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

**MÁRCIA CRISTINA PAULUCIO**

# GERMINAÇÃO *EX VITRO* E POTENCIAL ORGANOGÊNICO E EMBRIOGÊNICO *IN VITRO* DE *Lecythis pisonis* CAMBESS.

JERÔNIMO MONTEIRO – ES
2016

**MÁRCIA CRISTINA PAULUCIO**

# GERMINAÇÃO *EX VITRO* E POTENCIAL ORGANOGÊNICO E EMBRIOGÊNICO *IN VITRO* DE *Lecythis pisonis* CAMBESS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.
Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Elzimar de Oliveira Gonçalves
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

JERÔNIMO MONTEIRO – ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Paulucio, Márcia Cristina, 1991-
P333g Germinação ex vitro e potencial organogênico e embriogênico in vitro de Lecythis pisonis cambes / Márcia Cristina Paulucio. – 2016.
72 f. : il.

Orientador: Elzimar de Oliveira Gonçalves.
Coorientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Sapucaia. 2. Propagação. 3. Cultivo in vitro. 4. Germinação. 5. Embriogênese. 6. Rizogênese. I. Gonçalves, Elzimar de Oliveira. II. Alexandre, Rodrigo Sobreira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 630

**GERMINAÇÃO *EX VITRO* E POTENCIAL ORGANOGÊNICO E EMBRIOGÊNICO *IN VITRO* DE *Lecythis pisonis* CAMBESS**

**Márcia Cristina Paulucio**

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

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2016.

**Drª. Liana Hilda Golin Mengarda**
UFES
Examinadora Externa

**Prof. Dr. José Carlos Lopes**
UFES
Examinador Interno

**Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre**
UFES
Coorientador

**Profª. Drª. Elzimar de Oliveira Gonçalves**
UFES
Orientadora

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Luiz e Rozelice!

Aos meus irmãos e sobrinhos!

Aos meus avos!

Ao meu namorado!

## AGRADECIMENTOS

Chegar até o momento de conclusão deste trabalho não foi fácil, mas foi um caminho percorrido com muito aprendizado, com algumas dificuldades e muita superação! Por isso, quero agradecer a todos que me ajudaram e estiveram ao meu lado neste momento!

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por todas as benções e realizações!

Aos meus amados pais, João Luiz e Rozelice, por toda ajuda, dedicação, oportunidade e amor.

Aos meus irmãos, Isabel, Leticia Saulo e Eliana, pelos conselhos carinhos.

Aos meus sobrinhos amados, Gabriel e Isabela por me proporcionarem momentos tão felizes ao lado de cada um.

Ao meu namorado, pelo amor, companherismo e carinho, por estar sempre me incentivando a não desistir! Obrigada por estar ao meu lado e pela paciência nos momentos de desespero e estresse.

À minha vovó e ao meu vovô que sempre estiveram orando por mim! A todos os meus familiares que torceram sempre para a minha vitória!

As minhas grandes amigas de Alegre: Luara, Iasmini, Jaqueline, Mayla e Renata, obrigada por fazerem parte da minha vida e me apoiarem em todos os momentos.

Às minhas amigas de república: Andressa, Cristiani, Sandy e Tamires. Os dias com vocês em Jerônimo Monteiro foram mais divertidos. Obrigada pelas risadas, pela companhia e principalmente por toda a amizade que levarei para sempre.

A minha amiga-irmã Cristiani, por estar presente em todos os momentos que eu preciso. Obrigada pela sua amizade sincera e pelo apoio.

As “Julianas”, amigas de jeromim, obrigada por fazerem os meus dias mais alegres e divertidos durante o estudo.

Aos meus amigos de laboratório e a toda equipe do NUPEMASE e do LAS, obrigada pelo companheirismo e paciência, me auxiliando sempre.

À minha orientadora Elzimar, por todos os ensinamentos, apoio, paciência e por confiar em mim!

Ao meu coorientador Rodrigo, por todos os ensinamentos, pelas ideias compartilhadas e apoio para coloca-las em prática e pelas ajudas na montagem dos experimentos.

A comissão examinadora: Prof. Dr. José Carlos, obrigada por ter me acolhido de braços abertos no Laboratório de Análise de sementes e por todos os seus conhecimentos, que contribuíram para a minha formação acadêmica. A Liana, pelas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela paciência, apoio e ensinamentos compartilhados.

Ao meu professor Miele Tallon Matheus (*In memoriam*) pelos conselhos, amizade e ensinamentos que levarei por toda a vida. Obrigada por ter sido um grande exemplo de pessoa e profissional na minha vida.

Aos professores e pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais da UFES, pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins da UFES, em nome do técnico Jairo, pela realização da caracterização ultraestrutural.

Ao Prof. Wagner Campos Ottoni da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio com a disponibilização de reagentes, sempre que solicitado.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, seja com algum ensinamento acadêmico ou de vida!

Muito obrigada!

# RESUMO

PAULUCIO, Márcia Cristina. **Germinação *ex vitro* e potencial organogênico e embriogênico *in vitro* de *Lecythis pisonis* cambess**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.

A espécie *Lecythis pisonis* cambess pertencente à família Lecythidaceae, possui potencial ornamental, frutífera, madeireira, podendo ser utilizada no reflorestamento, além de produzir saborosas castanhas ricas em proteínas e minerais. Os estudos das técnicas de propagação sexuada e assexuada de espécies florestais assumem um papel relevante nas pesquisas científicas, objetivando a preservação e a utilização dessas espécies com interesses diversificados. Objetivou-se com este trabalho, avaliar a germinação *ex vitro* das sementes submetidas a diferentes métodos de superação de dormência e avaliar o estabelecimento *in vitro* e o potencial organogênico e embriogênico da espécie *L. pisonis*. Inicialmente para o estudo da germinação *ex vitro,* foram avaliados o comprimento, largura e espessura das sementes. Em seguida as sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos pré-germinativos: sementes intactas (testemunha); escarificação mecânica; escarificação química com ácido sulfúrico (98%) por 30, 60 e 90 minutos e total remoção do tegumento. Foram avaliados, a porcentagem de emergência (E%); índice de velocidade de emergência (IVE) e frequência relativa da emergência (Fr). As sementes intactas e imersas ao $H_2SO_4$ por 30, 60 e 90 minutos foram radiografadas pelo equipamento de raios X (X QDP-01X) e foi analisado o desgaste químico provocado pelo $H_2SO_4$ no tegumento da semente e se este tratamento causou algum dano a semente. Ao final do experimento foi realizada a caracterização morfológica das plântulas e calculado a porcentagem de poliembrionia das sementes escarificadas mecanicamente. Observou-se que as sementes de *L. pisonis* apresentam dormência tegumentar e o tratamento mais eficiente para superar esta dormência foi a escarificação mecânica, com maior porcentagem de emergência e maior vigor das plântulas formadas. O teste de raios x mostrou que a escarificação química não causou danos ao endosperma e ao

embrião da semente, além disso, o desgate químico do tegumento foi proporcional ao tempo de imersão das sementes no ácido sulfúrico. As sementes de *L. pisonis* apresentaram 25% de poliembrionia. Ainda avaliou-se o estabelecimento *in vitro* e o potêncial organogênico e embriogênico da espécie em estudo. Os explantes utilizados para o estabelecimento *in vitro* foram sementes sem tegumento de *L. pisonis,* no qual foram inoculados no meio WPM sem regulador de crescimento e mantidos em sala de crescimento por 150 dias. Neste experimento foram observadas diferentes respostas morfogênicas: esverdeamento (63%), calogênese (84%), germinação (8%), rizogênese direta (4%) e organogênese indireta (2%). Para a indução da embriogênese somática foram utilizados os segmentos de sapucaia, inoculados em meio MS, com a adição dos reguladores de crescimento em diferentes concentrações (0; 1,5 e 3,0 mg $L^{-1}$ de 2,4-D) e citocinina (0, 0,5 e 1,0 m $L^{-1}$ de KI). Observou-se que as concentrações utilizadas não foram eficientes para a indução de embriões somáticos. Na indução do enraizamento *in vitro* de segmentos caulinares de plântulas germinadas *in vitro* foram testadas diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg $L^{-1}$). Observou-se a formação de raízes em todas as concentrações utilizadas, exceto na ausência da auxina.

**Palavras-chaves:** sapucaia, propagação, cultivo *in vitro,* germinação, embriogênese, rizogênese.

**ABSTRACT**

PAULUCIO, Márcia Cristina. **Germination *in vitro* and potential organogenic and embryogenic *in vitro Lecythis pisonis* cambess**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Elzimar de Oliveira Gonçalves. Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.

The species *Lecythis pisonis* cambess belonging to Lecythidaceae, has ornamental, fruit, timber potential and can be used in reforestation, as well as producing tasty nuts rich in protein and minerals. Studies of propagation techniques sexual and asexual forest species play an important role in scientific research, aiming at the preservation and use of these species with diversified interests. The objective of this study was to evaluate the *ex vitro* germination of seeds subjected to different methods of scarification and evaluate the in vitro establishment and organogenic potential and embryogenic the species *L. pisonis.* Initially for *ex vitro* germination of the study evaluated the length, width and thickness of seeds. Then the seeds were submitted to the following pre-germination treatments: intact seeds (control); mechanical scarification; chemical scarification with sulfuric acid (98%) for 30, 60 and 90 minutes and complete removal of the seed coat. Were evaluated, the emergence percentage (E%); emergence speed index (EVI) and relative frequency of emergency (Fr). The intact seeds and immersed to $H_2SO_4$ for 30, 60 and 90 minutes were radiographed by X-ray equipment (X QDP-01X) and analyzed the chemical wear caused by $H_2SO_4$ in the seed coat and this treatment caused some damage to the seed. At the end of the experiment was carried out the morphological characterization of seedlings and calculated the percentage of polyembryony seeds scarified mechanically. It was observed that *L. pisonis* seeds have integumentary dormancy and the most effective treatment to overcome this dormancy was mechanical scarification, with a higher percentage of emergence and vigor of seedlings formed. The x-ray pattern showed that the chemical scarification caused no damage to the seed endosperm and embryo, furthermore, the chemical desgate the integument was proportional to the time of immersion of seeds in sulfuric acid. The seeds of *L. pisonis* presented 25% polyembryony. Also evaluated the in vitro establishment and the organogenic and embryogenic potential of the species under

study. The explants used to establish *in vitro* were no seed tegument *L. pisonis*, which were inoculated in WPM medium without growth regulators and maintained in growth room for 150 days. In this experiment were observed different morphogenic responses: Greening (63%), callus formation (84%), germination (8%), direct rizogenesis (4%) and indirect organogenesis (2%). For the induction of somatic embryogenesis were used segments sapucaia inoculated onto MS medium with the addition of growth regulators at different concentrations (0; 1,5, and 3,0 mg $L^{-1}$ 2,4-D), and cytokinin (0, 0,5 and 1,0 m $L^{-1}$ KI). It was observed that these concentrations were not efficient for induction of somatic embryos. *In vitro* rooting induction of stem segments seedlings germinated in vitro were tested different concentrations of IBA (0,0;1,0; 2,0 and 3,0 mg $L^{-1}$). We observed the formation of roots at all concentrat used except in the absence of auxin.

**Keywords:** sapucaia, propagation, vitro culture, germination, embryogenic, rizogenesis .

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO GERAL ..... 12**
**2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 15**
**CAPÍTULO I ..... 18**
**RESUMO ..... 19**
**ABSTRACT ..... 20**
**1 INTRODUÇÃO ..... 21**
**2 MATERIAL E MÉTODOS ..... 23**
2.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO ..... 23
2.2 COLETA E BENEFICIAMENTO DO MATERIAL ..... 23
2.3 CARACTERISTICAS FÍSICA DE SEMENTES ..... 23
2.4 TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS DE SEMENTES DE *L. pisonis.* ..... 24
2.5 RAIO X ..... 26
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 27
**3 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 28**
3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS SEMENTES DE *Lecythis pisonis* ..... 28
3.2 TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS EM SEMENTES DE *L. pisonis.* ..... 30
3.3 TESTE DE RAIO X ..... 36
3.4 POLIEMBRIONIA ..... 38
**Fonte: o autor ..... 39**
**4 CONCLUSÕES ..... 40**
**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 41**
**CAPÍTULO II ..... 46**
**RESUMO ..... 47**
**Potential organogenic and embryogenic *in vitro Lecythis pisonis* cambess ..... 48**
**ABSTRACT ..... 48**
**1 INTRODUÇÃO ..... 49**
**2 MATERIAL E MÉTODOS ..... 50**
2.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL ..... 50
2.2. ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Lecythis pisonis* ..... 50
2.2.1 Desinfestação e meio de estabelecimento das sementes ..... 50
2.3. INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE SEMENTES DE *Lecythis pisonis.* ..... 51
2.3.1 Meio de cultura e indução da embriogênese somática ..... 51
2.3.2 Registro fotográfico e caracterização ultraestrutural ..... 52

2.4 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DA ESPÉCIE *Lecythis pisonis*.. 53
2.4.1 Meio de cultura e indução da rizogênese ..... 53
**3 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 55**
3.1. ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Lecythis pisonis.* ..... 55
3.2. INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SEMENTES DE *Lecythis pisonis*..... 59
3.2 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES CAULINARES DE *L. pisonis* ..... 63
**4 CONCLUSÕES..... 66**
**5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁGICAS ..... 67**
**CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 72**

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Lecythis pisonis* cambess (Lecythidaceae), conhecida populamente como sapucaia, apresenta grande potencial ornamental, frutífera, madeireira e indicada para reflorestamento por ser uma espécie clímax e por atrair a fauna local (RIBEIRO, 2010). É nativa da Mata Atlântica e produz sementes que constituem numa castanha comestível rica em proteínas (DENADAI et al., 2010), tal como a castanha-do-brasil e a castanha-de-caju.

A espécie tem ocorrência nos estados do Ceará até o Rio de Janeiro, com predominância no Sul da Bahia e Norte do Espírito Santo (LORENZI, 2008). No entanto, apresenta baixa frequência natural na floresta, devido à pequena produção de sementes e a intensa perseguição dos macacos que consomem avidamente suas castanhas. Além disso, segundo Wickens (1991), está espécie floresce esporadicamente, com alguns indivíduos anualmente, enquanto outros a cada intervalo de cinco anos.

As árvores da sapucaia quando adultas podem atingir altura média de 20 a 30 metros e tronco de 50-90 cm de diâmetro, revestido por uma casca espessa (LORENZI, 2008). Seus frutos são grandes e pesam em média 1 a 2,5 Kg (SAMPAIO, 2000). O porte das árvores e seu frutos indeiscentes (MORI, 2008) dificultam a coleta de sementes. Além disso, uma vez no chão, as sementes são apreciadas e consumidas por morcegos e macacos (FERRÃO, 2001).

Uma das maiores dificuldades na propagação de mudas da sapucaia é o processo germinativo lento e desuniforme, como observado em outras espécies da mesma família como, *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanha-do-brasil) e *Couratari stellata* A.C.Sm. (CRUZ; CARVALHO, 2003).

A reduzida taxa de germinação de *L. pisonis* pode ser decorrente da presença de dormência tegumentar ou fisiológica. A dormência tegumentar é caracterizada pela presença de tegumentos impermeáveis à agua e/ou oxigênio. A dureza dos tecidos de revestimento, frequentemente causam consideráveis problemas ao processo germinativo, em razão da restrição de água e do oxigênio e da resistência física à retomada do embrião (TAIZ; ZEIGER, 2013). Enquanto na dormência fisiológica os embriões são imaturos ou apresentam substâncias inibidoras de germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

Diante disso, é necessário o estudo de métodos pré-germinativos para potencializar e uniformizar a germinação das sementes. A eficiência desses métodos foi constatada por diversos autores para algumas espécies florestais, dentre elas: *Dimorphandra wilsonii* Rizzini (LOPES; MATHEUS, 2008), *Annona cherimola* Mill. (OLIVEIRA et al., 2010), *Ormosia arborea* (Vell.) Harms (BASQUEIRA et al., 2011), *Senna macranthera* (Collad.) H.S. Irwin & Barneby (LOPES; BARBOSA; CAPUCHO, 2012), *Joannesia princeps* Vell. (BELTRAME et al., 2014) e *Dimorphandra wilsonii* (MATHEUS et al., 2015).

A dificuldade de produção de mudas da espécie também pode ser contornada pela propagação assexuda. A cultura de tecidos é bastante útil no processo de propagação**,** produzindo plantas sadias e vigorosas em grande escala comercial. Além disso, a propagação *in vitro*, permite a produção de material vegetal em condições assépticas, para espécies que apresentam dificuldade de germinação (PINHAL et al., 2011; PELEGRINI et al., 2013).

Com o avanço das pesquisas em biotecnologia, as técnicas de propagação *in vitro,* como a germinação *in vitro*, organogênese e embriogênese somática, apresentam-se cada vez mais promissoras.

A embriogênese somática é um processo onde células somáticas, sob condições específicas de indução, geram células embriogênicas que, através de uma série de modificações estruturais e bioquímicas, resultam na formação do embrião somático (TAUTORUS et al., 1991; QUIROZ-FIGUEROA, 2006). Os embriões somáticos *in vitro* podem ser formados a partir de embriogênese direta ou indireta. Na embriogênese somática direta, os embriões somáticos originam-se diretamente do tecido do explante e a indireta, os embriões somáticos são originados a partir de um tecido intermediário, denominado calo.

Este método possibilita a produção de grande quantidade de árvores uniformes num curto espaço de tempo (PAIVA-NETO et al., 2003). No entanto, a baixa taxa de indução de embriões somáticos e a baixa taxa de conversão destes em plantas completas são as principais limitações dos sistemas de embriogênese somática desenvolvidos para várias espécies lenhosas. Esta limitação tem sido observada para algumas espécies arbóreas, como a *Swietenia macrophylla* (MARUYAMA e ISHII, 1999), *O. odorifera* (SANTA-CATARINA et al., 2001), *O. catharinensis* (VIANA et al., 2005) e *Eucalyptus grandis* (TITON, 2007).

Já a organogênese refere-se à diferenciação e formação de órgãos (raízes, parte aérea, brotações, flores) a partir de explantes cultivados *in vitro*, sendo um processo controlado por substâncias hormonais (GUERRA et al., 2006).

A multiplicação e o enraizamento de plantas cultivadas *in vitro,* são influenciados por diversos fatores, como: teor de ágar, concentração de nutrientes e sacarose no meio, o ambiente de crescimento que inclui o fotoperíodo, a qualidade da luz e a temperatura, e principalemente pelos reguladores de crescimento (CID, 2010; PINHAL et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Segundo George, Hall e Klerk (2008), as auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas e o balanço destes reguladores irá conduzir o desenvolvimento do explante. De maneira geral, as citocininas estão relacionadas com a indução de formação de brotos e as auxinas com a indução da rizogênese (EDWIN et al., 2008; SAINI et al., 2013). Um sistema radicular bem desenvolvido, assim como uma boa relação raiz/broto, é de suma importância para a sobrevivência das plantas, principalmente, para a aclimatização e transplantio para o campo (KLERK, 2002).

Neste contexto, justifica-se o estudo destas técnicas a fim de maximizar a taxa de germinação e obter plântulas uniformes e com garantias fitossanitárias, em menor tempo em grandes quantidades para a produção de mudas. Além disso, são necessários estudos que colaborem para análise e manejo de sementes de sapucaia.

Diante disso, objetivou-se com este trabalho: avaliar as caracterististicas físicas das sementes e a germinação *ex vitro* das sementes submetidas a diferentes métodos de superação de dormência e avaliar o estabelecimento *in vitro* e o potencial organogênico e embriogênico de explantes da espécie *L. pisonis.*

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


BASQUEIRA, R. A.; PESSA, H.; SOUZA-LEAL, T.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Superação de dormência em *Ormosia arbórea* (Fabaceae: Papilionoideae) pela utilização de dois métodos de escarificação mecânica em diferentes pontos do tegumento. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringa, v. 4, n. 3, p. 547-561, 2011.

BELTRAME, R. A.; LOPES, J. C. MENGARDA, L. H. G.; MANHONE, P. R.; FREITAS, A. R. Tratamentos pré-germinativos e sombreamentos na produção de mudas de cutieira. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 193-205, 2014.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds:** physiology of development and germination. 2 ed. New York: PlenumPublishing, 1994. 445p.

CAMARGO, I. P. **Estudos sobre a propagação da castanheira-do-brasil** (***Bertholletia excelsa*** **Humb. &Bompl**.). 1997. 126p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes:** ciência, tecnologia e produção. 5. ed., Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: EMBRAPA, Embrapa Formação Tecnológica, 2010. 303p.

CRUZ, E. D.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e germinação de sementes de *Couratarisstellata* A. C. Smith (LECYTHIDACEAE). **Acta Amazônia,** Manaus, v. 3, p. 381-388, 2003.

DAVIDE, A. C.; PINTO, L. V. A.; MONNERAT, P. F.; BOTELHO, S. A. O que fazer para conservar as nascentes nas propriedades rurais. In: **Nascentes**: o verdadeiro tesouro da propriedade rural. Lavras – MG, Editora UFLA, 2002, p 5-19, 2002.

DENADAI, S. M. S. et al. *In vitro* digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.

EDWIN, S. et al. Wound healing and antioxidant activity of *Achyranthes aspera*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 46, n. 12, p. 824-828, 2008.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical**: espécies com frutos comestíveis. v. 2 Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. 580 p.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística,** UFOP, v. 1, p. 1-9, 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed. The Background: Springer, 2008. v. 1, 709 p.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; STEINMACHER, D. A. **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2006. 41 p.

KLERK, G. J. de. Rooting of microcuttings: theory and practice. ***In Vitro* Cellular e Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 38, n. 5, p. 415-422, 2002.

LOPES, J. C.; MATHEUS, M. T. Caracterização morfológica de sementes, plântulas e da germinação de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. – faveiro-de-Wilson (Fabaceae caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes***,* Londrina, v. 30, n. 1, p. 96-101, 2008.

LOPES, J. C.; BARBOSA, L. G.; CAPUCHO, M. T. Biometria, dormência e viabilidade de sementes de Sena macranthera. **Revista Nucleus**, Ituverava, v.19, n. 2, p. 247- 256, 2012.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, v.1. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. FEALQ: Piracicaba, 2005. 495 p.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. Somatic embryogenesis in Big-leaf Mahogany (*Swietenia macrophylla* King.) *In*: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (Ed.). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 5, p. 45-62.

MATHEUS, M. T.; FREITAS, A. R.; LOPES, J. C.; ALEXANDRE, R. S. Vigor test in *Dimorphandra wilsonii* seeds depending on soaking and electrical conductivity. **Científica** (Jaboticabal. Online), v. 43, p. 396, 2015.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 109-120, 2004.

OLIVEIRA, M. C. et al. Germinação de sementes de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) cv.'Gefner' submetidas a tratamentos com ácido giberélico ($GA_3$) e ethephon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 544-554, 2010.

PAIVA NETO, et al. Somatic embryogenesis from imature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 629-634, 2003.

PELEGRINI, L. L. et al. Germinação *in vitro* de eixos embrionários zigóticos de imbuia (*Ocotea porosa* (NEES EX MARTIUS) Liberato Barroso. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos de tecidos em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

QUIROZ-FIGUEROA, et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, v. 86, p. 285– 301, 2006.

RIBEIRO, G. D. **Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010. 179p.

SAMPAIO, P. de T. B. Castanha-sapucaia (*Lecythis pisonis*). In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENT, C. R. **Biodiversidade amazônica:** exemplos e estratégias de utilização. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e tecnológico, 2000. p. 141-147.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, C. S.; PEDROTTI, E. L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 501-510, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 5 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013. 820 p.

TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

TITON, M. et al. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 31, p. 417-426, 2007.

VIANA, A. M., et al. Protocol of somatic embryogenesis: *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae). In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (Ed.). **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, Dordrecht: Springer, 2005. p. 427-443.

WICKENS, G. E. Management issues for developmentofnon-timber forest products. In: **Unasylva,** v. 42, n. 165, p. 3-8, 1991.

# CAPÍTULO I

## SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA EM SEMENTES DE *Lecythis pisonis* CAMBESS.

**Superação da dormência em sementes de *Lecythis pisonis* cambess.**

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo, avaliar as características físicas das sementes e a germinação da espécie *Lecythis pisonis* submetidos a diferentes métodos de superação de dormência. As sementes foram coletadas de matrizes no município de Linhares - ES. Primeiramente foram avaliados o comprimento, largura, espessura e umidade inicial das sementes. Em seguida as sementes foram submetidas a diferentes métodos pré-germinativos: sementes intactas (testemunha); escarificação mecânica, com auxílio de lixadeira nº 80; escarificação química com imersão das sementes no ácido sulfúrico (98%) por 30, 60 e 90 minutos e remoção total do tegumento, com auxílio de uma pinça e bisturi. Foram avaliados a porcentagem de emergência (E%); índice de velocidade de emergência (IVE) e frequência relativa da emergência (Fr). As sementes intactas e imersas ao $H_2SO_4$ por 30, 60 e 90 minutos foram radiografadas pelo equipamento de raios X (X QDP-01X) e foi verificado o desgaste químico provocado pelo $H_2SO_4$ no tegumento da semente e se o tratamento químico causou algum dano a semente. Ao final do experimento foi realizada a caracterização morfológica das plântulas: diâmetro do coleto (DC); comprimento da parte aérea (CPA), massa seca das folhas (MSF), do caule (MSC) e da raiz (MSR), massa seca total (MST), número de folhas (NF) e área foliar (AF) e calculado a porcentagem de poliembrionia das sementes escarificadas mecanicamente. As sementes de *L. pisonis* possuem, em média 38,95 mm de comprimento; 23,19 mm de largura e 18,33 mm de espessura. As mesmas apresentam dormência física imposta pelo tegumento e o método mais eficiente para superar a dormência tegumentar foi a escarificação mecânica, que promove um aumento de 60% na emergência e maior vigor da plântulas. A porcentagem de poliembrionia das sementes de *L. pisonis* é 25% .

**Palavras-chaves:** sapucaia, tegumento, emergência, vigor, poliembrionia.

**Overcoming seed dormancy in *Lecythis pisonis* cambess.**

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physical characteristics of seeds and germination of Lecythis pisonis seeds subjected to different methods of scarification. Seeds were collected from headquarters in Linhares - ES. First they assessed the length, width, thickness and initial moisture content of the seeds. Then the seeds were submitted to different pre-germination methods: intact seeds (control); mechanical scarification with aid sander nº 80; chemical scarification soaking of seeds in sulfuric acid (98%) for 30, 60 and 90 minutes and complete removal of the seed coat, with the aid of forceps and scalpel. They evaluated the emergency percentage (E%); emergence speed index (EVI) and relative frequency of emergency (Fr). The intact seeds and immersed to H2SO4 for 30, 60 and 90 minutes were radiographed by X-ray equipment (X QDP-01X) and was verified chemical wear caused by H2SO4 in the seed coat and chemical treatment caused some damage to seed. At the end of the experiment was carried out the morphological characterization of the seedlings: stem diameter (DC); shoot length (CPA), dry weight of leaves (MSF), the stem (MSC) and root (MSR), total dry matter (MST), number of leaves (NF) and leaf area (AF) and calculated polyembryony percentage of seeds scarified mechanically. The *L. pisonis* seeds have an average length of 38,95 mm; 23,19 mm width and 18,33 mm in thickness. They present physical dormancy imposed by the tegument and the most efficient method to overcome the tegumentar dormancy was mechanical scarification, which promotes an increase of 60% in the emergence and vigor of seedlings. The percentage of polyembryony of *L. pisonis* seeds is 25%.

**Keywords**: sapucaia, tegument, vigor, emergency, polyembryony.

# 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Lecythis pisonis* cambess (Lecythidaceae), conhecida popularmente como sapucaia, é uma árvore nativa da Floresta Atlântica, com ocorrência nos estados do Ceará até o Rio de Janeiro, e predominância no Sul da Bahia e Norte do Espírito Santo (LORENZI, 2008). É uma espécie com potencial ornamental, frutífera, madeireira e indicada para reflorestamento, por ser uma espécie clímax e atrair a fauna local (RIBEIRO, 2010). Além disso, suas sementes se constituem em uma castanha comestível, rica em proteínas e minerais (DENADAI et al., 2007).

A produção de mudas desta espécie via propagação seminal é dificultada pelo fato da mesma apresentar baixa frequência nas matas e pelas dificuldades na coleta de sementes, devido ao grande porte das árvores e pelo fato das mesmas serem consumidas por morcegos e macacos (FERRÃO et al., 2001). Somado a isto, a presença do tegumento duro em suas sementes também pode ocasionar problemas para a produção de mudas, em razão da restrição à permeabilidade à água e ao oxigênio, retardando o processo germinativo (SILVA et al., 2011; TAIZ; ZEIGER, 2013). No entanto, a presença do tegumento espesso, também pode ser considerada uma forma de proteger as suas sementes, principalmente por reduzir as flutuações de temperatura, umidade e ataque de micro-organismos (MOHAMED-YASSEEN et al., 1994), o que é muito importante para espécies que, assim como a sapucaia, apresentam características fenológicas e de ocorrência que restringe a produção de sementes e, por consequência o sucesso de sua propagação natural.

Nas espécies florestais, a dormência de sementes é comum. Em condições naturais a dormência tem grande valor por ser um mecanismo de sobrevivência da espécie, possibilitando que a germinação ocorra apenas quando as condições para o estabelecimento das plântulas sejam adequadas (FINCH-SAVAGE; LEUBNER - METZGER, 2006). Porém, passa a ser um problema quando as sementes são utilizadas para a produção de mudas, em razão da desuniformidade de germinação e perdas das sementes por deterioração (RODRIGUES et al., 2008; AL-MENAIE et al., 2010).

Deste modo, para otimizar o processo de germinação das sementes são utilizados métodos pré-germinativos, como a escarificação química, escarificação

mecânica, estratificação e o choque térmico. No entanto, a aplicabilidade e a eficiência desses tratamentos dependem do tipo e grau de dormência, que varia entre as espécies florestais (SILVEIRA, 2013).

Estudos realizados com as espécies, *Hymenaea courbaril* (ANDRADE et al., 2010), *Parkia discolor* (PEREIRA; FERREIRA, 2010), *Dypterix lacunifera* (CAVALCANTE et al., 2011), *Sesbania virgata* (SILVA et al., 2011), *Dimorphandra wilsonii* (MATHEUS et al., 2015) e *Mimosa calodendron (*DAYRELL et al., 2015) comprovam que o tratamento de escarificação mecânica é um método eficiente para superar a dormência de espécies com o tegumento duro e para potencializar o processo germinativo.

Aspectos físicos das sementes também influenciam na germinação, pois auxiliam na uniformização da emergência de plântulas e na selecão de sementes com maior vigor para a produção de mudas (MATOS et al., 2014).

Diante do potencial desta espécie florestal e da escassez de informações sobre a germinação de suas sementes, somado às limitações citadas para a propagação seminal, objetivou-se neste trabalho avaliar as características físicas das sementes de *L. pisonis*, bem como avaliar o processo germinativo destas sementes submetidas a diferentes métodos de superação de dormência.

# 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes Florestais localizado na área experimental do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira no município de Jerônimo Monteiro-ES, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES).

## 2.2 COLETA E BENEFICIAMENTO DO MATERIAL

Foram utilizadas sementes da espécie *Lecythis pisonis* coletadas de matrizes existentes na região Norte do Espírito Santo, no município de Linhares. O município de Linhares está localizado na latitude 19º 35'S e longitude 40,06 º'W e a temperatura média anual da região é de 23,5 ºC (AlVARES et al., 2014).

Os frutos (pixídios) foram coletados na fase inicial de deiscência com auxílio de um podão e foram transferidos para um local sombreado para abertura do opérculo e liberação de suas sementes. Em seguida, foram encaminhadas para o Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira para a condução dos estudos.

## 2.3 CARACTERISTICAS FÍSICA DE SEMENTES

Para o estudo biométrico foram separadas aleatoriamente 200 sementes e realizadas as seguintes medições: comprimento, largura e espessura com auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,1 mm. O comprimento das sementes foi medido do ápice até a base, que é a região de protrusão da raiz primária. Para a largura e diâmetro, foi considerada a parte mais larga e espessa da semente.

Foram calculadas as médias, máximos e mínimos, os desvios-padrões, os coeficientes de variação e a distribuição da frequência em classes para cada característica.

A determinação do teor de água nas sementes foi realizada pelo método de estufa a 105 ± 3 ºC, por um período de 24 horas (BRASIL, 2009), utilizando-se a seguinte equação (1):

$$U = \frac{P_i - P_f}{P_i} \quad (1)$$

Em que:

U = porcentagem de umidade;

Pf = peso final;

Pi = peso inicial;

Os parâmetros estatísticos para análise dos dados foram a média e o desvio padrão.

## 2.4 TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS DE SEMENTES DE *L. pisonis.*

As sementes passaram por tratamentos pré-germinativos de escarificação mecânica e química. Foi realizada a desinfestação das sementes intactas pela imersão em solução de álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio (2,5%) por 15 minutos. Após a imersão das sementes em cada um destes agentes desinfestantes, as mesmas foram lavadas três vezes em água destilada. Posteriormente as sementes foram tratadas com fungicida , por imersão em solução de Captan (50 g $L^{-1}$) + Mancozeb (50 g $L^{-1}$) por 10 minutos.

Em seguida as sementes de *L. pisonis* foram submetidas aos seguintes tratamentos pré-germinativos: T1. semente intacta (testemunha); T2. semente escarificada em lixa nº 80 (escarificação mecânica); T3. imersão em ácido sulfúrico (95%) por 30 minutos (escarificação química); T4. imersão em ácido sulfúrico (95%) por 60 minutos; T5. imersão em ácido sulfúrico (95%) por 90 minutos e T6. semente com o tegumento totalmente removido.

No tratamento de escarificação mecânica, as sementes foram friccionadas manualmente em lixa nº 80, no lado oposto ao eixo embrionário, até desgastar o

tegumento. Nos tratamentos de escarificação química as sementes foram imersas em ácido sulfúrico 96% ($H_2SO_4$) dentro de capela por 30, 60 e 90 minutos e em seguida foram lavadas em água corrente até a completa eliminação dos resíduos. Nas sementes com o tegumento totalmente removido, foi feita a fricção com lixas na região das estrias do tegumento (quinas), até provocar uma rachadura e, posteriormente, o tegumento foi removido com a ajuda de um bisturi.

Após os tratamentos, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, sendo a semeadura feita em bandejas plásticas contendo areia autoclavada por 20 minutos, umedecida com água destilada e mantidas em câmaras de germinação tipo BOD com temperatura constante de 30 °C e fotoperíodo de 8/16 horas. O número de plântulas emergidas foi avaliado diariamente. Com base nas observações, foi calculado:

**Emergência (E)** - correspondente à porcentagem total de plântulas emergidas.

**Índice de velocidade de emergência (IVE)** - foi calculado de acordo com Maguire (1962), utilizando-se a equação (2):

$$IVE = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{N_i}{D_i}\right) \quad (2)$$

Em que:

IVE = índice de velocidade de emergência;

$N_1$, $N_2$ ...$N_i$ = número de plântulas emergidas na primeira contagem, segunda ...i-ésima contagem, respectivamente;

$D_1$, $D_2$ ... $D_i$ = número de dias na primeira contagem, segunda ...i-ésima contagem, respectivamente.

**Frequência relativa da emergência** - Foi calculada a partir dos dados de emergência diária, em função do tempo (LABOURIAU; VALADARES, 1976), pela equação (3):

$$Fr = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^{k} n_i} \quad (3)$$

Em que:

Fr = frequência relativa da emergência;

k = último tempo de emergência das plântulas;

$n_i$ = número de plântulas emergidas na primeira contagem, segunda...i-ésima contagem, respectivamente;

Ao final do experimento (90 dias) foi realizada a caracterização morfológica das plântulas no tratamento de escarificação mecânica. Esta análise foi feita apenas no tratamento que apresentava o mínimo de 10 plântulas por repetição (BRASIL, 2009). As plântulas normais foram quantificadas (%) e avaliadas quanto ao diâmetro do coleto (mm), comprimento da parte aérea (cm), massa seca das folhas (g), do caule (g) e da raiz (g), massa seca total (g), número de folhas e área foliar ($cm^2$).

Para obtenção da massa seca, as plântulas foram colocadas em sacos de papel tipo kraft submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçada, com temperatura ajustada para 70 ºC, até peso constante, e posteriormente pesadas em balança analítica (0,0001 g).

A taxa de poliembrionia foi avaliada no tratamento de escarificação mecânica, contabilizado o número de sementes que apresentaram mais de uma plântula por semente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos e quatro repetições de 25 sementes totalizando 100 sementes por tratamento.

## 2.5 RAIO X

Foi feito o teste de raio X das sementes intactas e das sementes submetidas ao tratamento de escarificação química, por 30, 60 e 90 minutos. Primeiramente foram separadas 10 sementes de cada tratamento. Em seguida elas foram imersas ao ácido sulfúrico (98%), por 30, 60 e 90 minutos. Após a imersão ao $H_2SO_4$ as sementes foram lavadas em água corrente até a completa eliminação dos resíduos. Logo após, as sementes foram identificadas e enviadas ao Laboratório de Anatomia, Identificação e Densitometria de Raio X, localizado Departamento de Ciencias Florestais, – ESALQ (Universidade de São Paulo) para o teste de raio X das sementes. A leitura das amostras (escaneamento) foi realizada por um feixe

colimado de raios X no equipamento Faxitron X-ray. Logo após a obtenção das imagens radiogradas, as mesmas foram analisadas e foi observado se o tratamento de escarificação química causou algum dano ao embrião e ao tegumento da semente. Também foi observado as estruturas internas e o desgate químico do tegumento das sementes de *L. pisonis.*

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na impossibilidade de realizar análise da estatística paramétrica para porcentagem de emergência (E%) e índice de velocidade e emergência (IVE), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) sendo utilizado o programa R (THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING PLATAFORM, 2014).

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS SEMENTES DE *Lecythis pisonis*

As sementes de sapucaia apresentaram em média 38,95 mm de comprimento, 23,19 mm de largura e 18,33 mm de espessura (Tabela 1). Souza et al. (2008) encontraram valores inferiores de comprimento (23,5 mm) de sementes desta mesma espécie, entretanto valores superiores foram obtidos por Braga et al. (2007), com média de 43,1 mm de comprimento, 25,8 mm de largura e 20,4 mm de espessura. Isto indica a variação existente dentro da mesma espécie, o que pode estar relacionado com a genética de cada indivíduo e com outras características como as edafoclimáticas.

Tabela 1. Morfometria de sementes de *Lecythis pisonis*.

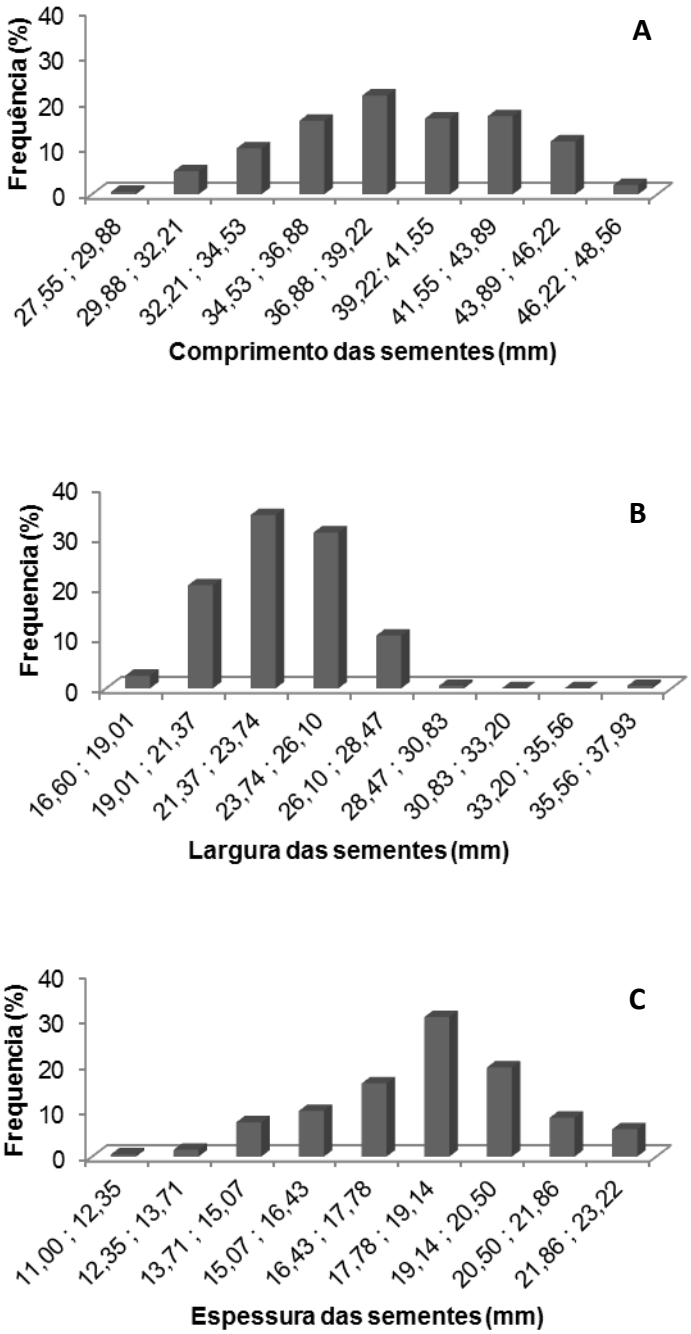
| Parâmetros | Média | Máximo | Mínimo | DP | CV (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento (mm) | 38,95 | 48,56 | 27,55 | 4,15 | 10,65 |
| Largura (mm) | 23,19 | 28,62 | 16,65 | 2,28 | 9,85 |
| Espessura (mm) | 18,33 | 23,22 | 11,00 | 2,21 | 12,07 |

DP = Desvio padrão; CV = Coeficiente de variação.

Este comportamento é corroborado pelos dados biométricos de sementes de outras Lecythidaceae, os quais apresentam grande variação entre as espécies da mesma família, como em *Gustavia augusta* L. com médias de 1,3 mm de comprimento 1,0 mm de largura e 0,8 mm de espessura (SILVA et al., 2014) e *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze com dimensões médias de 42,3 cm, 21,7 cm e 14,3 cm de comprimento, largura e espessura, respectivamente (RIBEIRO et al., 2015).

A maior parte das sementes de sapucaia apresentaram comprimento entre 34,53 e 43,89 mm (71%) (Figura 1A), largura entre 21,37 a 26,10 mm (65%) (Figura 1B) e espessura entre 17,78 a 20,50 mm (50%) (Figura 1C). De forma semelhante, Braga et al. (2007) ao estudarem a biometria desta Lecythidaceae verificaram que 45% das sementes apresentaram comprimento de 41,0 a 43,9 mm, 73% com largura entre 24,0 a 27,9 mm e 76% com espessura entre 18,0 a 21,9 mm.

Figura 1. Histograma de frequência (%) da distribuição dos valores de comprimento, (A) largura (B) e espessura (C) das sementes de *Lecythis pisonis.*




Segundo Baskin e Baskin (2014), os diferentes tamanhos de sementes dentro de uma espécie podem estar correlacionados com as variações do ambiente onde se encontra a planta matriz. Se no período de desenvolvimento da semente o recurso de energia da planta-matriz for limitado devido a um fator ambiental, como por exemplo, temperatura e água ou a estrutura física e química do solo, a mesma

produzirá sementes de tamanho variado, causando diferença nas respostas do processo germinativo da espécie.

O conhecimento da variação biométrica de caracteres de frutos e sementes é uma estratégia que pode ser adotada com a finalidade de uniformizar a emergência de plântulas e obter mudas de maior vigor e com padrões semelhantes (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). A considerar que sementes maiores podem representar maior quantidade de reserva e isto pode contribuir para um melhor desenvolvimento do embriaõ, avaliado pela alta relação volume do embrião/ volume do endosperma. Além disso, estudos biométricos das sementes, expressam informações relevantes sobre as diferentes características morfológicas entre indivíduos de uma determinada área (GUSMÃO; VIEIRA; FONSECA JÚNIOR, 2006).

## 3.2 TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS EM SEMENTES DE *L. pisonis.*

A umidade das sementes de *L. pisonis* foi de 18%. Na ausência de tratamentos pré-germinativos (testemunha), não foi observada emergência das plântulas no período de 90 dias, o que evidencia provável dureza tegumentar dessa espécie (Tabela 2). Algumas espécies com sementes impermeáveis podem formar bancos de sementes persistentes no solo sem perder a sua viabilidade e isto é uma estratégia para escalonar o desenvolvimento de plântulas, o que pode evitar as condições desfavoráveis do ambiente (SORIANO et al., 2014).

Tabela 2. Emergência (E%) e índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas oriundas de sementes de sapucaia, em função de tratamentos pré-germinativos no tegumento durante 90 dias.

| **Tratamentos** | **E (%)** | **IVE** |
|---|---|---|
| Testemunha | 0,0 d* | 0,00 d |
| Escarificação mecânica | 60,0 a | 0,40 a |
| $H_2SO_4$ (30 minutos) | 1,0 d | 0,00 d |
| $H_2SO_4$ (60 minutos) | 8,0 c | 0,04 c |
| $H_2SO_4$ (90 minutos) | 26,0 b | 0,13 b |
| Remoção total do tegumento | 0,00 d | 0,00 d |

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis, em nível de 5% de probabilidade.

Dentre os tratamentos utilizados neste estudo, a maior porcentagem de emergência (60%) foi obtida com a escarificação mecânica do tegumento, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 2). Com base nisso, sugere-se que as sementes da espécie *L. pisonis* apresentam dormência por impermeabilidade do tegumento, a qual dificulta ou impede a entrada de água e oxigênio, resultando em baixa ou nenhuma emergência das plântulas.

A dormência tegumentar ocorre em aproximadamente 18 famílias de angiospermas, incluindo a Lecythidaceae (BASKIN; BASKIN, 2014). A impermeabilidade do tegumento a água pode ser causada pela presença de uma ou mais camadas de células alongadas, os macroesclereídes, que formam uma camada paliçadica, constituída por células com paredes espessas e coberta externamente por uma camada cuticular cerosa (TURNER et al., 2005; VENIER et al., 2012; BEWLEY et al., 2013).

De forma similar aos resultados encontrados neste trabalho, o tratamento com escarificação mecânica foi eficiente em aumentar a porcentagem de emergência para outras espécies, como por exemplo, a castanha-do-gurguéia (*Dypterix lacunifera* Ducke) (CAVALCANTE et al., 2011), a castanha-do-macaco (*Sterculia striata* A. St.-Hil. & Naudin) (SILVA; MATA; BRUNO, 2012) e o faveiro (*Dimorphandra wilsonii* (MATHEUS et al., 2015).

Quanto ao efeito da escarificação química, verificou-se que os tratamentos com ácido sulfúrico por 30, 60 e 90 minutos não foram eficientes para superar a dormência tegumentar das sementes de sapucaia, apresentando menores percentuais de emergência (1, 8 e 26%, respectivamente) (Tabela 2). As baixas emergências observadas nestes tratamentos podem estar associadas ao tempo de permanência das sementes no ácido sulfúrico, sugerindo que os tempos testados foram insuficientes para promover a escarificação do tegumento, e consequentemente, permitir a entrada de água em quantidade adequada para o desenvolvimento do embrião.

Similarmente, Frazão et al. (1984) verificaram que a imersão das sementes de *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae) em ácido sulfúrico nos tempos de 5, 15, 25 e 35 minutos não foi capaz de acelerar e potencializar a porcentagem de emergência dessa espécie.

É importante destacar que o tempo de imersão em ácido sulfúrico é variável de espécie para espécie e principalmente com a espessura do tegumento.

Rodrigues et al. (2008) observaram em sementes de *Acacia mangium* Willd., que os melhores resultados foram obtidos com 90 minutos. Para *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) o melhor tempo de exposição foi de 45 minutos (MARTINS et al., 2008), enquanto em *Schizolobium amazonicum* Ducke, o tempo de 50 minutos não foi eficiente para aumentar a emergência da espécie (DAPONT et al., 2014).

Observa-se que o aumento do percentual de emergência e do vigor das sementes escarificadas com $H_2SO_4$ foi proporcional ao aumento do tempo de exposição ao ácido, havendo uma relação direta entre tempo de imersão e a porcentagem de germinação (Tabela 2). Isso sugere que estudos complementares e com tempos superiores de imersão ao ácido sulfúrico devem ser conduzidos para a espécie, a fim de determinar a influência da escarificação química na emergência das sementes de sapucaia.

Estruturas restritivas, tais como o endosperma e o tegumento provocam impedimentos ao crescimento do embrião (MATOS; ATAIDE; BORGES, 2015). Nesse sentido, Oliveira et al. (2013) observaram que a remoção do tegumento opercular aumenta a germinação de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddigesex Mart.). Confirmado por Rubio Neto et al. (2014) com a mesma espécie, ao removerem o tegumento na região do hilo, que resultou em maior germinação (64%) e vigor (IVG = 1,92). Segundo Oliveira et al. (2013), a eficácia da remoção opercular em macaúba está provavelmente relacionada com a diminuição da resistência ao alongamento embrionário, que é normalmente ocasionada pelo tegumento opercular.

Contudo neste trabalho, o tratamento com a total remoção do tegumento foi o menos eficaz dentre os métodos utilizados, não diferindo estatisticamente do tratamento controle (Tabela 2). Observou-se que este tratamento, após sete dias da semeadura, apresentou 100% das sementes deterioradas, caracterizadas pela consistência amolecida e odor desagradável, e alta incidência de fungos e bactérias. Segundo Jesus et al. (2012), em ambiente de laboratório, a alta umidade no interior da câmara de germinação favorece a proliferação de microorganismos, afetando diretamente as sementes sem revestimento, devido à sua maior susceptibilidade.

No entanto, outros processos inibitórios da germinação podem estar associados a baixa porcentagem de emergência das sementes, como por exemplo a presença do ácido linoleico (48,6% p/p) na fração lipídica de alguns genótipos de

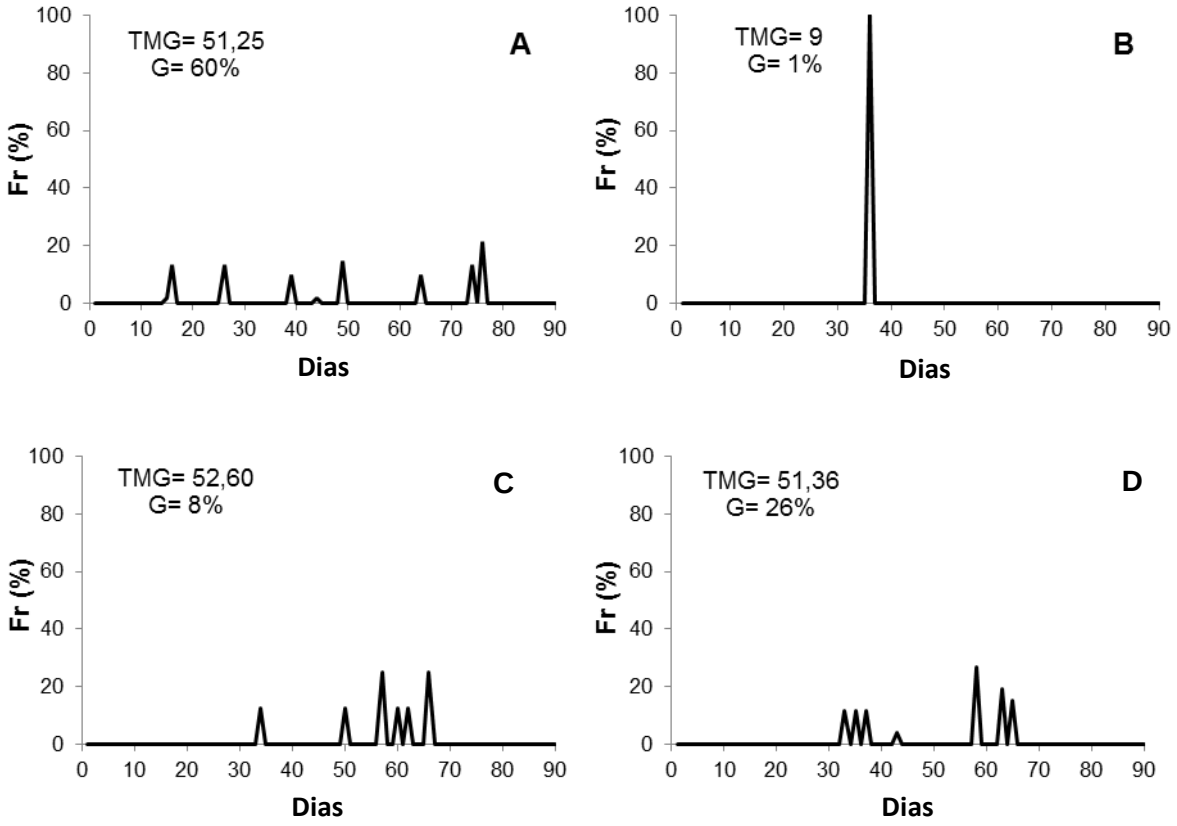
sapucaia. Este ácido em elevadas concentrações pode influenciar negativamente o percentual de emergência das sementes de sapucaia.

O tratamento feito com escarificação mecânica resultou em maior índice de velocidade de emergência (0,40), seguido pela imersão em $H_2SO_4$ por 90 minutos (0,13), ambos diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 2). Com base nesses resultados, verificou-se que o tratamento de escarificação mecânica, por provocar fissuras no tegumento permitiu uma embebição mais rápida e consequentemente acelerou o inicio de emergência das plântulas.

A maior velocidade de emergência é um aspecto fundamental para o estabelecimento de uma plântula em condição de campo, principalmente em condições adversas, como limitação hídrica, radiação intensa, presença de pragas, restrições físicas de substrato, entre outros (SANTOS et al., 2014). Além disso, a redução do tempo de emergência diminui o período de exposição das sementes a fungos e outros patógenos (DALLING et al., 2011).

Na Figura 2 são apresentadas as curvas de distribuição de frequência de emergência de plântulas de *L. pisonis* ao longo do tempo em cada tratamento. Em geral, observou-se comportamento polimodal nas distribuições, com mais de um pico de emergência, o que evidencia a heterogeneidade fisiológica das sementes de sapucaia e caracteriza sua emergência como lenta e desuniforme. A assimetria da distribuição sugere que a heterogeneidade seja ocasionada pela demora na germinação da maioria das sementes, dependendo do tratamento.

Figura 2. Frequência relativa a emergência de plântulas de *Lecythis pisonis* após as sementes serem submetidas a diferentes tratamentos de escarificação. A) escarificação mecânica, B) escarificação química por 30 minutos; C) escarificação química por 60 minutos e D) escarificação química por 90 minutos.




Sob escarificação mecânica, o início da emergência das plântulas ocorreu no 16º dia após a semeadura, apresentando os maiores picos no 26º, 49º e 76º dia após a semeadura. Para os tratamentos de escarificação química, a emergência iniciou-se mais tardiamente (entre o 33º e 34º dia após a semeadura) (Figura 2). A distribuição da emergência foi similar para as sementes imersas no ácido sulfúrico por 60 e 90 minutos, verificando-se os maiores picos no 58º e 57º dias, respectivamente e, entre 63º e 66º dias após a semeadura. Deste modo, é possível observar que as sementes escarificadas necessitam de um tempo menor para a emergência das plântulas se comparadas aos tratamentos químicos.

O tratamento de escarificação química por 30 minutos apresentou comportamento diferente dos demais, com um carácter unimodal, pois houve emergência de apenas uma semente (G= 1%).

Em condições naturais, é esperado o caráter adaptativo da heterogeneidade na emergência de plântulas conferido, principalmente, pela dormência (SILVA et al.,

2011). Essa irregularidade observada é positiva, pois, em condições naturais as plântulas emergem em tempos diferentes e parte destas evitam as condições climáticas desfavoráveis. No entanto, torna-se desvantajosa quando se deseja uma emergência rápida e uniforme, em processos de utilização de sementes em grande escala para a produção de mudas (ALVES et al., 2006; SEGURA et al., 2015).

Em um estudo realizado com a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), Camargo et al. (2000) afirmam que a desuniformidade e o maior período requerido para a germinação da castanheira possivelmente está associado a um longo período para que ocorra o processo de embebição, ativação enzimática e diferenciação dos tecidos meristemáticos na amêndoa, podendo este processo ser afetado pela grande quantidade de reservas do embrião e/ou por um balanço hormonal interno.

Ecologicamente, a dormência das sementes é muito importante na natureza, destacando-se como uma estratégia adaptativa que permite manter a sua viabilidade e a sobrevivência das plântulas durante as condições adversas do ambiente (WANG; HANSON; MARIAM, 2007; DASTHTI; MAJD-GHAHREMANI; ESNA-ASHARI, 2012). Entretanto, para a produção de mudas em grande escala e para o plantio comercial, esta característica não é desejável, devido ao atraso e desuniformidade da emergência, principalmente em espécies que perdem a viabilidade em um curto período de tempo como a *L. pisonis*.

De acordo com os valores médios dos parâmetros morfológicos de plântulas oriundas de sementes submetidas ao tratamento de escarificação mecânica (Tabela 3) foi possível observar que as plântulas eram vigorosas, com média de 16,14 cm de comprimento da parte aérea; 2,59 mm de diâmetro; 2,09 g de massa seca, com área foliar de 21,54 $cm^2$ e em média 13 folhas por plântulas.

Tabela 3. Diâmetro do coleto (DC), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca das folhas (MSF), do caule (MSC) e da raiz (MSR), massa seca total (MST), número de folhas (NF), área foliar (AF) de plântulas oriundas de sementes de *Lecythis pisonis* submetidas à escarificação após 90 dias de emergência.

| | **Parâmetros morfológicos** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **DC (mm)** | **CPA (cm)** | **MSF (g)** | **MSC (g)** | **MSR (g)** | **MST (g)** | **NF** | **AF ($cm^2$)** |
| **Mínimo** | 1,76 | 10,70 | 0,04 | 0,02 | 1,14 | 1,20 | 8,00 | 8,85 |
| **Média** | 2,59 | 16,14 | 0,25 | 0,17 | 1,67 | 2,09 | 13,08 | 21,54 |
| **Máximo** | 4,70 | 27,10 | 0,88 | 0,60 | 2,75 | 4,23 | 22,00 | 44,75 |
| **DP** | 0,38 | 1,67 | 0,09 | 0,05 | 0,73 | 0,27 | 1,02 | 5,02 |
| **CV (%)** | 14,66 | 10,37 | 34,98 | 32,96 | 43,71 | 12,91 | 7,81 | 23,20 |

## 3.3 TESTE DE RAIO X

Através das imagens radiográficas de sementes de *L. pisonis,* observou-se que após a escarificação química, ocorreu um desgaste do tegumento em função do tempo de exposição ao $H_2SO_4$ (98%) (FIGURA 3). O tegumento das sementes imersas ao $H_2SO_4$ por 30 minutos (Figura 3C), praticamente não apresentou desgaste químico, sendo que a espessura do tegumento em relação às sementes intactas foi à mesma (Figura 3A). Já o desgaste químico do tegumento das sementes imersas ao $H_2SO_4$ por 60 e 90 minutos foi mais elevado, devido ao maior tempo de exposição das sementes ao ácido sulfúrico (FIGURA 3C e D), sendo que as sementes imersas ao ácido por 90 minutos, apresentaram a menor espessura do tegumento. Esse desgaste químico provocado no tegumento permite a embebição de água pelas sementes e consequentemente o início do processo germinativo.

As imagens de sementes de sapucaia, obtidas pelo raio X, permitiram identificar algumas estruturas internas, como o embrião, localizado no centro da semente envolto pelo endosperma espesso e esbranquiçado (Figura 3C).

Após o tratamento de escarificação química, não foi observado nenhum dano causado ao embrião e ao endosperma. Os maiores tempos de imersão das sementes ao $H_2SO_4$ foram eficientes para promoverem o desgaste químico do tegumento, evitando, contudo danificar o embrião.

Essa técnica vem sendo aprimorada e utilizada na identificação de características invisíveis a olho nu em sementes de *Cedressa fissilis* Vell. (Masetto

et al., 2008); *Eugenia pleurantha* O. Berg (Masetto et al., 2007); *Peltophorum dubium* (Oliveira et al., 2003) e *Lithraea molleoides* (Machado e Cícero, 2003).

**Figura 3.** Imagens radiográficas de sementes de *L. pisonis* após o tratamento com ácido sulfúrico ($H_2SO_4$). Semente intacta (A). Semente imersa no $H_2SO_4$ por 30 minutos (B), 60 minutos (C) e 90 minutos (D). Legenda: e. embrião; en. endosperma; h. hilo; t. tegumento. Seta: detalhe do desgaste químico do tegumento em função da exposição ao $H_2SO_4$

## 3.4 POLIEMBRIONIA

Neste estudo foi observado nas sementes de sapucaia escarificadas mecanicamente, que apresentaram germinação, a ocorrência de sementes poliembriônicas.

A poliembrionia, caracteriza-se pela presença de mais de um embrião na semente. E essa ocorrência é de grande interesse prático, pois possibilita a obtenção de mais de uma plântula por semente. É uma característica pouco relatada em espécies florestais, quer seja pela falta de estudos, ou pela não ocorrência propriamente dita, contudo, é observado em várias espécies frutíferas, como, jabuticaba, abacate, manga e citrus (ROCHA et al., 2014; WAGNER-JÚNIOR et al., 2011; SILVA et al., 2003 e DONADIO et al., 2002).

A porcentagem de emergência das sementes escarificadas mecanicamente foi de 60%. Destas, 13 sementes apresentaram poliembrionia dando origem a duas plântulas, uma semente originou três plântulas e uma semente deu origem a quatro plântulas. Desta forma 25% das sementes emergidas apresentaram poliembrionia.

No Brasil esta característica foi mais estudada em mangueira e citros, principalmente com intuito de diferenciar precocemente a plântula de origem sexual das plântulas de origem assexual, visando sua utilização no melhoramento genético (CORDEIRO et al., 2006; RAMOS et al., 2006 e ROCHA et al., 2014). Segundo Corner (1976), as sementes de alguns gêneros da família Lecythidaceae podem apresentar vários embriões. Com a ocorrência de  da poliembrionia é evidenciado que o potencial embriogênico não é limitado apenas ao zigoto, mas a várias outras células somáticas.

A poliembrionia dá origem a múltiplas plântulas, que aumentam a oportunidade de estabelecimento com sucesso de pelo menos uma plântula a partir de uma única semente (MENDES-RODRIGUES et al., 2005). Além disso, ela permite a coexistência de embriões sexuados e assexuados na mesma semente, aumentando a chance de obter plântulas de origem nucelar, com características semelhantes à planta-mãe.

Neste contexto, a poliembrionia é uma característica vantajosa para a espécie *L. pisonis,* devido a mesma apresentar dificuldades na propagação via seminal, por ter reduzida taxa de emergência e baixa frequência nas matas. Tal ocorrência pode aumentar as possibilidades de pelo menos um embrião por semente sobreviver e

isso, consequentemente, aumenta a chance de pelo menos uma plântula se estabelecer no ambiente. No entanto, as informações sobre a presença da poliembrionia nas sementes de sapucaia são escassas, sendo necessários estudos sobre o conhecimento dos fatores que controlam a poliembrionia, sua distribuição e relação com o meio ambiente.

Figura 4. Semente poliembriônica de *L. pisonis* com formação de duas plântulas. Barra= 5 cm.

Fonte: o autor

# 4 CONCLUSÕES

As características físicas das sementes de sapucaia são variáveis.

A sapucaia apresenta uma germinação lenta e irregular, tendo início após 15 dias de semeadura.

A sapucaia apresenta dormência tegumentar por impermeabilidade do tegumento. Porém, não se pode afirmar que a presença do tegumento duro é a única causa da dormência encontrada nesta espécie.

O tratamento pré-germinativo mais eficiente para superar a dormência física das sementes de sapucaia é a escarificaçã mecânica, que além de aumentar a taxa e uniformizar a germinação, proporciona maior vigor às sementes.

A especie apresenta sementes poliembriônicas.

# 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ALVES, E. U. et al. Ácido sulfúrico na superação da dormência de unidades de dispersão de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 187-195, 2006.

AL-MENAIE, H. S; AL-RAGAM, O.; AL-SHATTI, A.; MATHEW, M.; SURESH, N.The effects of different treatments on seed germination of the *Cassia fistula* L. and *Cassia nodosa* Buch.-Ham.ex Roxb. in Kuwait. **African Journal of Agricultural Research**, Lagos, v. 5, n. 3, p. 230-235, 2010.

ANDRADE, L. A. et al. Aspectos biométricos de frutos e sementes, grau de umidade e superação de dormência de jatobá. **Acta Scientiarum Agronomy,** Maringá, v. 32, n. 2, p. 293-299, 2010.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds*:* ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**, 2 ed. San Diego, CA, USA: Academic/Elsevier, 2014. 1600p.

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

BRAGA, L. F. et al. Caracterização morfométrica de sementes de castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* CAMBESS - LECYTHIDACEAE). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 5, n. 1, p. 111-116, 2007.

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

CAMARGO, I. P.; CASTRO, E. M.; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia e morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-brasil. **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 11-18, 2000.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 5. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.

CAVALCANTE, I. H. L. et al. Seedling production of gurguéia nut (*Dypterix lacunifera* Ducke): Seed germination and suitable substrates for seedlings. **International Journal of Plant Production**, v. 5, n. 4, p. 102-108 , 2011.

CORDEIRO, M. C. R. et al. Identificação da origem genética de plântulas em sementes poliembriônicas de mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. Rosinha por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 454-457, 2006.

CORNER, E.J.H; F. R. S.**The seeds of dicotyledons**.Cambridge University Press. v. 1, p. 159-160, 1976.

DALLING, J. W.; DAVIS, A. S.; SCHUTTE, B. J.; ARNOLD, A. E. Seed survival in soil: interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. **Journal of Ecology**, v. 99, p. 89‑95, 2011.

DAPONT, E. C. Métodos para acelerar e uniformizar a emergência de plântulas de *Schizolobium amazonicum*. **Revista Ciência Agronômica**, Ceará, v. 45, n. 3, p. 598-605, 2014.

DASHTI, F.; MAJD-GHAHREMANI, H.; ESNA-ASHARI, M. Overcoming seed dormancy of mooseer (*Allium hirtifolium*) through cold stratification, gibberellic acid, and acid scarification. **Journal of Forestry Research**, v. 23, n. 4, p. 707-710, 2012.

DAYRELL, R. L. C. Environmental control of seed dormancy and germination of *Mimosa calodendron* (Fabaceae): implications for ecological restoration of a highly threatened environment. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 395-39, 2015.

DENADAI, S. M. S. et al. *In vitro* digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases.**Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Funep, 2002.

FRAZÃO, D. A. C. et al. Escarificação química na emergência de sementes de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, HBK). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 6, n. 1, p. 83-90, 1984.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical**: espécies com frutos comestíveis. v. 2 Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 2001. 580 p.: il.

FINCH SAVAGE, W.E.; LEUBNER METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, Hoboken, v. 171, p. 501 523, 2006.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. DE A.; FONSECA JÚNIOR, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich.ex A. Juss. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 84-91, 2006.

LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera*(Ait.) Ait. f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, v.1. 4 ed. Nova Odessa: InstitutoPlantarum, 2008.

MACHADO, C. F.; CICERO, S. M. Aroeira-branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. - Anacardiaceae) seed quality evaluation by the X-ray test. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 393-397, Apr./June 2003.

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

MARTINS, C. C. et al. Métodos de superação de dormência de sementes de barbatimão. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 30, n. 3, p. 381-385, 2008.

MASETTO, T. E.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A.; FARIA, J. M. R. Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia pleurantha* (Mytaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 3, p.170-174, 2007.

MASETTO, T. E; FARIA, J. M. R; QUEIROZ, S. E. E. Avaliação da qualidade de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* - meliaceae) pelo teste de raios X. **Ciência e agrotecnologia,** Lavras, v. 21, n. 6, p. 1708-1712, 2008.

MATHEUS, M. T.; FREITAS, A. R.; LOPES, J. C.; ALEXANDRE, R. S. Vigor test in *Dimorphandra wilsonii* seeds depending on soaking and electrical conductivity. **Científica** (Jaboticabal. Online), v. 43, p. 396, 2015.

MATOS, A. C. B.; ATAIDE, G. M.; BORGES, E. E. L. Physiological, physical, and morpho-anatomical changes in *Libidibia ferrea*((Mart. *ex* Tul.) L.P. Queiroz) seeds after overcoming dormancy. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 26-32, 2015.

MATOS, F. S. Variação biométrica de diásporos de buriti (*Mauritia flexuosa*L.f. – Arecaceae) em veredas em diferentes estágios de conservação. **Ciência florestal**. Santa Maria, v. 24, n. 4, p. 833-842, 2014.

MENDES-RODRIGUES, C. et al. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens*(Malvaceae - Bombacoideae). **Plant Biology**, v. 7, p. 533-540, 2005.

MOHAMED-YASSEEN, Y. et al. The role of seed coats in seed viability. **Botanical Review**, v. 60, n. 4, p. 426-439, 1994.

OLIVEIRA, T. G. S.; RODRIGUES JUNIOR, A. G.; SOUZA, P. P.; RIBEIRO, L. M. Use of phytoregulators in overcoming macaw palm seed dormancy. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 4, p. 505-511, 2013.

PEREIRA, S. A.; FERREIRA, S. A. N. Superação da dormência em sementes de visgueiro-do-igapó *(Parkia discolor).* **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 1, p.151-156, 2010.

RAMOS, J. D. et al. Poliembrionia e caracterização de frutos de citrumelo ‘Swingle’ e de *Poncirus trifoliata*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 88-91, 2006.

ROCHA, A. et al. Identification of ‘Ubá’ mango tree zygotic and nucellar seedlings using ISSR markers. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 5, p. 597-604, 2014.

RIBEIRO, R. T. M. Morfologia de frutos e sementes de *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Lecythidaceae). **Scientia Amazonica**, Manaus, v. 4, n. 2, 2015.

RIBEIRO, G. D. **Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010. 179p.

RODRIGUES, A. P. A. C. et al. Tratamentos para superar a dormência de sementes *de Acacia mangium* Willd. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 279-283, 2008.

RUBIO NETO, A.; SILVA, F. G.; SALES, J. F.; REIS, E. F.; SILVA, L. Q.; CAMPOS, R. C. Dormancy breaking in macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Loddigesex Mart.] seeds. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 1, p. 43-50, 2014.

SANTOS, J. L. et al. Superação da dormência tegumentar de sementes de *Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth pela escarificação química. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 6, p. 1642-1651, 2014.

SEGURA, F. Effects of maternal environmental factors on physical dormancy of *Astragalus nitidiflorus* seeds (Fabaceae), a critically endangered species of SE Spain. **Flora,** v. 216, p. 71-76, 2015.

SILVA, C. V. et al. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 213-221, 2003.

SILVA, K. B.; MATA, M. F.; BRUNO, R. L. A. Tratamentos pré-germinativos para superação da dormência de sementes de *Sterculi astriata* A. St. Hil. Naldin. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 857-866, 2012.

SILVA, P. E. M. et al. Quebra de dormência em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Idesia** (Arica), v. 29, n. 2, p. 39-45, 2011.

SILVA, R. M. et al. Caracterização de frutos, sementes, plântulas e germinação de jeniparana. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 5, p. 746-751, 2014.

SILVEIRA, F. A. O. Sowing seeds for the future: the need for establishing protocols for the study of seed dormancy. **Acta botanica brasilica**, Pampulha, v. 27, n. 2, p. 264-269, 2013.

SORIANO, D.; HUANTE, P.; GAMBOA-DEBUEN, A.; OROZCO-SEGOVIA, A. Effect of burial and storage on germination and seed reserves of 18 tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. **Oecologia**, v. 174, n. 1, p. 33-44, 2014.

SOUZA, V. A. B. et al. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 946-952, 2008.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. Utilização do teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 116-120, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 5 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013. 820 p.

THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING PLATAFORM. **R -** A language and environment for statistical computing. Version 3.1.1 Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014.

TURNER, S. R. et al. Physical dormancy in seeds of six genera of Australian Rhamnaceae. **Seed Science Research,** Londrina**,** v. 15, p. 51–58, 2005.

VALLILO, M. I.; TAVARES, M.; AUED-PIMENTEL, S.; CAMPOS, N. C.; MOITA NETO, J. M. *Lecythis Pisonis* Camb.nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 197-200, 1998.

VENIER, P.; FUNES, G.; CARRIZO-GARCIA, C. Physical dormancy and histological features of seeds of five *Acacia species* (Fabaceae) from xerophytic forests of central Argentina. **Flora**, v. 207, p. 39-46, 2012.

WAGNER-JÚNIOR, A. et al. Germinação e desenvolvimento inicial de duas espécies de jabuticabeira em função do tamanho de sementes. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 105-109, 2011.

WANG, Y. R.; HANSON, J.; MARIAM Y. W. Effect of sulfuric acid pretreatment on breaking hard seed dormancy in diverse accessions of five wild *Vigna* species. **Seed Science and Technology**, Londrina, v. 35, p. 550−559, 2007.

# CAPÍTULO II

## POTENCIAL ORGANOGÊNICO E EMBRIOGÊNICO DE *Leythis pisonis* CAMBESS.

**Potencial organogênico e embriogênico de *Leythis pisonis* cambess.**

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial organogênico e embriogênico de explantes de *Lecythis pisonis* e o estabelecimento *in vitro* de sementes de sapucaia, visando a regeneração de plantas como uma alternativa para a produção de mudas. As sementes sem tegumento foram inoculadas no meio WPM sem adição de regulador de crescimento e mantidas em sala de crescimento por 150 dias, com temperatura e fotoperíodo controlado. Neste primeiro experimento foram observadas diferentes respostas morfogênicas, como: esverdeamento (63%), calogênese (84%), germinação (8%), rizogênese direta (4%) e organogênese indireta (2%). Algumas sementes germinadas *in vitro* eram poliembriônicas. Para a indução da embriogênese somática foram utilizadas sementes de sapucaia seccionadas, inoculadas em meio MS, com a adição dos fitorreguladores 2,4-D (0; 1,5 e 3,0 mg $L^{-1}$) e cinetina (0; 0,5 e 1,0 mg $L^{-1}$), mantidas em sala de crescimento no escuro sob temperatura 27º C, durante 90 dias. As concentrações de auxina utilizadas neste trabalho não foram eficientes na indução de embriões somáticos. Foi testado também o efeito da auxina AIB (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg $L^{-1}$) no enraizamento *in vitro* de segmentos caulinares de plântulas germinadas *in vitro.* Houve formação de raízes em todas as concentrações testadas, à exceção da ausência da auxina. A indução de raízes só ocorre na elevação da temperatura, com formação de raízes grossas e sem a indução da parte aérea.

**Palavras-chave**: sapucaia, respostas morfogênicas, auxina, calogênese.

**Potential organogenic and embryogenic *in vitro Lecythis pisonis* cambess**


## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the potential organogenic and embryogenic explants of *Lecythis pisonis* and the establishment of *in vitro* sapucaia seeds, aiming to regenerate plants as an alternative to the production of seedlings. Seeds without tegument were inoculated in WPM medium without added growth regulator and maintained in growth room for 150 days, with temperature controlled photoperiod. In this first experiment were observed different morphogenetic responses, such as: greening (63%) callus induction (84%), germination (8%), direct rhizogenesis (4%) and indirect organogenesis (2%). Some seeds germinated *in vitro* were polyembryonic. For the induction of somatic embryogenesis were used seed sectional sapucaia inoculated in MS medium with the addition of the phytohormone 2,4-D (0; 1,5, and 3,0 mg $L^{-1}$) and kinetin (0; 0,5 and 1,0 mg $L^{-1}$), held in a growth chamber in the dark at a temperature 27º C for 90 days. The auxin concentrations used in this study were not effective in inducing somatic embryos. It was also tested the effect of auxin IBA (0,0; 1,0; 2,0 and 3,0 mg L-1) *in vitro* rooting of stem segments of *in vitro* germinated seedlings. There was formation of roots at all concentrations tested, except for the absence of auxin. The root induction occurs only in raising the temperature, formation of thick roots with and without the induction of shoots.


**Keywords:** sapucaia, morphogenetic responses, auxin, callogenesis.

# 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Lecythis pisonis* Cambess (Lecythidaceae), conhecida porpularmente como sapucaia, tem ocorrência desde o Ceará até o Rio de Janeiro. Apresenta altura média de 20 a 30 metros e o tronco pode alcançar 90 cm de diâmetro (BRAGA et al., 2007; LORENZI, 2008). O fruto tem formato arredondado ou achatado, casca rígida de coloração castanha (SOUZA et al., 2008).

Esta espécie apresenta potencial ornamental, frutífera, madeireira e é indicada para reflorestamento por ser uma espécie clímax e atrair a fauna do local (RIBEIRO, 2010). Além disso, a sapucaia produz sementes oleaginosas, que se constituem em uma castanha comestível rica em proteínas, minerais e vitaminas (DENADAI et al., 2007; SOUZA et al., 2008; CARVALHO et al., 2012).

A propagação das espécies da família Lecythidaceae é seminífera, como em *Bertholletia excelsa* Bonpl. (CAMARGO et al., 2000; SILVA et al., 2009), *Couratari stellata* A.C.Sm. (CRUZ; CARVALHO, 2003) e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (HERNANDEZ et al., 2013). Entretando, a propagação seminal da sapucaia para a produção de mudas pode ser limitada por fatores como, a dificuldades de coleta e a produção sazonal de suas sementes, além de apresentar processo germinativo lento.

No intuito de promover a produção de mudas em escala comercial, a propagação vegetativa *in vitro* apresenta-se como uma técnica viável para a redução do tempo de germinação e obtenção de mudas, com alta qualidade fitossanitária (WENDLING et al., 2009; SOARES et al., 2011). O cultivo *in vitro* tem sido utilizado na área florestal para preservação de germoplasma, produção de indivíduos livres de patógenos, rápida multiplicação em espaço reduzido e produção de mudas selecionadas (ERIG; SCHUCH, 2005).

Neste contexto, são necessários estudos sobre os aspectos do cultivo *in vitro* da espécie sapucaia, com o intuito de facilitar a sua propagação. Objetivou-se com este trabalho estudar o potencial organogênico e embriogênico de explantes da espécie *L. pisonis*.

# 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 LOCAL DE ESTUDO E MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas sementes da espécie Lecythis pisonis (sapucaia) coletadas no município de Linhares- ES. Estas, inicialmente foram levadas para o Laboratório de Sementes Florestais, onde foram beneficiadas com a remoção do tegumento com auxílio de uma lixa n° 80 e bisturi.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Produção Vegetal e no Laboratório de Sementes Florestais, localizado no Departamento de Ciências Florestais e da Madeira no município de Jerônimo Monteiro-ES, ambos pertencentes ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES).

## 2.2. ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Lecythis pisonis*

### 2.2.1 Desinfestação e meio de estabelecimento das sementes

As sementes sem o tegumento foram lavadas em água corrente e em seguida em detergente neutro e em água corrente por cinco minutos. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por cinco minutos, e hipoclorito de sódio – NaOCl (2,5% de cloro ativo), por 20 minutos e imersas na solução de peróxido de hidrogênio (50%) por cinco minutos. Após a imersão das sementes em cada uma destas soluções, as mesmas foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida foram inoculadas cinco sementes por frascos de vidros contendo 50 mL de meio de cultura. As sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de 36 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$, fotoperíodo de 8/16 horas e temperatura de 27 ± 2 °C.

O meio de cultura utilizado foi o WPM (LLOYD; Mc COWN, 1980), suplementado com 30 g $L^{-1}$ de sacarose, 100 mg $L^{-1}$ de mio-inositol, 1 mL $L^{-1}$ de vitaminas (tiamina, glicina e piridoxina) e solidificado com 7 g $L^{-1}$ de ágar. O pH do

meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 com hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N, antes da autoclavagem. O mesmo foi distribuído em frascos de vidros, vedados com tampa plástica, e autoclavados durante 20 minutos à temperatura de 121 ºC e pressão de 1 atm.

Após 150 dias foram avaliadas as respostas morfogênicas *in vitro* das sementes (%): esverdeamento; germinação; calos; oxidação; rizogênese direta; organogênese indireta e poliembrionia. Foi calculado a média, o desvio e erro padrão da média . Os dados foram submetidos á estatística descritiva.

## 2.3. INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE SEMENTES DE *Lecythis pisonis.*

### 2.3.1 Meio de cultura e indução da embriogênese somática

As sementes sem tegumento foram seccionadas em cortes transversais de aproximadamente 0,5 cm de espessura com auxílio de um bisturi, formando discos. A assepsia foi realizada em câmera de fluxo laminar, conforme descrita na metodologia do item 2.2.1. Para a indução de embriogênese somática foram estudadas diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-D diclorofenoxiacético) e cinetina (Tabela 1).

Tabela 1. Indução da embriogênese somática *in vitro* a partir de sementes de *Lecythis pisonis* com diferentes concentrações e reguladores de crescimento (2,4-D e cinetina (KI).

| **Tratamentos** | **Reguladores de crescimento (mg $L^{-1}$)** | |
|---|---|---|
| | **2,4-D** | **KI** |
| T1 | 0,0 | 0,0 |
| T2 | 0,0 | 0,5 |
| T3 | 0,0 | 1,0 |
| T4 | 1,5 | 0,0 |
| T5 | 1,5 | 0,5 |
| T6 | 1,5 | 1,0 |
| T7 | 3,0 | 0,0 |
| T8 | 3,0 | 0,5 |
| T9 | 3,0 | 1,0 |

Os explantes foram dispostos individualmente em placas de Petri plásticas descartáveis e estéreis (60 x 15 mm) contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g $L^{-1}$ de sacarose, 100 mg $L^{-1}$ de mio-inositol, 1 mL $L^{-1}$ de vitamina, PVP (polivinilpirrolidona) e reguladores de crescimento em diferentes concentrações (Tabela 1). O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição de ágar (6 g $L^{-1}$). Os explantes foram mantidos no escuro em sala de crescimento com temperatura controlada a 27 ± 2 ºC. Foram avaliados: calos (%); morfologia dos calos formados e a presença ou ausência de embriões somáticos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado totalizando nove tratamentos constituídos por 15 repetições cada.

### 2.3.2 Registro fotográfico e caracterização ultraestrutural

Durante o experimento foi realizado o registro fotográfico com o auxílio de uma lupa. Após 90 dias de cultivo, foi realizada a caracterização ultraestrutural por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos calos formados de cada tratamento de indução.

A fixação foi feita em solução Karnovsky por 24 horas. Em seguida, a amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2-7,4), e desidratadas

em série etílica até álcool absoluto e submetidas à secagem em ponto crítico com $CO_2$ (Autosamdri 815, Tousimis®), dispostas em “stubs” e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica (Desk V, Denton Vacuum®). A análise e a fotodocumentação foram conduzidas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (JSM – 6610LV, Jeol®) e todas as imagens foram digitalmente processadas. As análises foram feitas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins da Universidade Federal do Espírito Santo.

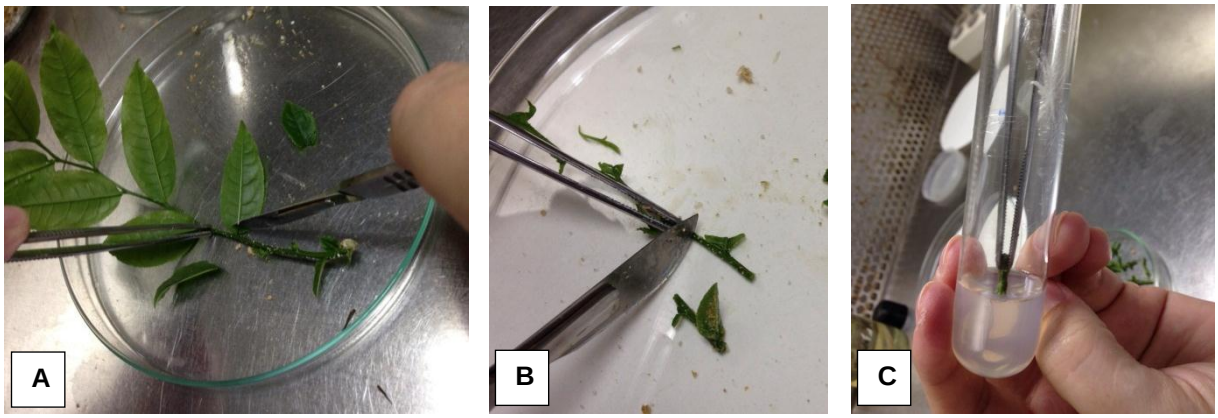
## 2.4 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DA ESPÉCIE *Lecythis pisonis*

### 2.4.1 Meio de cultura e indução da rizogênese

Foram utilizados segmentos caulinares de *L. pisonis* contendo pelo menos uma gema lateral assépticos (Figura 1) oriundos da germinação *in vitro*.

Os explantes foram dispostos verticalmente em tubos de ensaio (Figura 1), contendo 15 mL de meio MS completo, suplementado com 30 g $L^{-1}$ de sacarose, 100 mg $L^{-1}$ de mio-inositol, 1 $mL^{-1}$ de vitaminas de MS, PVP e diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB): (0; 1; 2 e 3 mg $L^{-1}$). O meio teve o pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do ágar (6 g $L^{-1}$) (Figura 1).

Figura 1. Indução da rizogênese *in vitro*. A e B) Seguimentos caulinares excisados de plântulas de *Lecythis pisonis* germinadas *in vitro*. C) Inserção do explante em meio de cultura.




Fonte: o autor

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2 Cº, fotoperíodo de 8/16 horas por um período de 60 dias. Após este período a temperatura da sala de crescimento foi elevada para 37 ºC durante 10 dias. Após 70 dias de cultivo foram analisados: enraizamento (%), número e comprimento de raízes (cm), oxidação (%) e calogênese (%).

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições, de um explante por tratamento. Os dados foram submetidos à estatística descritiva e, na impossibilidade de realizar análise estatística paramétrica sob os dados quantitativos (regressão), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) sendo utilizado o programa R (THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING PLATAFORM, 2014).

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

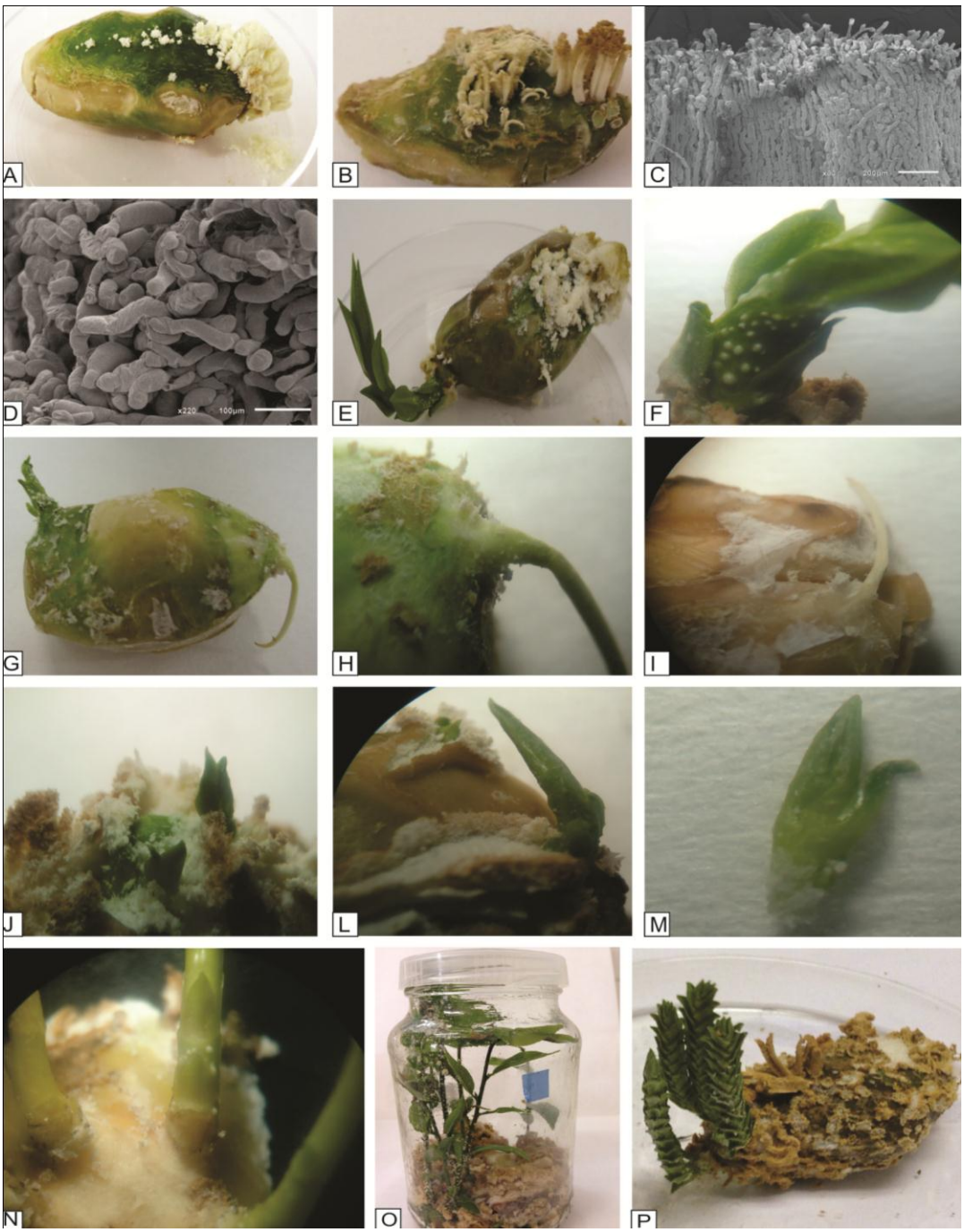
## 3.1. ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Lecythis pisonis.*

O protocolo de desinfestaçao utilizado neste trabalho não foi eficiente para controlar a infestação de microrganismos nas sementes de *L. pisonis*, em função do elevado percentual de contaminação (50%). A elevada taxa de contaminação dos explantes pode estar associada à presença de bactérias e fungos endofíticos presente nas sementes, o que pode influenciar as respostas morfogênicas *in vitro.*

O estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica do cultivo *in vitro*. Segundo Couto et al. (2004), espécies arbóreas apresentam maiores dificuldade para o sucesso no estabelecimento *in vitro* devido à diversidade de micro-organismos contaminantes, principalmente se for utilizado material vegetal de indivíduos adultos. Altos índices de contaminações também foram encontrados em outras espécies lenhosas, como *Olea europaea* L. (92,95%) (DONINI et al., 2008) e em *Quercus rubra* L. (46%) (VIEITEZ et al., 2009).

Diferentes respostas morfogênicas foram observadas no estabelecimento *in vitro* de sementes sem tegumento de *L. pisonis* (Figura 2). Após sete dias de cultivo *in vitro* começaram a ser evidenciadas alterações na superfície do explante, como o esverdeamento do tecido e a formação de calos brancos, o que o caracteriza, aparentemente, como não sendo friáveis (Figura 2C). A presença do esverdeamento dos tecidos pode ser atribuída à exposição à luz, que geralmente promove uma síntese de pigmentos de clorofila nas células (CORREDOIRA et al., 2002).

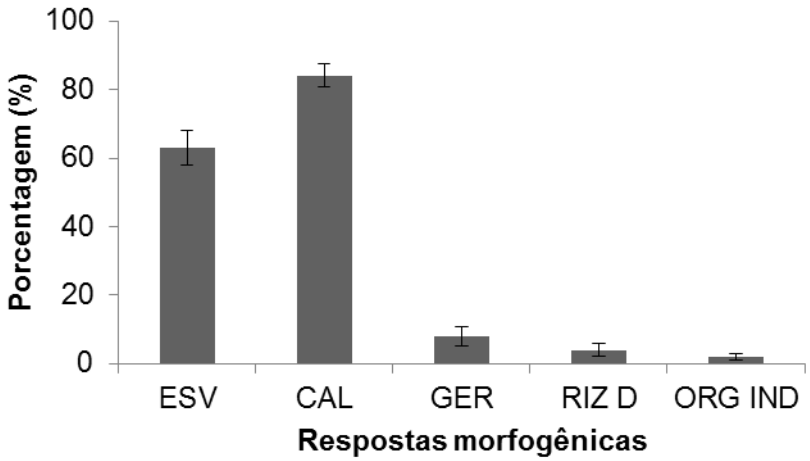
Figura 2- Respostas morfogênicas *in vitro* de sementes de *L. pisonis* sem o tegumento. A) esverdecimento da semente após 15 dias do estabelecimento, com o início da formação de calos; B) calogênese; C e D) microscopia eletrônica de varredura dos calos não-embriogênicos obtidos a partir do endosperma da semente; E) semente germinada; F) emissão de parte aérea G) semente com parte aérea e raíz; H e I) rizogênese direta; J e L) organogênese indireta; M) gema destacada oriunda da organogênese; N) destaque da poliembrionia; O e P) desenvolvimento de várias plântulas a partir de uma semente (poliembrionia).




Fonte: o autor

Em relação à porcentagem de germinação *in vitro*, foi observado que apenas 8% das sementes sem tegumento germinaram (Figura 3). Sugere-se que, entre os fatores associados à baixa germinação, possa ter ocorrido a disponibilidade insuficiente de água pela condição física do meio (geleificação), alterando os padrões de embebição das sementes. É importante destacar que no presente estudo foi utilizada a concentração de 7 g $L^{-1}$ de ágar. Embora seja padrão para o cultivo *in vitro* teores de ágar entre 6 e 8 g $L^{-1}$, por se tratar de uma semente muito grande, a concentração utilizada pode ter impedido a absorção de quantidade suficiente de água, assim como a difusão dos demais nutrientes para os explantes. Durante o processo germinativo, a absorção de água pela semente é fundamental, pois, é com a embebição que se inicia o processo de germinação, onde a semente necessita alcançar um nível adequado de hidratação, permitindo a reativação dos processos metabólicos (PEREIRA; FERREIRA, 2010).

Figura 3. Respostas morfogênicas *in vitro* de sementes de *Lecythis pisonis*. Porcentagem de esverdecimento (ESV); calogênese (CAL); germinação *in vitro* (G); rizogênese direta (RIZ D); organogênese indireta (ORG IND). Barras = Erro padrão.




Outro fator que pode estar associado à baixa germinação *in vitro* é a dormência imposta pelo endosperma, causando uma restrição sobre o crescimento do eixo embrionário. De acordo com Neto et al. (2014), o endosperma pode ser responsável pelo fornecimento de inibidores, como por exemplo o ácido abscísico (NAMBARA et al., 2010; LINKIES; LEUBNER-METZGER, 2012), que impedem o desenvolvimento do embrião. You et al. (2005) e Mendes et al. (2008) afirmam que a

remoção do endosperma facilita a germinação *in vitro* das espécies *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim.) e *Citrus* spp, respectivamente.

Somado a estes fatores, a elevada porcentagem de calos sobre o tecido da semente (84%) pode ter influenciado negativamente a germinação. Durante o processo de remoção do tegumento, os ferimentos causados nos tecidos do endosperma, geram estresse, e como resposta, maior indução de calos nos tecidos do explante (SMITH et al., 2012; HOU et al., 2015).

Outras respostas morfogênicas observadas neste estudo, foram a formação de raízes e brotos (rizogênese direta e organogênese indireta), com taxas de 4 e 2%, respectivamente (Figura 3). A formação de raízes pode ter ocorrido devido a um balanço hormonal endógeno de auxina e citocinina, que favoreceu a indução de raízes, onde a concentração de auxina foi mais elevada que a de citocinina. Também foi observada a formação de gemas a partir de calos, caracterizando a organogênese indireta (Figura 2J-L). Segundo Guerra; Noradi e Steinmacher (2006) e Lenis-Manzano et al. (2010), para a indução de gemas é necessário que a concentração de citocinina seja mais elevada que a de auxina.

Em relação à morfologia dos calos, observa-se que inicialmente eram brancos, com aspecto esponjoso e soltos facilmente da superfície do tecido da semente. No entanto, ao longo do experimento, verificou-se que houve rápido crescimento e alongamento desses calos, sem nenhuma formação de massa pro-embriogênica com escurecimento na região apical. Segundo Filanova et al. (2000), células alongadas apresentam vacuolização, sendo um primeiro sinal de morte celular acompanhada da ruptura de suas membranas.

Outra importante característica observada no estabelecimento *in vitro* de sementes de sapucaia, foi a presença de poliembrionia (Figura 2M). Do total de 24 sementes germinadas *in vitro* (8%), foram observadas seis sementes originando duas plântulas e duas sementes que originaram quatro plântulas, individualmente. Considerando que a propagação via sexual da sapucaia apresenta dificuldade pela baixa porcentagem e desuniformidade na germinação, a ocorrência de poliembrionia nesta espécie é muito vantajosa.

Diante dos resultados obtidos, é importante ressaltar que as respostas morfogênicas são controladas pelo balanço hormonal entre auxinas e citocininas. Este balanço pode ser influenciado por vários fatores, como a espécie, tipo de

explante, meio de cultura, fatores ambientais e competência dos tecidos em responder às mudanças hormonais durante o cultivo (SILVA et al., 2012).

Portanto, as respostas morfogênicas encontradas neste trabalho, servem de base para novos estudos, a fim de obter o estabelecimento *in viro,* testando meios de cultura, diferentes reguladores de crescimento e concentrações. Neste estudo, as sementes sem tegumento foram responsivas à formação de calos, abrindo perpectivas para o seu uso em estudos de embriogênese somática indireta.

## 3.2. INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SEMENTES DE *Lecythis pisonis*

O início da formação de calos em *L. pisonis* no meio de cultura ocorreu a partir da segunda semana de indução dos explantes, indicando uma rápida resposta. Foi observado que a calogênese ocorreu em todos os tratamentos, sendo que na ausência de 2,4-D (T1, T2 e T3), houve maiores porcentagens de calo (91; 91,6 e 93%, respectivamente) (Tabela 2). Esta resposta já era esperada, visto que, ainda no experimento de estabelecimento *in vitro*, o tecido das sementes sem tegumento foi responsivo a formação de calos, mesmo sem a adição de reguladores de crescimento. Segundo George, Hall e Klerk (2008), as respostas dos explantes no meio de indução são influenciadas pelo balanço hormonal entre auxina e citocinina, o que sugere que o balanço endógeno dos reguladores de crescimento favoreceu a calogênese.

Já nos tratamentos T7, T8 e T9 (3,0 mg $L^{-1}$ de 2,4-D), com a maior concentração de auxina, houve diminuição significativa na taxa de indução dos calos, com porcentagens de 23,0; 25,3 e 20,0%, respectivamente (Tabela 2). Este balanço hormonal com a maior concentração de auxina reduziu a indução de calos. De forma semelhante, em um estudo com a espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss., Nogueira et al. (2007) observaram que as concentrações acima de 2,4 mg $L^{-1}$ de 2,4-D reduziram a porcentagem de calos formados.

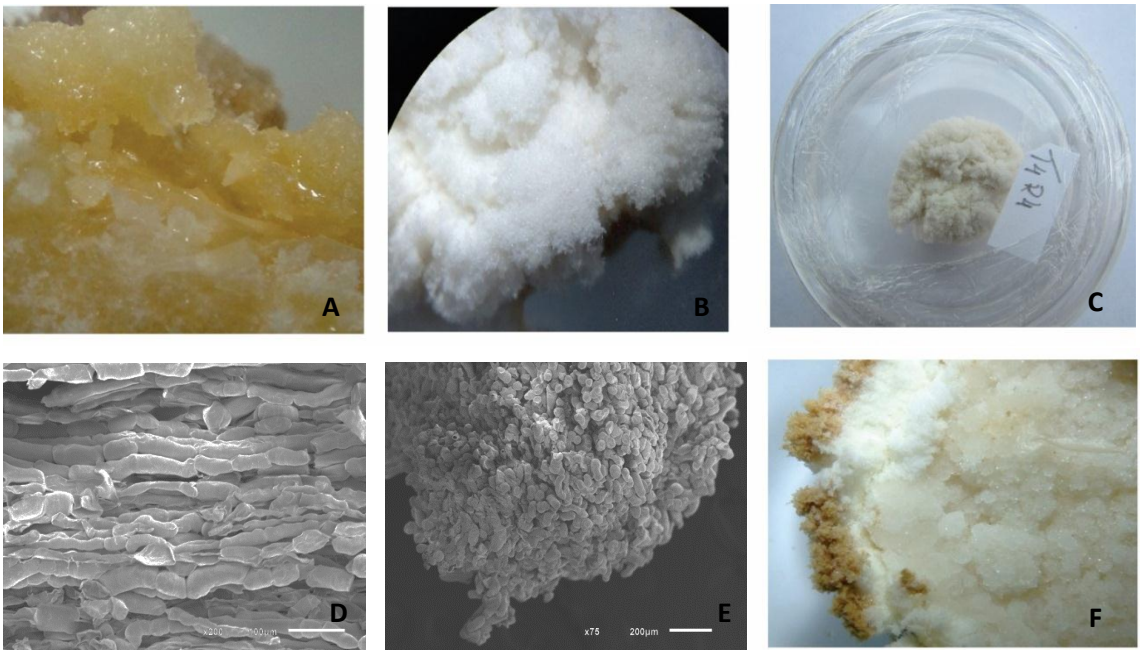
Tabela 2. Porcentagem de calos *in vitro* a partir de sementes de *Lecythis pisonis* com diferentes concentrações e tipos de reguladores (2,4-D e Cinetina).

| | **Reguladores de crescimento (mg $L^{-1}$)** | | **Calos (%)** |
|---|---|---|---|
| **Tratamentos** | **2,4-D** | **KIN** | |
| T1 | 0,0 | 0,0 | 91,00 |
| T2 | 0,0 | 0,5 | 94,66 |
| T3 | 0,0 | 1,0 | 93,00 |
| T4 | 1,5 | 0,0 | 83,33 |
| T5 | 1,5 | 0,5 | 81,00 |
| T6 | 1,5 | 1,0 | 80,00 |
| T7 | 3,0 | 0,0 | 23,00 |
| T8 | 3,0 | 0,5 | 25,30 |
| T9 | 3,0 | 1,0 | 20,02 |

Já para a espécie *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng. (Lecythidaceae) foi observado que a taxa de indução dos calos variou de 96 a 100%, apresentando rápido crescimento dos calos não-embriogênicos no tratamento com menores concentrações de 2,4-D (0,5 mg $L^{-1}$ de 2,4-D e 0,5 mg $L^{-1}$ de cinetina) (DALILA et al., 2013). Isso pode ser explicado, pois diferentes células, dos diferentes tecidos da planta, podem produzir quantidades substancialmente diferentes de auxina, sendo que alguns explantes nem necessitam da adição de reguladores.

Após 30 dias de indução, pode-se verificar uma diferenciação dos calos em relação ao seu aspecto e coloração entre os tratamentos. Embora a maior taxa de indução de calos tenha ocorrido nos tratamentos com ausência de 2,4-D (T1, T2 e T3), não foi observada a formação de embriões somáticos ou de estruturas pró-embriogênicas. Porém, para o tratamento T1 (0,0 mg $L^{-1}$ 2,4-D e 0,0 mg $L^{-1}$ de KIN) e T2 (0,0 mg $L^{-1}$ 2,4-D e 0,5 mg $L^{-1}$ de KIN) em média 33% dos explantes apresentaram calos mais translúcidos, amarelados, com aspecto gelatinoso e mais compacto, designado como friáveis. Para o tratamento T3 (0,0 mg $L^{-1}$ 2,4-D e 1,0 mg $L^{-1}$ de KIN) a média foi de 20% (Figura 4A).

Figura 4. Caracterização morfológica e ultraestrutural dos calos formados de explante de *Lecythis pisonis*. A) Formação dos calos friáveis (T3); B e C) Formação dos calos não embriogênicos (T4); D e E) calos não embriogênicos visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). F) Calos não friáveis após 30 dias de cultivo *in vitro* (T6).




Fonte: o autor

Já nos tratamentos T4 (1,5 mg $L^{-1}$ 2,4-D) e T7 (3,0 mg $L^{-1}$ 2,4-D) verificou-se que 100% dos explantes apresentaram calos brancos, com aspecto esponjoso e quebradiços, sem formação de massas pró-embriogênicas (Figura 4B e C). Nos demais tratamentos T5 (1,5 mg $L^{-1}$ 2,4-D e 0,5 mg $L^{-1}$ KIN), T6 (1,5 mg $L^{-1}$ 2,4-D e 1,0 mg $L^{-1}$ KIN) e T8 (3,0 mg $L^{-1}$ 2,4-D e 0,5 mg $L^{-1}$ KIN) os calos apresentaram coloração heterogênea, com áreas brancas e marrons escuras, indicando maior oxidação com aspecto esponjoso e quebradiços (Figura 4F).

Características semelhantes aos calos friáveis encontrados neste estudo, foram observadas nas espécies *Caesalpinia echinata* Lam. (WERNER et al., 2009), *Urochloa brizantha* (A.Rich.) R.D.Webster (LENIS-MANZANO et al., 2010) e *Elaeis guineenses* Jacq. (PÁDUA et al., 2013), sendo os calos amarelados, translúcidos, com aspecto gelatinoso, classificados também pelos autores como friáveis. Já em um estudo com a espécie *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (REIS et al., 2013) os calos friáveis originaram estruturas globulares pró-embriogênicas levando à formação de embriões somáticos.

É importante destacar que a formação de embriões somáticos varia de acordo com a composição do meio, tipo e concentração dos reguladores de crescimento, tempo de exposição aos fitorreguladores, tipo e estádio de desenvolvimento dos explantes (CARNEROS et al., 2009; PRAKASH; GURUMURTHI, 2009) e do estresse imposto pelas condições *in vitro* (FEHÉR et al., 2003).

Logo, o sucesso da embriogênese somática depende do balanço entre o nível de estresse imposto e o estado fisiológico das células do explante. Diferentes células, dos diferentes tecidos da planta, podem produzir quantidades substancialmente diferentes de auxina endógena, sendo que alguns explantes nem necessitam da adição exógena de reguladores. Portanto, a reposta quanto à concentração de auxina na indução da embriogênese somática pode ser considerada genótipo/explante expecífica (FEHÉR et al., 2003).

A eficiência do uso da auxina 2,4-D na indução de calos friáveis foi constatada em várias espécies, como *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (STERINER et al., 2005); *Cassia angustifólia* M.Vahl (AGRAWAL; SARDAL, 2007); *Gymnema sylvestre* (Retz.) R.Br. ex Sm. (ROY et al., 2008); *Colocasia esculenta* (L.) Schott (DEO et al., 2009). Entretanto, para as espécies *Caesalpinia echinata* Lam. (WERNER et al., 2009) e *Myracrodruon urundeuva* Allemão (VASCONCELOS et al., 2012) a concentração utilizada de 2,4-D no meio não induziu a formação de embriões somáticos.

Em algumas espécies, os calos são induzidos apenas com 2,4-D, enquanto outras necessitam da combinação de diferentes fitorreguladores tais como AIA (ácido indolacético), 6-BAP (6 benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) entre outros reguladores (NEWMAN et al., 1996).

Diante do exposto neste estudo, tais informações sugerem que as concentrações, e ou a razão entre os reguladores auxina/citocinina testadas não foram favoráveis para a expressão da embriogênese somática nos explantes de sapucaia. Desta forma, os resultados obtidos reforçam a necessidade de novos estudos para testar diferentes reguladores de crescimento e diferentes concentrações.

## 3.2 ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES CAULINARES DE *L. pisonis*

Na indução de enraizamento *in vitro* a partir de segmentos caulinares de plântulas germinadas *in vitro,* as concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg $L^{-1}$ de AIB apresentaram formação de raízes, à exceção dos tratamentos sem adição da auxina no meio (Tabela 3).

É importante destacar que segmentos de plântulas germinadas *in vitro* são ótimas fontes de explantes, devido à juvenilidade, o que possibilita maior atividade morfogenética dos tecidos.

Tabela 3. Enraizamento (%), calos (%), número e comprimento de raízes de segmentos caulinares de plântulas de sementes de *L. pisonis* germinadas *in vitro* a partir de diferentes concentrações de AIB.

| AIB (mg $L^{-1}$) | Enraizamento (%) | Calos (%) | Número de raizes | Comprimento das raízes |
|---|---|---|---|---|
| 0,0 | 0,00 b | 11,50 b | 0,0 b | 0,0 b |
| 1,0 | 50,0 a | 17,50 b | 1,10 a | 1,36 a |
| 2,0 | 60,0 a | 27,50 a | 3, 20 a | 1,62 a |
| 3,0 | 70,0 a | 25,50 a | 1,10 a | 0,70 a |

*Medias seguidas por letras iguais não diferem entre si, , pelo teste de Kruskal-Wallis, em nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao número e comprimento de raízes, não houve diferença estatística entre as concentrações 1,0, 2,0 e 3,0 mg $L^{-1}$ de AIB, diferindo estatisticamente apenas do controle. Já para a porcentagem de calos formados nos explantes, os tratamentos com 2,0 e 3,0 mg $L^{-1}$ de AIB diferiram estatisticamente dos demais, apresentando os maiores valores (27,50 e 25,50%, respectivamente) (Tabela 3).

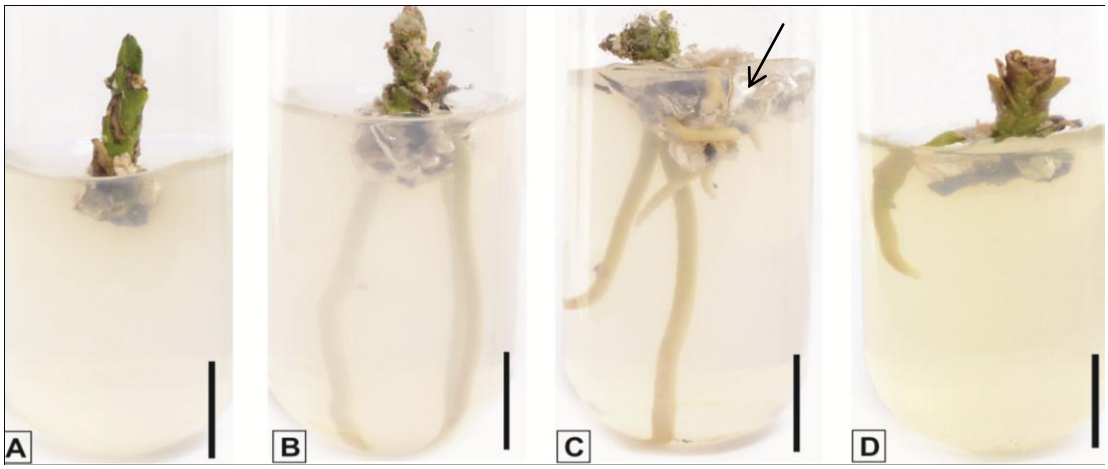
A formação de calo nessa região onde ocorre o enraizamento é indesejável, pois a qualidade do sistema radicular pode ser afetada principalmente no que se refere à conexão vascular com o explante, de modo a comprometer o sucesso da aclimatação das brotações. De acordo com Rogalski et al. (2003), a utilização de elevadas concentrações no meio de cultura pode afetar negativamente o enraizamento *in vitro* das brotações, o crescimento das raízes e induzir a formação de calo na base dos explantes.

Os meios de cultura suplementados com 1,0, 2,0 e 3,0 mg $L^{-1}$ de AIB apresentaram a porcentagem de enraizamento de 50, 60 e 70%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre eles.

A formação de raízes só ocorreu após 40 dias de indução, coincidindo com o período em que a temperatura foi elevada de 27 para 37 ºC. Após a elevação da temperatura observou-se um rápido crescimento do comprimento das raízes. Altas temperaturas contribuem para o aumento do metabolismo, favorecendo o desenvolvimento do primórdio radicular. Segundo Moncousin et al. (1991) e Hartmann et al. (1997), a divisão celular é favorecida com o aumento da temperatura e, consequentemente, auxilia a formação de raízes e a produção de brotos. Já, temperaturas baixas diminuem o metabolismo, levando à menor produção de brotações e ao maior tempo para o enraizamento ou, até mesmo, não proporcionam condições adequadas para que ocorram indução, desenvolvimento e crescimento radicular (XAVIER, 2002).

Em relação à morfologia das raízes, de modo geral observa-se que as mesmas são grossas, não apresentam pelos radiculares e também não houve formação da parte aérea. As raízes formadas com a aplicação de AIB nas concentrações de 1 e 2 mg $L^{-1}$ desenvolveram-se mais rápidamente em relação ao tratamento com 3 mg $L^{-1}$ de AIB (Figura 5).

Figura 5. Rizogênese *in vitro* a partir de segmentos caulinares de plântulas de *Lecythis pisonis* em meio MS suplementado com 0 mg $L^{-1}$ (A); 1 mg $L^{-1}$ ; (B); 2 mg $L^{-1}$; (C) e 3 mg $L^{-1}$ de AIB (D). Barra = 1 cm. Seta indicando a formação de calos.




Fonte: o autor

As auxinas são reguladores centrais na indução, crescimento e desenvolvimento de raízes (SAINI et al., 2013). Geralmente, a indução da rizogênese requer um ajuste entre os níveis de auxina e citocinina, mas é usualmente alcançada apenas com tratamentos com auxina. O AIB tem sido muito utilizado em razão da baixa fitotoxicidade aos explantes e estabilidade química, proporcionando resultados positivos ao enraizamento *in vitro*, como os reportados para *Caryocar brasiliense* A.St.-Hil. (SANTOS et al., 2006), *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (KIELSE, 2009), *Maclura tinctoria* (L.) D.Don ex Steud. (GOMES et al., 2010) e *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso (PELEGRINI et al., 2011).

A obtenção de plantas *in vitro* com um sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento, principalmente na aclimatização e transplantio para o campo.

Diante dos resultados observados, as diferentes concentrações de AIB utilizadas neste trabalho, induziram a formação de raízes apenas após a elevação da temperatura. No entanto, não foi observado desenvolvimento da parte aérea em nenhum dos tratamentos, sendo necessário o estudos da adição de outros reguladores ao meio.

## 4 CONCLUSÕES

Durante o estabelecimento *in vitro* de sementes de sapucaia, são observadas diferentes respostas morfogênicas, como, elevada taxa de calogênese, baixa germinação, rizogênese direta e organogênese indireta.

Apenas 8% das sementes de *L. pisonis* estabelecidas *in vitro* germinaram.

Do total de sementes germinadas *in vitro*, 33% das sementes apresentam poliembrionia.

O 2,4-D nas concentrações utilizadas não foi eficiente na formação de embriões somáticos. No entanto maiores porcentagens de calos não embriogênicos formados nos explantes ocorre sem a adição de 2,4-D.

Seguimentos caulinares de sapucaia, cultivados em meio com (1,0, 2,0 e 3,0 mg $L^{-1}$) de AIB formaram raízes.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁGICAS

AGRAWAL, V.; SARDAR, P. R. *In vitro* regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. ***In Vitro* Cellular &**

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; GILBERT, S.; CARVALHO, M. A. C. de. Caracterização morfométrica de sementes de castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* CAMBESS - Lecythidaceae). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v. 5, n. 1, p. 111-116, 2007.

CAMARGO, I. P. **Estudos sobre a propagação da castanheira-do-brasil** (***Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl**.). 1997. 126p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes:** ciência, tecnologia e produção. 5. ed., Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

CORREDOIRA, E.; VIEITEZ, M. A.; BALLESTER, A. Somatic embryogenesis. **Elm. Annals of Botany**, v. 89, n. 5, p.637-644, 2002.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

CRUZ, E. D.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e germinação de sementes de *Couratari stellata* A. C. Smith (LECYTHIDACEAE). **Acta Amazônia,** Belém, v. 3, n. 5, p. 381-388, 2003.

DENADAI, S. M. S. et al. *In vitro* digestibility of globulins from sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb.) nuts by mammalian digestive proteinases. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 535-543, 2007.

DEO, P. C. et al. Somatic embryogenesis, organogenesis and plant regeneration in taro *(Colocasia esculenta* var. esculenta**). Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 1, p. 61-71, 2009.

DONINI, L. P. et al. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. Arbequina para início da micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1769-1772, 2008.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria,** Curitiba, v. 5, n.1-2, p.61-68, 2004.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPEL, 1995. 178 p.

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.

FILONOVA, L. H. et al. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science,** London, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, 2000.

GEORGE, E. F.; HALLL, M. A.; KLERK, G. J. de. **Plant propagation by tissue culture.** Dordrecht: The Background, 2008. v. 1, p. 520 p.

GOMES, G. A. C. et al. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 25-30, 2010.

GOPI, C.; PONMURUMGAN, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of Ocimum basilicum L. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 206-264, 2006.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; STEINMACHER, D. A. **Introdução ao conceito de Biotecnologia**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2006. 41 p.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation:** principles and practices. 6.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770p.

HERNANDEZ, W.; XAVIER, A.; PAIVA, H. N.; WENDLING, I. Propagação vegetativa do jequitibá-rosa (*Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze) por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 5, p. 955-967, 2013.

HOU, J. et al. Plant regeneration through somatic embryogenesis and shoot organogenesis from immature zygotic embryos of *Sapium sebiferum* Roxb. **Scientia Horticulturae,** Georgia, v. 197, n. 2, p. 218-225, 2015.

KIELSE, P. et al. Regeneração in vitro de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1088-1094, 2009.

LENIS-MANZANO, S. J. et al. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica**. Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 435-441, 2010.

LINKIES, A; LEUBNER-METZGER, G. Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 2, p. 253-270, 2012.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. L.; NOGUEIRA, R. C.; PINTO J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Cerne,** Lavras, v. 7, n. 1, p.124-128, 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, v.1. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, M. P.; MAYER, J. L. S.; RITTER, M. et al. Indole butyric acid on rooting ability of semihardwood cutting of grapevine rootstock 'VR 043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 27, n. 3, p.476-479, 2005.

MENDES, R.C. et al. Effect of mechanical treatments on *in vitro* germination of citrus seeds. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 5, p. 445-449, 2008.

MONCOUSIN, C.H. Rooting of microcuttings: general aspects. **Acta Horticulturae**. Georgia, v. 289, p. 301-308. 1991.

NAMBARA, E. et al. Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**, Londrina, v. 20, n. 02, p. 55-67, 2010.

NETO, V. B. P et al. Ação inibitória do endosperma na germinação *in vitro* de embrião zigótico de pinhão manso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 433-438, 2014.

NEWMAN, P. O.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum)*, somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl segments induced with Benzylaminopurine. **International Journal of Plant Biology,** n. 157, p. 554-560, 1996.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007

PADUA, M. S. et al. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1545-1556, 2013.

PELEGRINI, L. L. et al. Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees e Martius) Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p. 1527-1523, 2011.

PEREIRA, R. C. A. et al. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J.F.Gmel. (unha de gato). **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 69-77, 2007.

PEREIRA, S. A; FERREIRA, S. A. N. Superação da dormência em sementes de visgueirodo- igapó (*Parkia discolor*). **Acta amazônica,** Manaus, v. 40, n.1, p. 151-156, 2010.

REIS, M. V. et al. Cytochemical and Ultrastructural Analysis of Pro-Embryogenic Masses in *Tabebuia roseo-alba.* **Acta Horticulturae,** Georgia**,** v. 988, p. 179-186, 2013.

RIBEIRO, G. D. **Algumas espécies de plantas reunidas por famílias e suas propriedades,** Embrapa Rondônia, 2010. 179p.

ROCHA, P. S. G. et al. Efeito do ágar, vermiculita e sacarose no enraizamento do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 in vitro. **Cientifica Rural**, Santa Maria, v. 11, n.1, p. 54-59, 2006.

ROGALSKI, M. et al. Enraizamento in vitro de porta-enxertos de Prunus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 293-296, 2003.

ROY, A. et al. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.Br. (Asclepiadaceae**). African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, p. 2209-2211, 2008.

SAINI, S. et al. Auxin: a master regulator in plant root development. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 32, n. 6, p. 741-757, Apr. 2013.

SANTOS, B. R. et al. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 293-296, 2006.

SILVA, A. L. L. et al. Germinação *in vitro* de sementes e indução de calos em plântulas, cotilédones e anteras de porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Stand.) – Cucurbitaceae. **Journal of Biotechnology and Biodiversity,** v. 3, n. 4, p. 117-126, 2012.

SILVA, M. L. et al. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinata* Mast) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture,** Dordrecht, v. 99, n. 10, p. 47-54, 2009.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 2012.

SOARES, J. D. R. et al. Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 773-778, 2011.

SOUZA, V. A. B. Características físicas de frutos e amêndoas e características químico-nutricionais de amêndoas de acessos de sapucaia. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 946-952, 2008.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

VASCONCELOS, J.N.C. et al. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 592-597, 2012.

VIEITEZ, A. M. et al. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 135-145, 2009.

WERNER, E. T. et al. Controle da calogênese de pau-brasil in vitro. **Revista Arvore**, Vicosa, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal:** princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

YILDRIM, T.; KAYA, Z.; ISIK, K. Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. **Plant Cell Tiss Organ Culture,** Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 67-69, 2006.

YOU, X-L. et al. Rapid *in vitro* germination of zygotic embryos *via* endosperm removal in *Eleutherococcus senticosus*. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 75-80, 2005.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciaram que as sementes de sapucaia apresentam dormência tegumentar. O tratamento mais eficiente para superar esta dormência é a escarificação mecânica, obtendo maior taxa de emergência em menor tempo e formação de plântulas mais vigorosas. Contudo, a emergência foi baixa (60%), assim não se pode afirmar que a impermeabilidade do tegumento á água e ao oxigênio é a única causa de dormência nesta espécie.

Nesse sentido, são necessários estudos complementares para investigar outras causas associadas a dormência, como, presença de embriões fisiologicamente imaturos, presença de substâncias inibidoras da germinação e ou embrião dormente.

O estudo do estabelecimento *in vitro* de sementes de sapucaia é importante, visto que a germinação *ex vitro* foi baixa, e pelas sementes apresentarem dormência tegumentar. No entanto, a germinação *in vitro* das sementes de sapucaia sem tegumento foi muito baixa, sendo necessário novos estudos complementares com diferentes meios de cultura e reguladores de crescimentos. Além disso, as diferentes respostas morfogênicas obtidas no estabelecimento *in vitro* reforçam a necessidade de novos estudos, possibilitando avanços nas pesquisas para a propagação assexuada, como uma técnica alternativa a propagação seminífera.

Também foi investigada o potencial embriogênico *in vitro* da espéce em estudo. Embora não tenha sido evidenciado a indução de embriões somáticos durante o processo, as informações geradas representam grande importância, possibilitando avanços nas pesquisas para a propagação clonal em grande escala, redução dos custos com sementes e a produção de mudas assépticas.

Obteve-se sucesso no enraizamento *in vitro* dos explantes de sapucaia, em que as concentrações ultilizadas neste trabalho induziram a formação de raízes. Este processo de enraizamento *in vitro* é de suma importância para a sobrevivência das plantas, principalmente, para a aclimatização e transplantio para o campo, afim da multiplicação de mudas da espécie de *L. pisonis.*