010). A presença de muitas mitocôndrias é associada a sistemas embriogênicos, relacionada à alta atividade metabólica devido às altas taxas respiratórias. E a presença de retículo endoplasmático com camadas concêntricas também foi observada em outros sistemas embriogênicos (ROCHA et al., 2016), indicando a alta síntese proteica e seu transporte para as outras partes da célula, como fonte de energia.

Compostos de reserva são necessários para a reorganização e diferenciação celular, a mobilização de amido ocorre em tecidos mitoticamente ativos, fornecem energia para o início das divisões celulares e a formação sucessiva de células embriogênicas e proembriões (ROCHA et al., 2016). O teor de amido diminui juntamente com a diferenciação das áreas embriogênicas, diminuindo assim, os grãos de amido nos proembriões e embriões somáticos (SILVA-CARDOSO et al., 2019).

A S-adenosil-1-metionina é convertida em ACC por 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintases (ACS) e depois convertida em etileno pela ACC oxidase (YANG; HOFFMAN, 1984). Portanto, como um precursor direto de etileno, altas concentrações de ACC endógeno está correlacionadas com alta produção de etileno. E, tanto o ACC quanto o etileno, possuem envolvimento na regulação da embriogênese *in vivo* e *in vitro* (KĘPCZYŃSKA; RUDUŚ; KĘPCZYŃSKI, 2009).

O etileno é conhecido por regular o embriogênese somática em várias espécies liliopsida e magnoliopsida, e um alto nível de ACC podem ser um pré-requisito para a diferenciação precoce durante a indução da embriogênese (HUANG et al., 2008; KĘPCZYŃSKA; RUDUŚ; KĘPCZYŃSKI, 2009). Kępczyńska, Ruduś e Kępczyński (2009) relatam que explantes de pecíolos de *Medicago sativa* mantidos em meio de indução produziram maiores quantidades de etileno do que aqueles incubados em meio de diferenciação, e foi observado

um aumento de cerca de 10 vezes na taxa de produção de etileno no crescimento de calos por 14 dias em meio de indução. Isso pode ser explicado pelo fato do *pool* interno de ACC ser suficientemente grande para a indução do calo, devido à atividade de ACC sintase ser estimulada por auxina exógena, presente no meio de cultura (HUANG et al., 2008).

Os aminoácidos representam uma importante forma de armazenamento e transporte de nitrogênio orgânico, essenciais para a síntese de proteínas e precursores de metabólitos primários e secundários (HILDEBRANDT et al., 2015). A prolina atua como um osmólito e uma chaperona química e, portanto, é acumulada pelas plantas sob várias condições de estresse (HILDEBRANDT et al., 2015). Portanto, os explantes das plântulas mais jovens (dois meses) são os que mais são influenciados pelo estresse causado pela indução embriogênica, diminuindo com o aumento da idade.

As PA também desempenham um papel modulador crucial no crescimento e desenvolvimento e na resposta a estresses bióticos e abióticos, o aumento do nível de PA na célula vegetal é considerado como parte do mecanismo de reversão do estresse (NANDY et al., 2022). As enzimas antioxidantes SOD, CAT, POD, monodesidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPX) foram todas aumentadas com o fornecimento de Spm (HASSAN et al., 2021). No estágio inicial de alta divisão celular, a Put desempenha o papel fundamental, já durante a fase de alongamento celular rápido no final do crescimento do embrião, é importante o papel sincronizado de Spm e Spd. Portanto, a Put é responsável pela geração de embriões somáticos e Spd assim como Spm promove a maturação regulando diferentes cascatas de desenvolvimento (NANDY et al., 2022; POLESI et al., 2022).

Para a espécie *E. edulis* utilizam na maturação os reguladores de crescimento ácido 1-naftalenoacético (ANA, 0,53  $\mu$ M) e 2-isopenteniladenina (2-iP, 12,3  $\mu$ M) (GUERRA; HANDRO, 1998; OLIVEIRA et al., 2022). No presente trabalho, o uso apenas do ABA (5  $\mu$ M), foi muito eficiente na maturação. O ABA aumenta o teor de poliamina endógena (Spm) (TOUMI et al., 2010), estimula o armazenamento de substâncias de reservas (GUTMANN et al., 1996) e induz o

desenvolvimento final do embrião por meio do acúmulo de proteínas LEA (Leat Embryogenesis Abundant) (DODEMAN et al., 1997). Sendo, o desenvolvimento dos embriões somáticos assíncronos na maturação é um comportamento comum durante a embriogênese somática em palmeiras do gênero *Euterpe* (GUERRA; HANDRO, 1988; 1998; LEDO et al. 2002; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016; FERREIRA et al., 2022).

## 5 CONCLUSÕES

A idade de seis meses de plântulas de *E. edulis* é a mais indicada para utilização dos segmentos de caulículos, dentre as idades estudadas, e é a mais responsiva na indução embriogênica com picloram (200 µM).

Os explantes induzidos de plântulas de menor idade (dois meses) possuem maiores concentrações de amido em suas células, quando comparado com o tecido de explantes induzidos de plântulas de maior idade (oito meses).

Segmentos de caulículo de plântulas mais jovens (dois meses) são os que mais são influenciados pelo estresse causado pela indução embriogênica, comprovado pelo maior incremento de prolina e sua diminuição com o aumento da idade. E a embriogênese com plântulas de seis meses foi a que obteve a maior concentração de ACC e o menor incremento de espermina e putrescina (33 e 173%).

Explantes com embriões somáticos possui menor metilação global de DNA comparado a calos não-embriogênicos. E o uso apenas do ABA (5 µM) mostrou-se eficiente na maturação de embriões somáticos de *E. edulis*.

## 6 REFERÊNCIAS

- AMARAL-SILVA, P. M.; CLARINDO, W. R.; GUILHEN, J. H. S.; PASSOS, A. B. R. J.; SANGIARD, N. A.; FERREIRA, A. Global 5-methylcytosine and physiological changes are triggers of indirect somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v. 258, p. 45-57, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01551-8>
- BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J.; HELLERM, M. G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 363-369, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.035>

CHAKRABARTY, D.; YUK, K. W.; PAEK, K. Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). **Plant Science**, v. 165, n. 1, p. 61-68, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00127-4)

CORREDOIRA, E.; CANO, V.; BÁRÁNY, I.; SOLÍS, M. T.; RODRÍGUEZ, H.; VIEITEZ, A. M.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. Initiation of leaf somatic embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in *Quercus alba*. **Journal of Plant Physiology**, v. 213, p. 42-54, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.02.012>

CORREDOIRA, E.; MERKLE, S. A.; MARTÍNEZ, M. T.; TORIBIO, M.; CANHOTO, J. M.; CORREIA, S. I.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Non-zygotic embryogenesis in hardwood species. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 38, n. 1, p. 29-97, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1551122>

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

FERREIRA, J. C. B.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, R. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. x, p. y-y, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02227-2>

FREITAS, E. DE O.; MONTEIRO, T. R.; NOGUEIRA, G. F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, n. 14, p. 126-135, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.044>

FORCAT, S.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J. W.; GRANT, M. R. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, v. 4, n. 1, p. 16, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-16>

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; PEREIRA, C.; ABREU, R. M. V.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BRACHT, 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.037>

GHOSH, A.; IGAMBERDIEV, A. U.; DEBNATH, S. C. Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: a review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 823-841, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06062-6>

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration

in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, n. 7, p. 550-552, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00272754>

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, n. 1, p. 65-71, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02507151>

GUTMANN, M.; VON ADERKAS, P.; LABEL, P.; LELU, M-A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 1905-1917, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/47.12.1905>

HASAN, M.; SKALICKY, M.; JAHAN, M. S.; HOSSAIN, M.; ANWAR, Z.; NIE, Z. F.; ALABDALLAH, N. M.; BRESTIC, M.; HEJNAK, V.; FANG, X. W. Spermine: Its emerging role in regulating dry stress responses in plants. **Cells**, v. 10, n. 261, p. 2-15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10020261>

HILDEBRANDT, T. M.; NESI, A. N.; ARAÚJO, W. L.; BRAUN, H. P. Amino acid catabolism in plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563-1579, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>

HUANG, X. L.; LI, X. J.; LI, Y.; HUANG, L. Z. The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. **Physiologia Plantarum**, v. 113, n. 3, p. 424-429, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130317.x>

IKEUCHI, M.; OGAWA, Y.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, v. 143, p. 1442-1451, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.134668>

ISAH, T. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 118, p. 1-22, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2134-6>

KĘPCZYŃSKA, E.; RUDUŚ, I.; KĘPCZYŃSKI, J. Endogenous ethylene in indirect somatic embryogenesis of *Medicago sativa* L.. **Plant Growth Regulation**, v. 59, n. 1, p. 63-73, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9388-6>

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; OLIVEIRA, M. S. P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000300004>

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

NANDY, S.; DAS, T.; TUDU, C. K.; MISHRA, T.; GHORAI, M.; GADEKAR, V. S.; ANAND, U.; KUMAR, M.; BEHL, T.; SHAIKH, N. K.; JHA, N. K.; SHEKHAWAT, M. S.; PANDEY, D. K.; DWIVEDI, P. R.; DEY, A. Unravelling the multi-faceted regulatory role of polyamines in plant biotechnology, transgenics

and secondary metabolomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 905-929, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11748-3>

OLIVEIRA, L. B.; MELLO, T.; ARAUJO, C. P.; OLIVEIRA, J. P. B.; FERREIRA, A.; ZANARDO, E. C.; VIEIRA, L. M.; OTONI, W. C.; ALEXANDRE, R. S.; CARVALHO, V. S. Morphoanatomical aspects of auxinic herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius - a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. , p. xx-yy, 2022. DOI: <https://doi.org/>

POLESI, L. G.; FRAGA, H. P. F.; GOETEN, D.; BACK, F. P.; OLIVEIRA, E. M.; STEINER, N.; GUERRA, M. P. Morphohistological and biochemical features of the *Guadua chacoensis* (Bambusoideae; Poaceae) somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, n. 3, p. 479-499, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02199-9>

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty, 1981, 45p.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ROCHA, D. I.; PINTO, D. L. P.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A. O.; DORNELAS, M. C.; OTONI, W. C. Cellular and molecular changes associated with competence acquisition during passion fruit somatic embryogenesis: ultrastructural characterization and analysis of SERK gene expression. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 595-609, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0837-y>

RODRIGUEZ-SANZ, H.; MANZANERA, J. A.; SOLIS, M. T.; GOMEZ-GARAY, A.; PINTOS, B.; RISUENO, M. C.; TESTILLANO, P. S. Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 224, p. 1-18, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0224-4>

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO, J. R.; LUIS, Z. G.; FREITAS, E. O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 3, p. 501-508, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0115-z>

SCHULZ, M.; BORGES, G. D. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.027>

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppl.13026>

STEIN, V.C.; PAIVA, R.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P.; ALVES, E.; NOGUEIRA, G. F. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. **Revista Árvore**, v. 34, n. 5, p. 789-796, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622010000500004>

TOUMI, I.; MOSCHOU, P. N.; PASCHALIDIS, K. A.; BOUAMAMA, B.; SALEM-FNAYOU, A. B.; GHORBEL, A. W.; MLIKI, A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 519-525, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.10.022>

VALLEDOR, L.; HASBÚN, R.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, J. L.; SANTAMARÍA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M. F.; CAÑAL, M. J.; RODRÍGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, p. 75-86, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9262-z>

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 155-189, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103>



## CONCLUSÕES GERAIS

O tempo necessário para que ocorra a maturação das sementes de *E. edulis* pode depender da região e das condições ambientais de cada ano, podendo variar de 228-290 dias após a antese (DAA). E a qualidade dos frutos também pode variar em cada região, genótipos avaliados em Pedra Menina foram consideravelmente superiores aos de Lagoa Seca para parâmetros relevantes ao consumo dos frutos, sendo possível a partir destes alcançar o consumo desejável de antioxidantes.

As sementes de *E. edulis* possuem reservas suficientes para permitir o desenvolvimento do embrião aos 148 DAA com 100% de plântulas normais *in vitro*, quando a maturação total ocorre com 228 DAA. As concentrações de lipídios e fibras têm alta correlação positiva com as variáveis morfofisiológicas ao longo da maturação das sementes, enquanto os fenóis, carboidratos, proteínas e amido possuem alta correlação negativa.

Quando a maturação das sementes ocorre com 262-290 DAA, a máxima germinação, vigor e formação de plântulas normais ocorre aos 164 DAA, gerando um ganho de 98-126 dias em relação ao uso de sementes no último estágio de maturação. Portanto, recomenda-se nesta data, a colheita das sementes e imediata semeadura *in vitro*.

As análises de lignina, carboidratos, DRX e RMN indicam que nos primeiros estádios de maturação, o endosperma das sementes de *E. edulis* é composto por lignina, glicanos, galactanos e mananas que formam uma estrutura com baixo ordenamento estrutural. Com a evolução da maturação das sementes, observou-se redução nos teores de lignina, glicanos e galactanos, e aumento no teor de mananas, o que permitiu a formação da estrutura cristalina da manana I.

A atividade das enzimas CAT e APX, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidação lipídica tiveram maiores atividades a partir de 269 DAA em sementes que levaram 290 DAA para finalizar a maturação, devido a esse processo promover o aumento de espécies reativas de oxigênio. A produção de antocianinas pelas sementes de *E. edulis* chega ao máximo no último estágio de maturação. E concentrações de silício e potássio aumentam no mesocarpo e endocarpo de frutos de *E. edulis* com o avanço da maturação.

Na embriogênese somática de *E. edulis*, não se recomenda o uso do 2,4-D. E sim, picloram (150  $\mu\text{M}$ ) e, principalmente, seu análogo triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ), quando utilizado como explantes embriões zigóticos. Os embriões somáticos em pré-maturação (meio basal), provenientes de calos induzidos com triclopyr (100  $\mu\text{M}$ ), multiplicaram cinco vezes mais. E sua maturação e germinação foi máxima em meio MS com ABA (5  $\mu\text{M}$ ).

A validação metodológica da microscopia de força atômica é inédita e eficiente para a identificação de calos embriogênicos e não-embriogênicos na espécie modelo *E. edulis*.

Quando o explante utilizado na indução embriogênica é segmentos de caulículo de plântulas de *E. edulis*, a polaridade do explante não influenciou à sua indução embriogênica. Caulículos com ferimentos longitudinais, posicionados para cima no meio de cultura proporcionou as maiores taxas de indução embriogênica. E a idade de seis meses de plântulas é a mais indicada para a utilização dos segmentos de caulículos, dentre as idades estudadas, e é a mais responsiva na indução embriogênica com picloram (200  $\mu\text{M}$ ).

Segmentos de caulículo de plântulas mais jovens (dois meses) são os que mais são influenciados pelo estresse causado pela indução embriogênica, comprovado pelo maior incremento de prolina e sua diminuição com o aumento da idade. E a embriogênese com plântulas de seis meses foi a que obteve a maior concentração de ACC e o menor incremento de espermina e putrescina (33 e 173%). Além disso, explantes induzidos de plântulas de menor idade (dois meses) possuem maiores concentrações de amido em suas células, quando comparado com o tecido de explantes induzidos de plântulas de maior idade (oito meses).

Na maturação de embriões somáticos oriundos de segmentos de caulículo de plântulas de *E. edulis*, é recomendando o uso de meio de cultura MS suplementando com ABA (5  $\mu\text{M}$ ), e a retirada dos explantes do meio após 30 dias.

Na cultura de suspensão, calos friáveis apresentaram maior crescimento em meio MS+picloram (15  $\mu\text{M}$ ). Na maturação 1  $\mu\text{M}$  de ABA proporcionou a maior taxa de crescimento.