



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

JOANA SILVA COSTA

**DEGRADAÇÃO DE RESERVAS BIOQUÍMICAS E HORMONAIIS DURANTE A
GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES IMATURAS E POLIAMINAS
ASSOCIADAS OU NÃO AO PICLORAM NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
Euterpe edulis MARTIUS**

JERÔNIMO MONTEIRO - ES

2023

JOANA SILVA COSTA

**DEGRADAÇÃO DE RESERVAS BIOQUÍMICAS E HORMONAIIS DURANTE A
GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES IMATURAS E POLIAMINAS
ASSOCIADAS OU NÃO AO PICLORAM NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE
Euterpe edulis MARTIUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.
Coorientadores: Prof. Dr. José Carlos Lopes e Dra. Tamyris de Mello.

JERÔNIMO MONTEIRO - ES
2023

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

C837d Costa, Joana Silva, 1997-
Degradação de reservas bioquímicas e hormonais durante a
germinação *in vitro* de sementes imaturas e poliaminas associadas
ou não ao picloram na embriogênese somática de *Euterpe*
edulis Martius / Joana Silva Costa. - 2023.
99 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.
Coorientadores: José Carlos Lopes, Tamyris de Mello.
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

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

CDU: 630

**DEGRADAÇÃO DE RESERVAS BIOQUÍMICAS E HORMONAIIS DURANTE A
GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES IMATURAS E POLIAMINAS
ASSOCIADAS OU NÃO AO PICLORAM NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
DE *EUTERPE EDULIS MARTIUS***

Joana Silva Costa

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2023.



Documento assinado digitalmente
HELOISA OLIVEIRA DOS SANTOS
Data: 28/02/2023 11:19:48-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof^a. Dr^a. Heloisa Oliveira dos Santos (Examinadora externa)
Universidade Federal de Lavras



Documento assinado digitalmente
ELIAS TERRA WERNER
Data: 28/02/2023 19:25:34-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Elias Terra Werner (Examinador externo)
Universidade Federal do Espírito Santo

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

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
RODRIGO SOBREIRA ALEXANDRE - SIAPE 1569540
Departamento de Ciências Florestais e da Madeira - DCFM/CCAIE
Em 28/02/2023 às 10:47

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/658609?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
EDILSON ROMAIS SCHMILDT - SIAPE 1172860
Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas - DCAB/CEUNES
Em 28/02/2023 às 21:09

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/659122?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por iluminar meu caminho e estar presente em todos os dias da minha vida, possibilitando minha chegada até aqui. Aos meus pais, meus grandes heróis, por disporem de todos os recursos possíveis para me manter durante todo esse caminho acadêmico.

A minha irmã por estar sempre comigo tornando toda a rotina menos exaustiva. E ao meu namorado por sempre me auxiliar, disponibilizar sua atenção e sua torcida para que eu conquiste todos meus objetivos.

Ao Professor Rodrigo meu orientador que durante toda essa caminhada não mediu esforços para me ajudar, repassando muito conhecimento, o que com certeza já me auxiliou a evoluir tanto no conceito acadêmico quanto pessoal.

A todos os colegas do laboratório, que estão sempre dispostos a ajudar e a dividir momentos proveitosos juntos. A Tamiris e a Débora que estiveram junto comigo durante toda a execução dessa pesquisa, me auxiliando, dividindo conhecimento, dedicando a mim muita atenção e carinho, e principalmente, sua amizade. E aos amigos da graduação que permaneceram comigo durante o mestrado Laís, Lara, Lucas, Millena e Lunalda.

Aos professores Adésio Ferreira, Edilson Romais Schmidt, Elias Terra Werner, José Carlos Lopes, Márcia Flores, Michel Picanço Oliveira e Wagner Campos Otoni por toda contribuição, disponibilidade, atenção, paciência e ensinamentos. Aos técnicos Gláucia, Luciano, Mayara, Ramon, Sônia, Tadeu (UFES), Daniela e Tatiane (UFV) pela disponibilidade e auxílio durante diversas análises da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio – Código de financiamento 001, e, concessão da bolsa de mestrado. E a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento da pesquisa.

De modo geral, agradeço a todos meus amigos do meio acadêmico ou não que me proporcionam os melhores momentos de lazer, que me apoiam, acreditam no meu potencial e me enchem de esperança para que eu consiga prosseguir a caminhada. Todos as pessoas lembradas aqui foram de extrema importância para execução dessa pesquisa, tanto no quesito emocional quanto profissional, sem vocês não seria possível continuar. Gratidão!

RESUMO

COSTA, Joana Silva. **Degradação de reservas bioquímicas e hormonais durante a germinação *in vitro* de sementes imaturas e poliaminas associadas ou não ao picloram na embriogênese somática de *Euterpe edulis* Martius**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre. Coorientadores: José Carlos Lopes e Tamyris de Mello.

Euterpe edulis Martius conhecida popularmente como juçara, pertence à família Arecaceae, é nativa da Floresta Atlântica, e, está inserida na Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção. Essa espécie é monocaule, possui propagação exclusiva por sementes, sementes recalcitrantes e germinação lenta, fatores que conduzem ao risco de extinção pelas características da fonte de propágulo e colheita do palmito, e, justificam a busca por métodos alternativos de propagação. Portanto, o conhecimento sobre as modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que essa espécie sofre ao longo do seu processo de germinação é muito importante, bem como a embriogênese somática que surge nesse cenário como uma opção viável, possibilitando a geração de inúmeras plantas a partir de apenas um explante. O capítulo 1 retrata a degradação de reservas de sementes de juçara ao longo da germinação (0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180 dias, após a germinação), em que, foram submetidas análises morfofisiológicas e bioquímicas. Observou-se nesse experimento que, enquanto a massa seca das sementes reduzia, houve acréscimo nas variáveis morfológicas das plântulas. Todas as reservas foram degradadas ao longo do período em análise, entretanto, as proteínas foram metabolizadas e consumidas antes dos carboidratos, amidos e lipídios, indicando a importância da primeira reserva citada na germinação e das subsequentes no crescimento das plântulas. Outras reservas como fibras e lignina estão intimamente relacionadas à aquisição de resistência mecânica pelas estruturas das plântulas. Ainda durante o período pós-germinação foram detectados os hormônios zeatina, ácido indolacético, e, ácido abscísico, que estão relacionados com o *start* da germinação, e, com efeitos inibitórios, a exemplo da zeatina sobre o ácido abscísico na regulação da dormência. Observou-se também o precursor

hormonal ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico igualmente relacionado com a germinação, as poliaminas (espermina, espermidina e putrescina), que estão ligadas com o desenvolvimento do embrião, e o aminoácido prolina que funciona como inibidor da germinação. Em síntese, o aumento dos valores médios da eficiência de uso de reservas que ocorre juntamente com o decréscimo na massa seca das sementes, afirmam que as reservas endospermicas são translocados para o eixo vegetativo, e promovem a germinação e o crescimento das plântulas de *E. edulis*. Além disso, a atrofia do haustório sinaliza o fim do período de degradação dessas reservas que é marcado pelo aumento significativo da umidade e redução da massa seca de sementes. O capítulo 2, retrata a indução e a maturação da embriogênese somática de segmentos de caulículo de *E. edulis*, cujos tratamentos foram as diferentes concentrações de espermina ou espermidina (0, 50, 100 e 150 μM) combinadas ou não com picloram (150 μM), sendo as poliaminas subdivididas em dois experimentos. A espermidina (150 μM) demonstrou o maior número de embriões somáticos, uma maior zona de formação de embriões, além de intensa formação procambial e meristemática, evidenciando a exigência dessa poliamina durante a histodiferenciação dos embriões somáticos de *E. edulis*. Por fim, tem-se que os embriões somáticos globulares (emblings) formados apresentaram desenvolvimento assíncrono, e, presença ou ausência de células basais do corpo globoso, assemelhando-se ao suspensor de embriões zigótico, o que remete a sua origem variável (uni ou multicelular).

Palavras-chave: juçara, endosperma, plântulas, segmentos de caulículo, histodiferenciação.

ABSTRACT

COSTA, Joana Silva. **Degradation of biochemical and hormonal reserves during *in vitro* germination of immature seeds and polyamines associated or not with picloram in the somatic embryogenesis of *Euterpe edulis* Martius.** 2023. Dissertation (Master in Forest Sciences) - Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Advisor: Rodrigo Sobreira Alexandre. Co-advisors: José Carlos Lopes and Tamyris de Mello.

Euterpe edulis Martius, popularly known as juçara, belongs to the Arecaceae family, is native to the Atlantic Forest, and is included in the Brazilian List of Endangered Species. This species is single-stemmed, has propagation exclusively by seeds, recalcitrant seeds and slow germination, factors that lead to the risk of extinction due to the characteristics of the source of propagule and palm heart harvest, and justify the search for alternative methods of propagation. Therefore, knowledge about the morphological, physiological and biochemical changes that this species undergoes throughout its germination process is very important, as well as somatic embryogenesis that appears in this scenario as a viable option, enabling the generation of numerous plants from just an explant. Chapter 1 portrays the degradation of juçara seed reserves during germination (0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180 days after germination), in which morphophysiological and biochemical analyzes were submitted. It was observed in this experiment that, while the dry mass of the seeds was reduced, there was an increase in the morphological variables of the seedlings. All reserves were degraded over the period under analysis, however, proteins were metabolized and consumed before carbohydrates, starches and lipids, indicating the importance of the first reserve cited in germination and subsequent ones in seedling growth. Other reserves such as fibers and lignin are closely related to the acquisition of mechanical strength by seedling structures. Even during the post-germination period, the hormones zeatin, indoleacetic acid, and abscisic acid were detected, which are related to the start of germination, and with inhibitory effects, such as zeatin on abscisic acid in the regulation of dormancy. It was also observed the hormonal precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, which is also related to germination, the polyamines (spermine, spermidine

and putrescine), which are linked to the development of the embryo, and the amino acid proline, which works as an inhibitor of germination. In summary, the increase in the average values of the efficiency of use of reserves that occurs together with the decrease in the dry mass of the seeds, affirm that the endospermic reserves are translocated to the vegetative axis, and promote the germination and the growth of the seedlings of *E. edulis*. In addition, haustorial atrophy signals the end of the degradation period of these reserves, which is marked by a significant increase in moisture and a reduction in seed dry mass. Chapter 2 depicts the induction and maturation of somatic embryogenesis of stem segments of *E. edulis*, whose treatments were different concentrations of spermine or spermidine (0, 50, 100 and 150 μM) combined or not with picloram (150 μM), and the polyamines were subdivided into two experiments. Spermidine (150 μM) showed the highest number of somatic embryos, a larger zone of embryo formation, in addition to intense procambial and meristematic formation, evidencing the requirement of this polyamine during the histodifferentiation of somatic embryos of *E. edulis*. Finally, the somatic globular embryos (emblings) formed presented asynchronous development, and the presence or absence of basal cells of the globose body, resembling the zygotic embryo suspensor, which refers to its variable origin (uni or multicellular).

Keywords: juçara, endosperm, seedlings, stem segments, histodifferentiation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 JUÇARA.....	18
3.2 DEGRADAÇÃO DE RESERVAS NAS SEMENTES	20
3.3 METABOLISMO DAS PRINCIPAIS RESERVAS BIOQUÍMICAS DAS SEMENTES.....	22
3.3.1 Carboidratos	22
3.3.2 Lipídios	23
3.3.3 Proteínas	24
3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	25
3.5 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>Euterpe</i>	27
3.6 MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS	31
3.7 REGULADORES DE CRESCIMENTO UTILIZADOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	32
3.7.1 Picloram	32
3.7.2 Poliaminas	33
4 REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO I	42
Degradação de reservas bioquímicas e hormonais em diferentes estádios da germinação <i>in vitro</i> de sementes imaturas de <i>Euterpe edulis</i> Martius..	42
1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Material vegetal	48
2.2 Germinação <i>in vitro</i>	48
2.3 Análises bioquímicas	50
2.4 Extrativos	52
2.5 Lignina solúvel, insolúvel e carboidratos estruturais	52
2.6 Hormônios	54
2.7 Delineamento experimental	55
3 RESULTADOS	56
4 DISCUSSÃO	63
5 CONCLUSÕES	68
6 REFERÊNCIAS.....	69
CAPÍTULO II	73
Histodiferenciação em embriões somáticos de <i>Euterpe edulis</i> Martius com o uso de poliaminas associadas ou não ao picloram	73
1 INTRODUÇÃO	75
2 MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1 Material vegetal	78
2.2 Germinação <i>in vitro</i>	78
2.3 Indução de calos	79
2.4 Indução e maturação de embriões somáticos	79
2.5 Análises histológicas	79
2.6 Delineamento experimental	80

3 RESULTADOS	81
3.1 Espermina	81
3.2 Espermidina	83
4 DISCUSSÃO	90
5 CONCLUSÕES	94
6 REFERÊNCIAS.....	95
CONCLUSÕES GERAIS	99

1 INTRODUÇÃO GERAL

Euterpe edulis Martius conhecida popularmente como juçara pertence à família Arecaceae. Essa espécie ocorre naturalmente em toda extensão da Floresta Atlântica, além, da Savana Brasileira, possui grande importância ecológica e valorização econômica. A importância ecológica da espécie *E. edulis* está relacionada com seus frutos, fonte de alimento para diversos frugívoros, aves e mamíferos. Já a valorização econômica é reflexo da qualidade acentuada do palmito proveniente dessa espécie, o que reverbera na intensa exploração desse produto nos locais de ocorrência natural (LEAL et al., 2021).

Os frutos da espécie *E. edulis* possuem características semelhantes aos de *Euterpe oleracea* Mart. (açai), sendo que esse último é um produto amplamente utilizado como fonte de nutrição humana, e, representa 20% dos produtos florestais não madeireiros comercializados no Brasil. Porém, apesar da proximidade entre esses frutos, os de juçara, vem se destacando como alimento, por demonstrarem benefícios antioxidantes ampliados. O destaque desses frutos no mercado consumidor pode auxiliar na redução da exploração do palmito, pois, agregando valor econômico ao fruto o desbaste da palmeira pode ser diminuído (BARROSO et al., 2018).

No entanto, a exploração demasiada do palmito juçara já acarretou a classificação dessa espécie como vulnerável no grupo das ameaçadas de extinção (BRASIL, 2022). Isso, porque essa palmeira, diferentemente, por exemplo, do *Euterpe oleracea* Mart. possui estipe única (monocaula) e a extração de seu palmito resulta na morte da planta (BRANCALION et al., 2012).

O risco de extinção atingido por algumas espécies pode ser atenuado utilizando técnicas de propagação vegetativa. Tais como estaquia, enxertia e o cultivo *in vitro*, essas buscam acelerar a produção de plantas, produzir plantações homogêneas que reduzam a exploração ilegal, e ainda conservar a base genética de espécies com grande importância ecológica e econômica (SILVA et al., 2021).

As técnicas de propagação vegetativa são utilizadas também para espécies que apresentam germinação lenta, assim como ocorre com a maioria dos representantes das palmeiras. Isso, porque, esses indivíduos apresentam mesocarpo composto por duas camadas (oleaginosa e fibrosa), e, embrião

imaturo, exigindo um maior período para que suas células se diferenciem durante a germinação (MULLETT; BEARDSELL; KING, 1981).

Além do risco de extinção e do processo germinativo vagaroso identificado para a *E. edulis*, outros fatores também justificam a busca por métodos alternativos de propagação para essa espécie. Um deles está relacionado com a propagação exclusiva dessa espécie por sementes, sendo essas normalmente produzidas anualmente. Outro fator é representado pela dificultada colheita de sementes dessa espécie, assim como em outros indivíduos florestais, devido à altura dessa palmeira (até 20 m) (SCHULZ et al., 2016). Tem-se também a recalitrância dessas sementes (GATTI et al., 2008) e a alta mortalidade de mudas durante os primeiros anos de produção (FANTINI; GURIES, 2007) como fatores influenciadores nessa procura por soluções de propagação.

O cultivo *in vitro* surge nesse cenário como método alternativo para a propagação de espécies que apresentem algumas ou todas as características dispostas anteriormente. De forma específica o cultivo *in vitro* remete à diferentes técnicas de propagação vegetativa, como organogênese e embriogênese somática (ADIL; JEONG, 2018). O crescente uso desses métodos está ligado com a capacidade dessas técnicas de gerarem inúmeras plantas a partir de apenas um explante e ainda reduzirem os índices de contaminação nas populações (MASMOUDI-ALLOUCHE; KRIAA; DRIRA, 2019).

A embriogênese somática é uma técnica do cultivo *in vitro* que induz o desenvolvimento de embriões a partir de células vegetativas, as quais são formadas sem a fusão gamética. Esse procedimento é considerado o tema mais explorado quando o assunto é regeneração de plantas (FEHÉR, 2015). A efetividade dessa técnica só é possível devido a totipotencialidade das células vegetais. No entanto, o sucesso da embriogênese somática resulta também da combinação adequada de alguns fatores principais: tipos de explantes, meio de cultura, genótipo e adequada aplicação de reguladores de crescimento (RC) (FREITAS et al., 2016).

Os RC desempenham funções essenciais para a embriogênese somática, induzem a formação de calos e embriões e a maturação de embriões, isso, porque cada espécie requer uma constituição química endógena e exógena para ser conduzida e regenerada *in vitro* (DAR et al., 2021). Com isso, subtende-se que distintos são os reagentes utilizados na embriogênese somática, as classes

mais comercializadas são os hormônios, a exemplo das poliaminas, e, os polímeros (REIS et al., 2016).

O picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) (PIC) é um regulador de crescimento com ação similar a auxina, que é um hormônio vegetal de extrema importância para a embriogênese somática de diferentes espécies do gênero *Euterpe* (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016; FERREIRA et al., 2022; MELLO, 2022; OLIVEIRA et al., 2022), pois, possui ação regulatória no ciclo e na diferenciação celular. Essa molécula interage com o conteúdo endógeno da célula promovendo alterações metabólicas, como por exemplo, modificações na plasticidade e proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2022).

As poliaminas, um outro grupo de hormônios vegetais, possuem como representantes mais comuns espermina, espermidina e putrescina. Essas moléculas são compostas por grupos amino e estão relacionadas com diversos processos fisiológicos das células, como germinação e maturação embriogênica. Isso porque as poliaminas também interagem com o conteúdo endógeno da célula (ácidos nucleicos, fosfolípidios, além de outros hormônios vegetais), estimulando os processos embriogênicos (DOMÍNGUEZ et al., 2022).

Compreender a dinâmica da embriogênese somática de *E. edulis* é muito importante, para possibilitar a multiplicação em larga escala, num curto espaço de tempo, e, assim acelerar programas de melhoramento genético. Entretanto, informar-se sobre o padrão de germinação dessa espécie no decorrer do tempo é o passo inicial para entender qualquer método de propagação, pois, ao longo desse processo ocorrem modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que podem afetar a formação e o crescimento de plântulas (MELLO et al., 2021), as quais podem ser utilizadas como fonte de explantes para a propagação.

As alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas ocorridas nas sementes e plântulas estão relacionadas com o processo de degradação de reservas iniciado nas palmeiras, principalmente, pelas enzimas. Depois da indução enzimática as células vivas das sementes continuam o processo de metabolização das diferentes reservas, lipídios, proteínas, carboidratos, fenóis e outros. Após a degradação dessas moléculas os subprodutos podem ser translocados para o eixo vegetativo a partir do haustório (DIAS et al., 2020). Sementes de palmeiras possuem endosperma constituído por proteínas,

açúcares, fibras, ácido graxos poli-insaturados, ácido oleico, lipídios insaturados, e, compostos fenólicos (antocianinas), moléculas que conferem grande valor nutricional, e, possivelmente, importância econômica ao fruto (SCHULZ et al., 2016).

Diante da importância ecológica e da possível valoração econômica da *E. edulis*, da ameaça de extinção e da dificuldade de propagação dessa espécie, justifica-se o aprofundamento em pesquisas sobre a degradação de reservas após a germinação, e, a busca por uma metodologia adequada de aplicação da técnica de embriogênese somática para os representantes dessa espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar o processo germinativo e a formação de plântulas da espécie *Euterpe edulis* para assim compreender seu padrão de degradação de reservas pós-germinação, e, alinhado a isso buscar protocolos de embriogênese somática eficientes para propagação dessa palmeira.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar a degradação de reservas durante o período pós-germinação das sementes de *E. edulis* e verificar seus efeitos morfofisiológicos na germinação e formação de plântulas dessa espécie.
- Analisar a formação dos perfis hormonais, no decorrer do período pós-germinação das sementes de *E. edulis*.
- Detalhar o processo de degradação de reservas após a germinação de sementes de *E. edulis*, por meio de imagens microscópicas.
- Averiguar a responsividade dos tecidos à poliaminas e definir as concentrações adequadas à histodiferenciação de embriões somáticos de *E. edulis* aliado ou não ao picloram.
- Analisar a qualidade histológica dos embriões somáticos originados a partir das diferentes concentrações das poliaminas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 JUÇARA

A família Arecaceae compreende cerca de 2600 espécies e 240 gêneros e é representada pelos indivíduos conhecidos popularmente como palmeiras. O gênero *Euterpe* pertence a essa família e possui 28 espécies, distribuídas principalmente em regiões de florestas tropicais. No Brasil foram encontrados os seguintes representantes de *Euterpe*: *E. edulis* Martius, *E. oleracea* Martius, *E. precatoria* Martius, *E. catinga* Wallace, *E. longibracteata* Barbosa Rodrigues, e, *E. espiritosantensis* Fernandes, porém, os três primeiros são encontrados mais frequentemente (SCHULZ et al., 2016).

E. edulis denominada na linguagem coloquial de juçara, é nativa da Floresta Atlântica, e mais comumente encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil (GARCIA et al., 2019). Essa espécie ocorre a nível do mar até uma altitude de 1000 m, adaptando-se a diferentes condições climáticas. Tem-se ainda que a juçara possui altura de até 20 m e diâmetro de 10-15 cm (SCHULZ et al., 2016).

Essa espécie possui ciclo anual de floração e frutificação, sendo que a primeira fase citada ocorre no início do período chuvoso, e, a segunda permanece por períodos mais extensos de até seis meses (LEAL et al., 2021), normalmente de março a junho (SCHULZ et al., 2016). Essa espécie produz de uma a cinco inflorescências, sendo essas do tipo panícula, cada uma pode conter até 3000 frutos, os quais são carnosos do tipo drupa, e, apresentam ampla variação diametral (LEAL et al., 2021).

Ainda sobre os frutos de juçara tem-se que eles contém apenas uma semente e quando maduros apresentam coloração escura de tom roxo, semelhante, aos frutos de *E. oleracea* e *E. precatoria*. Essas estruturas estão sendo amplamente estudadas, pois, apresentam características superiores às encontradas para os outros precursores do sorvete de açaí, como seu conhecido valor nutricional, poder antioxidativo, e paladar mais adocicado (GARCIA et al., 2019).

Sobre as sementes de *E. edulis* tem-se que essas são compostas por um pequeno embrião e um endosperma abundante (MELLO et al., 2021), e, são recalcitrantes (GATTI et al., 2008), não suportam a dessecação do embrião a baixos conteúdos de água e exposição a baixas temperaturas. Além disso, essas

sementes apresentam baixa taxa de germinação e crescimento de plântulas (BOVI; CARDOSO, 1975).

A palmeira em estudo possui iminente potencial econômico se propagada vegetativamente de forma eficiente. O potencial econômico está relacionado com a doçura de seu palmito e a qualidade de seus frutos. Esse palmito é o segundo produto não madeireiro que foi mais exportado da Floresta Atlântica, o que evidencia a intensa exploração sofrida por essa espécie, considerando que a extração desse palmito acarreta a morte da planta. Logo, essa exploração reflete na degradação do meio ambiente (BARROSO et al., 2018).

Os frutos de juçara, por sua vez, estão sendo mais utilizados na produção de polpas desejáveis pelo mercado consumidor. Essa outra finalidade atribuída aos representantes de *E. edulis* vem sendo utilizada para aliviar a exploração dessa espécie (BARROSO et al., 2018). Isso, porque os frutos apresentam uma fonte de manejo sustentável que pode gerar lucros duradouros para os produtores (MELLO et al., 2021).

A aceitação dos frutos de juçara no mercado consumidor está relacionada com sua composição e seus efeitos benéficos para saúde humana. Em relação a composição tem-se que esses frutos são repletos de compostos fenólicos, principalmente, de antocianinas. Além disso, eles apresentam elevada proporção de fibras, e, ácidos graxos mono e poli-insaturados (SILVA et al., 2021).

A presença de compostos fenólicos, fibras e ácidos graxos no fruto de *E. edulis* reflete nos benefícios gerados por esse alimento na saúde humana. Os compostos fenólicos possuem capacidade antioxidante que auxiliam no tratamento de doenças neurológicas e cancerianas, e, ainda podem atuar na busca incansável pelo antienvelhecimento (JIANG et al., 2021). As fibras, por sua vez, influenciam, por exemplo, na sensação de saciedade e na redução do açúcar no sangue (SABOO et al., 2022). E os ácidos graxos estão principalmente relacionados com a regulação do sistema imunológico humano (ROOPASHREE; SHETTY; KUMARI, 2021).

A composição dos frutos descrita anteriormente está sujeita a alterações devido as constantes modificações bioquímicas ocorridas nessa estrutura durante seu processo de amadurecimento (SCHULZ et al., 2021). Essas variações também podem acontecer com as sementes, isso, porque após a

maturidade, a atividade metabólica das sementes é maximizada e acarreta a degradação de suas reservas (EBONE; CAVERZAN; CHAVARRIA, 2019), que possivelmente serão destinadas ao eixo vegetativo para formação das plântulas.

3.2 DEGRADAÇÃO DE RESERVAS NAS SEMENTES

Para discorrer sobre degradação, inicialmente, é necessário exemplificar a mobilização de reservas. Com isso, torna-se imprescindível destacar alguns pontos, um deles é que o armazenamento de reservas nas sementes possui extrema importância na manutenção da sobrevivência dessas estruturas, após o processo de maturação. E o outro está relacionado com o fato da viabilidade econômica das sementes, estar intimamente ligado com as substâncias armazenadas nelas (DIAS et al., 2020).

De forma geral, tem-se que carboidratos, lipídios e proteínas são as principais reservas das sementes, sabe-se também que a mobilização dessas reservas ocorre até que as sementes se tornem autótrofas (SIDDIQUI; SAMI; HAYAT, 2020). Em sementes de palmeiras tem-se dois tecidos de reserva os cotilédones e o endosperma. Nos cotilédones são armazenadas substâncias limitadas como corpos lipídicos e cristais globoides fechados. Já no endosperma existe uma gama superior de reservas, entretanto, o destaque é disposto sobre as proteínas, os lipídios, e, as hemiceluloses (MELLO et al., 2021).

As hemiceluloses nas palmeiras são representadas pelo oligossacarídeo galactomanano, mais especificamente as mananas. Essas são responsáveis por conferir dureza aos tecidos vegetais, devido a insolubilidade dos galactomananos, quando a razão manose:galactose é acima de 4, denominados mananos puros (pouco ramificados), a exemplo de espécies da família Palmae e Rubiaceae (BUCKERIDGE et al., 2004), e, servir de reserva para o embrião durante seu desenvolvimento. É importante salientar que esses compostos são degradados lentamente, no decorrer do desenvolvimento embrionário, o que está intimamente relacionado com o longo período de germinação requerido por palmeiras (BUCKERIDGE, 2010).

Sementes de palmeiras são excelentes para exemplificar o processo de mobilização e degradação dessas reservas, isso porque essas possuem endosperma abundante, uma variedade de compostos armazenados e desenvolvem um haustório altamente especializado. Entretanto, reduzidos são

os estudos que abordam a mobilização e a degradação de reservas das sementes recalcitrantes (DIAS et al., 2018), como é o caso da *Euterpe edulis*.

A mobilização de reservas em sementes ortodoxas e intermediárias é induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs). É importante evidenciar que o processo de degradação de reservas também se inicia após essa indução provocada pelas EROs. Tem-se que a principal fonte de reserva que começa ser degradada são os lipídios. Porém, esse processo pode diferir-se para sementes recalcitrantes, por diversos fatores, sendo talvez o principal as estratégias adaptativas desenvolvidas por essas espécies para colonizarem ambientes úmidos (DIAS et al., 2020).

Sobre o processo de mobilização de reservas em *E. edulis*, Mello et al. (2021) descreveram que com o aumento das variáveis morfológicas após a maturação das sementes, se encontra ampliado também as concentrações de lipídios e fibras, enquanto fenóis, açúcares solúveis, proteínas e amido apresentam-se com baixa expressão.

Em *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae), espécie que possui semente recalcitrante, o processo de degradação de reservas, inicia-se após a germinação e resulta na formação da zona de digestão, sendo que todo o processo é controlado pelas células do endosperma (DIAS et al., 2020). Esses autores salientaram também que o processo de degradação nessa espécie é compreendido dentro de três fases, sendo estas: 1) mobilização do conteúdo vacuolar por fluxo simplástico; 2) aumento do vacúolo, pressão de turgescência, direcionando o conteúdo do citoplasma para a parede celular; e 3) degradação das paredes celulares.

De maneira geral, é conhecido que a degradação de reservas em espécies da família Arecaceae, é realizada principalmente por enzimas. A principal enzima envolvida nesse processo é a endo- β -mananase. Sendo importante salientar que a ativação dessas enzimas é induzida por sinais emitidos pelo próprio embrião (DIAS et al., 2018).

Diante disso, tem-se que o processo de degradação de reservas da espécie *E. edulis* é complementar ao seu processo de mobilização de reservas. Além disso, sabe-se que compreender esse processo é de suma importância para deter pleno conhecimento sobre os aspectos fisiológicos da formação de plântulas (DIAS et al., 2020).

3.3 METABOLISMO DAS PRINCIPAIS RESERVAS BIOQUÍMICAS DAS SEMENTES

3.3.1 Carboidratos

Os carboidratos são biomoléculas formadas por carbono, hidrogênio e oxigênio, classificadas em mono, di ou polissacarídeos, de acordo com o número de átomos de carbono que apresentam em sua constituição. Como exemplo dos monossacarídeos cita-se glicose, frutose e galactose, já dentro dos dissacarídeos os mais comuns são sacarose, maltose e lactose, e, entre os polissacarídeos, presentes nos vegetais, salienta-se o amido e a celulose (ANJUM et al., 2023). Essas biomoléculas são a principal fonte de energia para as células vegetais (AGUIRRE et al., 2018).

O transporte de carboidratos nos vegetais das regiões autótrofas para as heterótrofas é realizado, principalmente, pela sacarose, pois, esse dissacarídeo é a forma mais móvel dos carboidratos nas plantas. Essa biomolécula está relacionado com diferentes vias metabólicas, que possuem como produtos finais a geração de energia ou a formação de polímeros de reserva como o amido (SALMERON-SANTIAGO et al., 2022).

Para a geração de energia a sacarose é clivada em moléculas menores (glicose e frutose) com auxílio da sacarose sintase (SALMERON-SANTIAGO et al., 2022). Nesse processo esse dissacarídeo é moldado para entrar na via glicolítica. Em tal via, além da liberação de energia, ocorre a formação de piruvato que é convertido, posteriormente, em Acetil-CoA, com intuito de iniciar o ciclo do ácido cítrico e gerar mais energia para as células. Em sementes oleaginosas as etapas de descarboxilação do ciclo do ácido cítrico são contornadas para favorecer a síntese dos carboidratos, esse desvio é realizado pelo ciclo do glioxilato (AUGER et al., 2021).

A principal forma de estocar carboidratos nas plantas são os amidos. E o processo de degradação desse polissacarídeo necessita da acidificação do endosperma. Para acidificar o sistema endospermico são necessários ácidos orgânicos formados durante processos metabólicos oxidativos como o ciclo do ácido cítrico e o glioxilato (MA et al., 2016).

Por fim, em geral os carboidratos são a segunda reserva a ser remobilizada e quebrada durante a germinação das sementes. Sendo importante evidenciar que cada espécie possui predominância de alguma classe de

carboidratos, nas sementes de *Elaeis guineensis* Jacq., por exemplo, os carboidratos de reserva são, principalmente, representados pelos mananos insolúveis (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020).

3.3.2 Lipídios

Os lipídios são moléculas orgânicas formadas a partir da associação entre ácidos graxos e glicerol. Essas moléculas podem ser classificadas em cadeia curta, média, longa e muito longa, de acordo com o comprimento da cadeia de ácidos graxos. Tais moléculas estão presentes em diferentes teores dentro das mesmas estruturas de espécies distintas (RESZCZYŃSKA; HANAKA, 2020).

Considerando espécies oleaginosas, tem-se que os lipídios armazenados em suas sementes não podem ser utilizados diretamente para fornecer energia para as células (WU et al., 2020), sendo necessário, primeiramente, converter essa reserva numa forma mais móvel de carbono (sacarose). Essa conversão é realizada com auxílio do ciclo do glioxilato, ciclo do ácido cítrico e da glicogênese (FARAONI et al., 2019).

Para efetivar essa conversão, inicialmente, os ácidos graxos são beta-oxidados e produzem um pool de Acetil-CoA, o qual é convertido em succinato pelo ciclo do glioxilato. O succinato como intermediário do ciclo do ácido cítrico gera malato, que é convertido em oxaloacetato, e, posteriormente, em fosfoenolpiruvato, o qual funciona como substrato para a glicogênese, onde efetivamente será gerada a sacarose. Duas das principais enzimas do ciclo do glioxilato são isocitrato liase e malato sintase (FARAONI et al., 2019).

Sendo assim, compreende-se que as sementes oleaginosas mobilizam lipídios de armazenamento como fonte de carboidratos (FEUSSNER; KÜHN; WASTERACK, 2001). O que explica o fato dessa molécula ser a última a ser degradada dentro das três principais reservas encontradas nas sementes, proteínas, carboidratos e lipídios (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020). Diante disso, nota-se que é possível ocorrer um aumento no teor de lipídios durante o período pós-germinação das sementes oleaginosas, antes do seu expressivo decaimento ser perceptível.

3.3.3 Proteínas

As proteínas são formadas por determinada sequência de aminoácidos, sendo esses unidos por ligação peptídica. Essas macromoléculas desempenham funções distintas, tal como enzimáticas, estruturais e de armazenamento. Como exemplo, de proteínas enzimáticas tem-se a amilase, já para estruturais pode-se citar a queratina, e, de armazenamento dispõe-se da albumina (RASHEED et al., 2020). Entretanto, nas sementes estão presentes quatro classes de proteínas de armazenamento: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (GHANGHAS et al., 2022).

É importante salientar que as proteínas em geral são remobilizadas nas sementes antes dos carboidratos e lipídios. Isso pode estar relacionado com o fato dessa macromolécula exigir menos processos para ser clivada, diferentemente, dos carboidratos e lipídios, que exigem, por exemplo, o funcionamento correto de dois ciclos metabólicos, ciclo do ácido cítrico e do glioxilato (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020).

A degradação das proteínas é facilitada, pois, o próprio endosperma produz proteases, as quais são utilizadas para catalisar a hidrólise proteica. É importante mencionar que o desencadeamento desse processo é reflexo de um sinal emitido pelo haustório da semente, e, que os aminoácidos gerados são translocados diretamente para as plântulas, por essa mesma estrutura, sem entraves (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020).

Confirmando o exposto, tem-se que em sementes de *E. guineensis*, por exemplo, as proteínas são quebradas anteriormente, aos carboidratos e lipídios, que seguem, por sua vez essa respectiva ordem de degradação, além disso, nessa espécie as principais proteínas encontradas são albuminas e globulinas (CUI; LAMADE; TCHERKEZ, 2020).

Diante disso, acredita-se que outras sementes de palmeiras possam apresentar esse mesmo padrão de degradação de reservas bioquímicas relatado no decorrer do exposto. Além disso, espera-se que o conhecimento desse modelo de degradação seja utilizado para assistir o amadurecimento de novas técnicas de propagação, considerando, a espécie *E. edulis*.

3.4 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática é uma técnica do cultivo *in vitro* que consiste na transição de células somáticas indiferenciadas em células embriogênicas, e, posteriormente em plântulas normais (KONG et al., 2020), mecanismo esse que se assemelha à embriogênese zigótica, originando embriões completos (ZENG et al., 2007). Essa técnica expõe-se de forma indireta ou direta, apresentando ou não a formação de calos, respectivamente (FREITAS et al., 2016).

As células somáticas, mencionadas anteriormente, são representadas por diferentes explantes, que possuem capacidade de regenerar-se em novas plantas, como, por exemplo, folhas inteiras, segmentos de caule e pontas de broto (HANH et al., 2022). Na família *Arecaceae* os tipos de explantes mais utilizados são: embriões zigóticos, inflorescências, ápices caulinares e bainhas foliares (OLIVEIRA et al., 2022).

A capacidade de regeneração, retratada anteriormente, está presente nas células vegetais e relaciona-se com o conceito de totipotência. Células somáticas vegetais são totipotentes, possuem aptidão para diferenciar-se e regenerar novos, tecidos, órgãos ou até um sistema completo. Além disso, essas mesmas células podem desdiferenciar-se e recuperar a capacidade de totipotencialidade que é perdida com aquisição de competência pelo tecido (FEHÉR, 2015).

A totipotencialidade torna possível a aplicação da técnica de embriogênese somática (ZENG et al., 2007). A qual vem sendo muito utilizada, pois, é capaz de acelerar programas de melhoramento (KONG et al., 2020), além, de promover hibridização somática e variação somaclonal no campo genético (ZENG et al., 2007). Não obstante a isso essa técnica demonstra eficácia também em multiplicar genótipos de interesse (FREITAS et al., 2016), e, em produzir muitos embriões em um reduzido espaço de tempo (OLIVEIRA et al., 2022).

Tendo em vista seus inúmeros benefícios a técnica da embriogênese somática vem sendo mais reconhecida atualmente. Vastos são os estudos que trabalham com essa temática, por exemplo, Hanh et al. (2022) demonstraram em seus estudos com *Actinidia chinensis* Planch. que a técnica de embriogênese somática é eficaz para essa espécie considerando explantes de nervura principal e de pecíolo. Zdravković-Korać et al. (2019) também evidenciariam a eficácia da embriogênese somática, dessa vez para a propagação clonal e a recuperação

de plantas transgênicas de *Aesculus flava* Sol. utilizando como fonte de explante filamentos de estames.

Não obstante aos benefícios, para o discorrer da técnica de embriogênese somática é necessário disponibilizar condições e combinações adequadas para que esse modelo de propagação seja desenvolvido com êxito. Essas condições e combinações estão atreladas as seguintes variáveis, tipo de explante, meio de cultura, genótipo (FREITAS et al., 2016), reguladores de crescimento, fotoperíodo e luminosidade (HANH et al., 2022).

Ainda sobre a embriogênese somática é importante evidenciar as fases nas quais essa técnica transita antes de alcançar o objetivo final. Inicialmente, induz-se a proliferação de células embriogênicas. Após essa fase o objetivo é a maturação de embriões somáticos, onde esses embriões histodiferenciam de acordo com sua classificação em mono ou eudicotiledôneas. Depois da histodiferenciação o propósito final é a regeneração das plantas. Sobre os calos gerados na etapa de indução, tem-se que é preferível que eles sejam friáveis. Isso, porque nesse caso é mais descomplicado atingir a separação celular requerida para a mudança de fase (KONG et al., 2020).

Com base no exposto, nota-se que a embriogênese somática pode ser utilizada na propagação de diferentes espécies, desde que realizado de maneira adequada. Entretanto, ela é recomendada para espécies que apresentam baixa porcentagem de germinação, além de desuniformidade e lentidão no processo (MULLETT; BEARDSELL; KING, 1981). Além disso, essa técnica é recomendada também para espécies em que a propagação seja exclusiva por sementes e a colheita seja dificultada (SCHULZ et al., 2016).

Com isso, afirma-se a utilização da embriogênese somática como técnica de propagação para os representantes da família *Arecaceae*. Pois, além de apresentarem algumas das características mencionadas acima como porte alto e desuniformidade de germinação (SCHULZ et al., 2016), os representantes dessa espécie não possuem câmbio vascular o que impede a seleção de genótipos elite por meio de clonagem, tornando-a a embriogênese somática uma alternativa viável para esse propósito (OLIVEIRA et al., 2022).

3.5 EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Euterpe*

O gênero *Euterpe* pertencente à família Arecaceae, possui 28 espécies, sendo que apenas três de seus representantes estão sendo cotados em pesquisas quando a temática é embriogênese somática. Esses são: *Euterpe oleracea*, *Euterpe precatoria* e *Euterpe edulis*. Scherwinski-Pereira et al. (2012) foram os primeiros a retratarem a propagação de *E. oleracea* por meio da embriogênese somática, considerando como fonte de explante embriões zigóticos imaturos. Na fase de indução, formou-se calos embriogênicos, utilizando meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinocarboxílico). É importante evidenciar que a concentração e o tipo de auxina influenciaram na frequência embriogênica e que a melhor concentração de picloram foi 225 μM , a qual refletiu numa frequência de 72% em calos embriogênicos. A maturação dos embriões somáticos nessa pesquisa foi realizada em meio MS modificado com 12,30 μM de 2-isopenteniladenina (2iP) e 0,537 μM de ácido naftalenoacético (ANA) e ocorreu de forma assíncrona. E a formação de plântulas foi efetivada em meio MS meia força suplementado com macro e micronutrientes, 20 g L⁻¹ de sacarose e 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, e, gelificado com 2,5 g L⁻¹ de fitagel.

Já em 2016, a eficácia da embriogênese somática para a espécie *E. oleracea* foi novamente testada considerando dessa vez embriões maduros e imaturos como explantes. Nessa pesquisa utilizaram como meio de indução de calos embriogênicos MS suplementado com 30 g L⁻¹ sacarose, 2,5 g L⁻¹ fitagel, 2,5 g L⁻¹ carvão ativado, 0,5 g L⁻¹ L-glutamina, acrescidos de picloram, sendo a concentração mais eficiente a de 450 μM (84,7%). O meio de maturação utilizado nesse estudo foi composto por 12,3 μM de 2iP, 0,6 μM de ANA e 300 mg L⁻¹ de carvão ativado, e, 100% dos calos resultaram em embriões somáticos. Na fase de regeneração de plântulas utilizou-se 1,0 μM N⁶-benzilaminopurina (BAP) e 0,5 μM ácido giberélico (GA₃), e, a maior porcentagem de regeneração (58,7%) foi obtida para embriões somáticos provindos de embriões imaturos e induzidos com 450 μM de picloram (FREITAS et al., 2016).

Esse modelo de propagação é eficaz para *E. oleracea* quando se utiliza como fonte de explantes embriões zigóticos maduros, obtidos em meio de cultura primário MS, suplementado com 2,4-D (339,36 μM), e, submete-se esses

embriões a um meio de cultura secundário MS na presença de ANA (0,537 μM) e 2iP (12,30 μM). Além de obter-se embriões somáticos de *E. oleracea* a partir dessa metodologia, alcançou-se também a formação de plântulas após 210 dias em meio contendo metade da concentração normal de sais e sacaroses e sem adição de reguladores de crescimento (LEDO et al., 2002).

Em *E. precatoria*, a embriogênese somática é eficaz, considerando embriões zigóticos maduros como explantes. A fase de indução nessa pesquisa foi realizada em meio MS ou Y3 (EEUWENS, 1976) suplementado com 2,4-D ou picloram, sendo que o tipo de meio e a concentração de picloram influenciaram na formação dos calos embriogênicos, as concentrações superiores foram 13,57 e 20,36 μM . Nesse experimento utilizou-se também uma fase de multiplicação, em meio com baixa concentração (4,14 μM) de auxinas (2,4-D ou PIC), associado à 2,46 μM de 2iP. A maturação dos embriões foi realizada em meio Y3 $\frac{1}{2}$ força suplementado com 0,54 μM de ANA e 12,3 μM de PIC. A regeneração de plantas no final do processo validou a metodologia demonstrando sobrevivência de 92,3% na etapa de aclimatização (FERREIRA et al., 2022).

Já para *E. edulis*, o primeiro estudo encontrado foi desenvolvido por Guerra e Handro (1988), onde a embriogênese somática ocorre de forma direta em meio basal composto por sais MS e vitaminas Morel e Wetmore (1951), acrescido de carvão ativado e 2,4-D em concentrações superiores a 50 mg L^{-1} . A formação dos embriões somáticos ocorre de 45-180 dias após o início das culturas. Os embriões somáticos originados formam plântulas quando submetidos as seguintes concentrações de reguladores 5 mg L^{-1} de 2iP e 0,5 mg L^{-1} de ANA, ou até mesmo na ausência desses hormônios.

Na continuidade dos estudos de embriogênese somática com *E. edulis*, Guerra e Handro (1991), utilizando embriões imaturos e maduros, submetidos a diferentes combinações de sais, fontes de nitrogênio e reguladores de crescimento concluíram que embriões imaturos apresentam maior potencial embriogênico que os maduros, evidenciaram também a necessidade de inserir carvão ativo (CA) no meio, e, cultivar em ambiente escuro para evitar oxidação do explante. Além disso, nessa pesquisa descreveu-se o uso de 2,4-D (50 mg L^{-1}) como sendo a melhor condição para o desenvolvimento de culturas embriogênicas dessa espécie, e, que a transferência dos embriões somáticos

gerados para meios sem adição de reguladores de crescimento resulta na formação de plântulas.

A embriogênese somática da espécie *E. edulis* foi testada também utilizando como explantes embriões zigóticos, inflorescências e folhas jovens. Nessa pesquisa os autores reafirmam a necessidade de utilizar-se antioxidantes no meio como o carvão ativo para o estabelecimento de culturas viáveis. A fase de indução nesse estudo, ocorreu de forma direta, e, foi realizada em meio MS ou sais de Ewens suplementados com 2,4-D (50-100 mg L⁻¹). A maturação dos embriões somáticos foi realizada em meio acrescido de 2-iP (2,5 mg L⁻¹) e ANA (0,1 mg L⁻¹). E a formação das plântulas foi realizada em meio ½ força e açúcares e sem a presença de reguladores de crescimento. É importante salientar que os resultados obtidos foram semelhantes para os diferentes explantes utilizados (GUERRA; HANDRO, 1998).

Outros estudiosos deram continuidade à pesquisa com a embriogênese somática em representantes da espécie *E. edulis*, em que utilizaram como fonte de explantes embriões zigóticos e bainhas de folhas. Tal pesquisa demonstrou resultados diferentes das anteriores para a mesma espécie, pois, sua indução foi classificada como indireta, demonstrando assim a formação de calos. Na presença de embriões zigóticos como explantes o melhor tratamento foi obtido em meio suplementado com 40 mg L⁻¹ de 2,4-D e 30 g L⁻¹ de sacarose. Já para as bainhas de folhas a maior porcentagem de calos foi obtida em meio MS suplementado com 1,17 g L⁻¹ de glutamina e 66,3 mg L⁻¹ de 2,4-D (SALDANHA et al., 2006).

Considerando ainda a espécie *E. edulis* fica evidente em outro estudo que embriões zigóticos imaturos formam embriões somáticos em meio MS completo ou meia força (MS ou MS/2) combinado com sacarose (20, 30 e 40 g L⁻¹). O tipo de meio e as concentrações de sacarose não afetam a formação de embriões somáticos, apenas interferem na altura e na massa fresca das plântulas formadas. Tem-se ainda que nesse estudo foram testadas diferentes concentrações de cloreto de cálcio (0, 2, 4, 8 e 12 mM) na indução da embriogênese somática, e, notou-se que tal etapa não foi afetada por essa substância, porém, o número de embriões somáticos produzido foi alterado (SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012).

Recentemente, outros autores, evidenciaram em seu estudo com *E. edulis* que a embriogênese somática nessa espécie é eficaz quando utiliza-se embriões zigóticos como fonte de explante, e, 2,4-D (159,42 μM) e PIC (300 μM) na indução, sendo que esses reguladores auxiliaram na formação de 44,33 e 76,33% de embriões, respectivamente. A maturação é ampliada nessa pesquisa quando é acrescido ao meio 2iP (12,3 μM), ANA (0,6 μM) e CA (0,3 g L⁻¹). E a regeneração de plantas é favorecida em meio suplementado com BAP (1 μM) e GA₃ (0,5 μM), pois, nesse cenário ocorre a protrusão da raiz primária e a emergência da parte aérea (OLIVEIRA et al., 2022).

Ainda considerando a embriogênese somática de *E. edulis*, Mello (2022) concluiu que o uso de 2,4-D não é recomendado considerando como fonte de explante embriões zigóticos. Entretanto, outras moléculas auxínicas como o picloram (150 μM), e, o triclopyr (100 μM), são eficazes para essa espécie. Os embriões somáticos provenientes da indução com triclopyr multiplicam cinco vezes mais em meio de pré-maturação (meio basal). A maturação e a germinação destes embriões somáticos foi máxima quando se utilizou 5 μM de ácido abscísico (ABA). Neste mesmo estudo utilizando caulículos como fonte de explante, verificou-se a ocorrência de embriogênese somática direta em *E. edulis* utilizando PIC (150 μM). E que a combinação entre ANA (0,53 μM) + 2iP (12,3 μM) durante a maturação resulta em maior número de embriões somáticos (\cong 19 por explante).

Dado o exposto, tem-se que os produtos mais utilizados para estimular a indução de embriões somáticos em indivíduos do gênero *Euterpe* são 2,4-D e PIC, sendo que o PIC demonstra maior eficiência (MELLO, 2022; OLIVEIRA et al., 2022). Já para a fase de maturação os RC mais utilizados são ANA e 2iP. E para formação de plântulas os pesquisadores vem utilizando BAP, GA₃ e até mesmo meio sem suplementação de RC.

Diante dos resultados apresentados é possível observar a viabilidade de aplicar-se a técnica da embriogênese somática em indivíduos do gênero *Euterpe*, para estabelecer programas de conservação e melhoramento, já que foi possível a conversão dos embriões somáticos em plântulas normais. Entretanto, ainda são necessários estudos mais aprofundados para que sejam desenvolvidos protocolos eficientes e concisos, principalmente, para a fase de

maturação da embriogênese somática, que ainda se encontra com maior escassez de referências.

3.6 MATURAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS

A maturação é uma fase da embriogênese somática de suma importância para garantir a eficácia da técnica. Nessa etapa são realizados alguns processos essenciais como expansão celular, diferenciação e acúmulo de reservas, substâncias essas que facilitam a germinação e a regeneração dos embriões somáticos (VALE et al., 2018). A formação dos embriões somáticos diferencia-se de acordo com a classificação da espécie em mono ou eudicotiledôneas (ALMEIDA et al., 2019).

Eudicotiledôneas, durante a embriogênese somática, apresentam todos os estádios de desenvolvimento de um embrião zigótico característico, sendo elas: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (BOTINI et al., 2021). Entretanto, as monocotiledôneas apresentam apenas as fases globular, escutelar e coleoptilar (GARCIA et al., 2019).

Durante a fase de maturação da embriogênese somática diversas são as moléculas testadas. Tais substâncias são categorizadas como RC e polímeros (REIS et al., 2016). Os RC mais utilizados atualmente são 2iP, ANA (GUERRA; HANDRO, 1998; LEDO et al., 2002; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2022), ABA que também está sendo aplicado de forma eficiente nessa etapa (MELLO, 2022), e, as poliaminas sendo que as mais usuais são espermina, espermidina e putrescina (REIS et al., 2016), já o polímero empregado com maior intensidade é o polietilenoglicol (PEG) (RAI; JAISWAL; JAISWAL, 2009).

É importante evidenciar que cada uma dessas substâncias atua de determinada forma para estimular a mudança de fase requerida na formação do embrião somático. Substâncias como o PEG induzem o déficit hídrico estimulando respostas ao estresse como, por exemplo, o desenvolvimento do embrião (VALE et al., 2018). Os RCs, por sua vez, promovem alterações nos níveis hormonais endógenos da célula somática, induzindo a histodiferenciação (REIS et al., 2016; KHAI et al., 2021).

O uso de PEG na maturação de embriões somáticos de *Castanea dentata* (Marshall) Borkh. influencia apenas na relação peso seco/fresco e no teor de

amido dos tecidos (ROBICHAUD; LESSARD; MERKLE, 2004). Oliveira et al. (2022), por sua vez, utilizando 2iP + ANA na maturação de embriões somáticos de *E. edulis*, obtidos pela indução de embriões zigóticos, concluíram que as concentrações mais eficazes para estimular a mudança de fases do embrião foram, respectivamente, (12,3 μM) e (0,6 μM). Já Mello et al. (2022) utilizando a mesma fonte de explante citada, anteriormente, evidenciou que a maturação de embriões somáticos de *E. edulis* foi máxima utilizando ABA (5 μM).

Enfatizando ainda o uso de RC na maturação de embriões somáticos, tem-se que Hassan et al. (2021), relataram que o picloram (0,1 mg L⁻¹) combinado com ABA (0,1 mg L⁻¹) auxilia a formação de embriões, e, que a união de picloram (0,1 mg L⁻¹) e 2iP (0,1 mg L⁻¹) favorece a multiplicação dessas estruturas, isso considerando como explante inflorescências imaturas de *Phoenix dactylifera* L.

Já o uso de poliaminas na maturação foi retratado em *Elaeis guineensis* Jacq. (dendezeiro) por Rajesh et al. (2003), sendo comprovado que essas moléculas estimulam a embriogênese somática secundária nessa espécie. Além disso, esses autores concluíram que os meios suplementados com 2,4-D com adição de 1 mM de putrescina apresentaram melhores resultados em relação a formação de embriões somáticos do que aqueles suplementados com thidiazuron (TDZ) e espermina.

Diante do exposto, é possível denotar que não existe uma molécula específica para utilizar na maturação de embriões somáticos. Entretanto, julga-se válido utilizar o picloram, já que essa molécula provoca modificações no metabolismo celular, podendo auxiliar o processo de inicialização da maturação (OLIVEIRA et al., 2022), e, as poliaminas, pois, o desenvolvimento embrionário em geral é demarcado por mudanças significativas nos níveis endógenos dessas moléculas, as quais podem estar intimamente ligadas com a histodiferenciação do embrião (MINOCHA; MINHOCHA; LONG, 2004).

3.7 REGULADORES DE CRESCIMENTO UTILIZADOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

3.7.1 Picloram

O picloram é um herbicida clorado sintético, com ação similar as auxinas vegetais naturais como o ácido indolacético (AIA) (OLIVEIRA JÚNIOR, 2011).

Essa molécula é relativamente solúvel em água (MACIEL et al., 2013), e, é agrupada no grupo dos ácidos piridinocarboxílicos assim como outros herbicidas como fluroxipir, e, o triclopyr, que possuem esse mesmo ácido como seu principal grupo químico (JUAN et al. 2021).

As auxinas são RC e são altamente utilizadas durante a ES, para indução de calos e diferenciação dos tecidos vegetais. Sabe-se que o PIC como outros herbicidas auxínicos promovem resultados superiores, dentro de uma mesma função, quando comparados com as auxinas naturais. Salienta-se ainda que o PIC não promove danos cromossômicos, porém, se utilizado em altas doses pode inibir a divisão celular (OZEL et al., 2022).

Apesar de ainda pouco utilizado durante o desenvolvimento de embriões o picloram pode demonstrar resultados satisfatórios nessa fase (OZEL et al., 2022). Devi, Sharma e Ahuja (2014) em sua pesquisa com *Crocus sativus* L., uma monocotiledônea, conhecida como açafrão, evidenciou que a maturação de embriões foi favorecida em meio MS suplementado com TDZ (2,5 μ M) e PIC (1,0 μ M), isso, utilizando como explantes folhas jovens verdadeiras.

A combinação entre ANA (0,54 μ M) e PIC (12,3 μ M) em meio Y3 $\frac{1}{2}$ força é eficaz para maturação de embriões somáticos considerando a espécie *E. precatória*, e, embriões zigóticos maduros como explantes (FERREIRA et al., 2022). Diante do exposto e da efetividade do PIC na maturação de embriões somáticos de uma espécie pertencente ao gênero *Euterpe*, julga-se válido testar a combinação de PIC com outras moléculas, como as poliaminas, durante a fase de maturação da embriogênese somática de *E. edulis*.

3.7.2 Poliaminas

As poliaminas são moléculas essenciais de natureza alifática e policatiônica, formadas por grupos amino que interagem com as macromoléculas (ácidos nucleicos, fosfolipídios, células componentes de paredes, proteínas e outros) de forma eletrostática ou covalente. As principais moléculas desse grupo presentes nas plantas são: espermina (SPM), espermidina (SPD) e putrescina (PUT). Tem-se ainda que essas poliaminas vem sendo relacionadas com os seguintes processos vegetais: organogênese, embriogênese, desenvolvimento floral, senescência e maturação (REIS et al., 2016).

A espermina está ligada ao metabolismo celular, e, pode ser encontrada em todas as células eucarióticas (LIU et al., 2022). Os precursores da síntese da SPM são os aminoácidos ornitina e arginina (BAUZA; KELLY; BLAISE, 2007). A fórmula química dessa poliamina é $C_{10}H_{26}N_4$, a massa molar é $202,346 \text{ g mol}^{-1}$ e sua aparência são de cristais incolores.

Em suma, todas as poliaminas citadas são derivadas dos aminoácidos ornitina e arginina. Porém, de forma mais específica tem-se que a SPD é derivada da PUT, e, a SPM é derivada da SPD (BAUZA; KELLY; BLAISE, 2007). A PUT possui a seguinte fórmula molecular $C_4H_{12}N_2$, sua massa molar é de $88,15 \text{ g mol}^{-1}$, e, naturalmente, apresenta-se sólida. A espermidina é líquida nas condições ambientes, sua fórmula molecular é $C_7H_{19}N_3$, e, sua massa molar $145,25 \text{ g mol}^{-1}$.

A combinação entre PUT (100 mg L^{-1}), glutamina (300 mg L^{-1}) e SPD (100 mg L^{-1}) demonstrou os melhores resultados perante a maturação de embriões somáticos da espécie *Phoenix dactylifera*, já a combinação entre glutamina e PUT resultou no maior número de embriões somáticos (32,33), e, a combinação das três moléculas refletiu no maior peso seco do calo embrionário (5,49 g) (EL-DAWAYATI; GHAZZAWY; MUNIR, 2018). Dado o exposto, nota-se o potencial das poliaminas para uso na maturação de embriões somáticos de palmeiras.

4 REFERÊNCIAS

- ADIL, M.; JEONG, B. R. *In vitro* cultivation of *Panax ginseng* CA Meyer. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 239-251, 2018.
- AGUIRRE, M. et al. Carbohydrate reserves and seed development: An overview. **Plant reproduction**, v. 31, p. 263-290, 2018.
- ALMEIDA, F. A. et al. LED lamps enhance somatic embryo maturation in association with the differential accumulation of proteins in the *Carica papaya* L. 'Golden' embryogenic callus. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 143, p. 109-118, 2019.
- ANJUM, S. et al. Bioreactors and biophoton-driven biohydrogen production strategies. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2023.
- AUGER, C. et al. Beyond mitochondria: Alternative energy-producing pathways from all strata of life. **Metabolism**, v. 118, p. 154-733, 2021.
- BARROSO, M. E. S. et al. Phytochemical profile of genotypes of *Euterpe edulis* Martius – Pucara palm fruits. **Food Research International**, v. 116, p. 985-993, 2018.
- BAUZA, T.; KELLY, M. T.; BLAISE, A. Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and Syrah grapes and wine of the Rhone Valley. **Food Chemistry**, v. 105, p. 405-413, 2007.
- BOTINI, N. et al. Stage-specific protein regulation during somatic embryo development of *Carica papaya* L. 'Golden'. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1869, p. 1-10, 2021.
- BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Germinação de sementes de palmitheiro (*Euterpe edulis* Mart.). **Bragantia**, v. 34, p. 23-29, 1975.
- BRANCALION, P. H. S. et al. Soil-mediated effects on potential *Euterpe edulis* (Arecaceae) fruit and palm heart sustainable management in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 284, p. 78-85, 2012.
- BRASIL. Instrução normativa nº 148, de 07 de dezembro de 2022. Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 dez. 2022. Seção 1, p. 282.
- BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1017-1023, 2010.
- BUCKERIDGE, M. S. et al. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Editora Porto Alegre: Artimed. 2004. 323p.

CUI, J.; LAMADE, E.; TCHERKEZ, G. Seed germination in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): a review of metabolic pathways and control mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 27-42, 2020.

DAR, S. A. et al. Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. **Biotechnology Reports**, v. 32, e00688, 2021.

DEVI, K.; SHARMA, M.; AHUJA, P. S. Direct somatic embryogenesis with high frequency plantlet regeneration and successive cormlet production in saffron (*Crocus sativus* L.). **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 207-216, 2014.

DIAS, D. S. et al. Haustorium–endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae) seeds. **Annals of Botany**, v. 122, p. 267-277, 2018.

DIAS, G. P. et al. Reserve mobilization dynamics and degradation pattern of mannan-rich cell walls in the recalcitrant seed of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 445-460, 2020.

DOMÍNGUEZ, C. et al. Involvement of polyamines in the maturation of grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Mencía') somatic embryos over a semipermeable membrane. **Scientia Horticulturae**, v. 308, p. 111-537, 2022.

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; CHAVARRIA, G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 145, p. 34-42, 2019.

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

EL-DAWAYATI, M. M.; GHAZZAWY, H. S.; MUNIR, M. Somatic embryogenesis enhancement of date palm cultivar Sewi using different types of polyamines and glutamine amino acid concentration under *in-vitro* solid and liquid media conditions. **International Journal Biosciences**, v. 12, p. 149-159, 2018.

FANTINI, A. C.; GURIES, R. P. Forest structure and productivity of palmitero (*Euterpe edulis* Martius) in the Brazilian Mata Atlântica. **Forest Ecology and Management**, v. 242, p. 185-194, 2007.

FARAONI, P. et al. Glyoxylate cycle activity in *Pinus pinea* seeds during germination in altered gravity conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 389-394, 2019.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, p. 385-402, 2015.

FERREIRA, J. C. B. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 667-686, 2022.

FEUSSNER, I.; KÜHN, H.; WASTERACK, C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 268-273, 2001.

FREITAS, E. O. de. et al. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p. 126-135, 2016.

GARCIA, C. et al. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 193-212, 2019.

GARCIA, J. A. A. et al. Chemical composition and biological activities of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit by-products, a promising underexploited source of high-added value compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 325-332, 2019.

GATTI, M. G. et al. Frost resistance in the tropical palm *Euterpe edulis* and its pattern of distribution in the Atlantic Forest of Argentina. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 633-640, 2008.

GHANGHAS, N. et al. Classification, composition, extraction, functional modification and application of rice (*Oryza sativa*) seed protein: A comprehensive review. **Food Reviews International**, v. 38, p. 354-383, 2022.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 65-71, 1998.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 550-552, 1988.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Woody Plant Biotechnology**, v. 210, p. 189-196, 1991.

HANH, N. T. M. et al. Efficient somatic embryogenesis and regeneration from leaf main vein and petiole of *Actinidia chinensis* planch. via thin cell layer culture technology. **Scientia Horticulturae**, v. 298, p. 1-10, 2022.

HASSAN, M. M. et al. High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from date palm immature inflorescences using picloram. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, p. 1-11, 2021.

JIANG, Y. et al. Phenolic compounds in *Lycium berry*: Composition, health benefits and industrial applications. **Journal of Functional Foods**, v. 77, p. 1-22, 2021.

JUAN, V. F. et al. Responses of 2,4-D resistant *Brassica rapa* L. biotype to various 2, 4-D formulations and other auxinic herbicides. **Crop Protection**, v. 145, p. 105-621, 2021.

KHAI, H. D. et al. Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of *Begonia* somatic embryos under clinorotation. **Plant Science**, v. 312, p. 1-10, 2021.

KONG, E. Y. Y. et al. Cell suspension culture: A potential *in vitro* culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 1-19, 2020.

LEAL, A. et al. Landscape-scale forest loss shapes demographic structure of the threatened tropical palm *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae). **Forest Ecology and Management**, v. 502, p. 1-8, 2021.

LEDO, A. D. S. et al. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 601-603, 2002.

LIU, G. et al. Spermine protects intestinal barrier integrity through ras-related C3 botulinum toxin substrate 1/phospholipase C- γ 1 signaling pathway in piglets. **Animal Nutrition**, v. 8, p. 135-143, 2022.

MA, Z. et al. Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. **Plant Science**, v. 248, p. 37-44, 2016.

MACIEL, G. M. et al. Response of *Ganoderma lucidum* and *Trametes* sp. to the herbicide picloram: Tolerance, antioxidants and production of ligninolytic enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 84-92, 2013.

MASMOUDI-ALLOUCHE, F.; KRIAA, W.; DRIRA, N. Staminodes evolution and in vitro development innovation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Comptes Rendus Biologies**, v. 342, p. 220-229, 2019.

MELLO, T. de. et al. Reserve mobilization and in vitro germination of *Euterpe edulis* (Martius) seeds at different maturation stages. **Trees**, v. 36, p. 415-426, 2021.

MELLO, T. de. **Desenvolvimento, maturação e germinação *in vitro* de sementes, e embriogênese somática de *Euterpe edulis* Mart.** 2022. 266 f. Tese – (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2022.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S. C.; LONG, S. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens*

Sarg.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 572-580, 2004.

MOREL, G.; WETMORE, R. H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 141-143, 1951.

MULLETT, J. H.; BEARDSELL, D. V.; KING, H. M. The effect of seed treatment on the germination and early growth of *Euterpe edulis* (Family Palmae). **Scientia Horticulturae**, v. 15, p. 239-244, 1981.

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

OLIVEIRA JÚNIOR, R.S. Mecanismo de ação de herbicidas. *In*: OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011, p. 141-192.

OLIVEIRA, L. B. et al. Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. 299, p. 1-13, 2022.

OZEL, C. A. et al. Determination of genotoxic damages of picloram and dicamba with comet assay in *Allium cepa* rooted in tissue culture and distilled water. **Molecular Biology Reports**, v. 49, p. 11273-11280, 2022.

RAI, M. K.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 233-236, 2009.

RAJESH, M. K. et al. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm—the effect of exogenous polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 41-47, 2003.

RASHEED, F. et al. Modeling to understand plant protein structure-function relationships—implications for seed storage proteins. **Molecules**, v. 25, p. 873, 2020.

REIS, R. S. et al. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 170-179, 2016.

RESZCZYŃSKA, E.; HANAKA, A. Lipids composition in plant membranes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 78, p. 401-414, 2020.

ROBICHAUD, R. L.; LESSARD, V. C.; MERKLE, S. A. Treatments affecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 957-969, 2004.

ROOPASHREE, P. G.; SHETTY, S. S.; KUMARI, N. S. Effect of medium chain fatty acid in human health and disease. **Journal of Functional Foods**, v. 87, p. 1-11, 2021.

SABOO, B. et al. Role and importance of high fiber in diabetes management in India. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 16, p. 1-8, 2022.

SALDANHA, C. W. et al. *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, p. 228-235, 2006.

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

SALMERON-SANTIAGO, I. A. et al. An updated review on the modulation of carbon partitioning and allocation in arbuscular mycorrhizal plants. **Microorganisms**, v. 10, p. 75-94, 2022.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 501-508, 2012.

SCHULZ, M. et al. Aliphatic organic acids and sugars in seven edible ripening stages of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 1-7, 2021.

SCHULZ, M. et al. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016.

SIDDIQUI, H.; SAMI, F.; HAYAT, S. Glucose: Sweet or bitter effects in plants-a review on current and future perspective. **Carbohydrate Research**, v. 487, p. 107-884, 2020.

SILVA, F. P. et al. Low dose of Juçara pulp (*Euterpe edulis* Mart.) minimizes the colon inflammatory milieu promoted by hypercaloric and hyperlipidic diet in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 77, p. 1-8, 2021.

SILVA, R. D. de. et al. Vegetative rescue of *Paratecoma peroba* adult trees: Adventitious rooting of epicormic sprouts from detached branches. **Rhizosphere**, v. 19, p. 1-3, 2021.

VALE, E. M. et al. Morphological analyses and variation in carbohydrate content during the maturation of somatic embryos of *Carica papaya*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, p. 295-305, 2018.

ZDRAVKOVIĆ-KORAĆ, S. et al. Somatic embryogenesis from stamen filaments of *Aesculus flava* Sol. and peroxidase activity during the transition from friable to embryogenic callus. **Scientia Horticulturae**, v. 247, p. 362-372, 2019.

ZENG, F. et al. A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. **Genomics**, v. 90, p. 620-628, 2007.

WU, W. et al. Expression regulation of MALATE SYNTHASE involved in glyoxylate cycle during protocorm development in *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae). **Scientific reports**, v. 10, p. 1-16, 2020.

CAPÍTULO I

Degradação de reservas bioquímicas e hormonais em diferentes estádios da germinação *in vitro* de sementes imaturas de *Euterpe edulis* Martius

Resumo: *Euterpe edulis* Martius conhecida popularmente como juçara é natural da Floresta Atlântica. Os frutos dessa espécie possuem apenas uma semente, com endosperma abundante e uma gama de compostos armazenados, o que torna essas estruturas excepcionais para explicar os processos de mobilização e degradação de reservas, modificações bioquímicas e hormonais que ocorrem durante a germinação, e, a formação de plântulas. Diante disso, objetivou-se com essa pesquisa caracterizar a degradação de reservas durante o período pós-germinação *in vitro* das sementes imaturas de *E. edulis* e associar esse processo à qualidade fisiológica da germinação dessa espécie, e, a formação de plântulas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, cujos tratamentos foram os dias após a germinação de 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180 dias. Com o passar do período pós-germinação, a massa seca da semente reduziu enquanto a massa seca da parte aérea e raiz aumentaram em *E. edulis*. Dentre as principais reservas dessa espécie as proteínas são as primeiras a serem metabolizadas, possuindo maior relação com a germinação das sementes; carboidratos, amidos e lipídios, inicialmente, são acumulados para, posteriormente, serem consumidos, estando mais relacionados com o crescimento das plântulas, por sua vez, fibras e ligninas, também estão ligadas com as plântulas, pois, conferem resistência mecânica a diferentes estruturas morfológicas. Detectou-se a presença de zeatina, ácido indolacético e ácido abscísico, estando esses hormônios relacionados com o *start* da germinação e com interações inibitórias anulando o efeito de um sobre o outro, a exemplo, da zeatina sobre o ácido abscísico na regulação da dormência. Além do precursor do etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico que possui relação com a germinação, as poliaminas espermina, espermidina e putrescina, importantes no desenvolvimento dos embriões e o aminoácido prolina, que além de estar ligado com a germinação, possui relação com a absorção de nutrientes e tolerância ao estresse. Por fim, tem-se que o acréscimo nos valores médios da eficiência de uso de reservas que ocorre juntamente com a redução na massa seca das

sementes, validam a afirmação de que o produto da degradação de reservas das sementes é destinado para a germinação e crescimento das plântulas. Além disso, evidencia-se nesse estudo que a senescência do haustório sinaliza o final do período de degradação das reservas endospermicas de *E. edulis*.

Palavras-chave: juçara, qualidade fisiológica, endosperma, morfofisiologia, plântulas.

Abstract: *Euterpe edulis* Martius popularly known as juçara is native to the Atlantic Forest. The fruits of this species have only one seed, with abundant endosperm and a range of stored compounds, which makes these structures exceptional to explain the processes of mobilization and degradation of reserves, biochemical and hormonal changes that occur during germination, and, the formation of seedlings. Therefore, the objective of this research was to characterize the degradation of reserves during the in vitro post-germination period of immature seeds of *E. edulis* and to associate this process with the physiological quality of germination of this species, and the formation of seedlings. The experimental design used was completely randomized, whose treatments were the days after germination of 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180 days. As the post-germination period passed, seed dry mass decreased while shoot and root dry mass increased in *E. edulis*. Among the main reserves of this species, proteins are the first to be metabolized, having a greater relationship with seed germination; carbohydrates, starches and lipids, initially, are accumulated to be consumed later, being more related to the growth of seedlings, in turn, fibers and lignins, are also linked with the seedlings, as they confer mechanical resistance to different morphological structures. The presence of zeatin, indoleacetic acid and abscisic acid was detected, and these hormones are related to the start of germination and with inhibitory interactions annulling the effect of one over the other, for example, zeatin on abscisic acid in the regulation of dormancy. In addition to the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, which is related to germination, the polyamines spermine, spermidine and putrescine, which are important in embryo development, and the amino acid proline, which, in addition to being linked to germination, is related to nutrient absorption and stress tolerance. Finally, the increase in the average values of the efficiency of use of reserves that occurs together with the reduction in the dry mass of the seeds, validates the statement that the product of the degradation of the reserves of the seeds is destined for the germination and growth of the seedlings. Furthermore, this study shows that the senescence of the haustorium signals the end of the period of degradation of the endosperm reserves of *E. edulis*.

Keywords: juçara, physiological quality, endosperm, morphophysiology, seedlings.

1 INTRODUÇÃO

Euterpe edulis Mart. é uma palmeira popularmente conhecida como juçara, nativa do bioma Floresta Atlântica, e ocorre, principalmente, em Estados das regiões sul e sudeste do Brasil (SCHULZ et al., 2016). Essa palmeira encontra-se classificada como vulnerável na Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2022), isso, porque essa espécie sofreu com a intensa exploração de seu palmito, o que acarreta a morte da planta, a qual é monocaule, sendo incapaz de produzir perfilhos e rebrota (BRANCALION et al., 2012).

Como alternativa para diminuir a exploração do palmito da *E. edulis*, atualmente, vem se disseminando o uso e a valoração dos frutos dessa espécie (SCHULZ et al., 2016). Estes são bagas globosas que pesam cerca de 1 g e possuem coloração verde e roxo escuro, essa diferença de tonalidade é perceptível durante o processo de amadurecimento (SCHULZ et al., 2021). Esses frutos podem ser valorizados economicamente, pois, seu consumo produz inúmeros benefícios ao funcionamento do corpo humano, o que pode assegurar a estabilidade desse produto no mercado consumidor (JIANG et al., 2021). Tais benefícios estão relacionados com a constituição desses frutos que é rica em ácidos graxos, proteínas, fibras alimentares, minerais e fenóis, sendo que o último composto listado está intimamente ligado com o potencial antioxidante, ação neuroprotetora e anti-inflamatória (SCHULZ et al., 2021).

Cada fruto de *E. edulis* possui uma única semente, entretanto, acredita-se que apenas uma palmeira produza 800 sementes por quilo de fruto (CARPINÉ et al., 2019). É importante evidenciar que essas sementes são recalcitrantes (GATTI et al., 2008), logo, não podem ser armazenadas em baixas temperaturas e não suportam dessecação a baixos conteúdos de umidade. Quando submetidas a tais condições, podem sofrer perda de viabilidade e, consequentemente, redução da capacidade de germinação ou emergência (BOVI; CARDOSO, 1975).

A germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas é facilitada na presença dos seus constituintes de reserva, os quais são responsáveis também por manter a sobrevivência dessas estruturas após a etapa de maturação dos frutos (DIAS et al., 2020). Sementes de palmeiras possuem endosperma abundante e uma gama de compostos armazenados

(DIAS et al., 2018), como, por exemplo, corpos lipídicos, cristais globoides fechados, proteínas, lipídios e hemiceluloses (MELLO et al., 2021). Sendo, portanto, excelentes para exemplificar os processos de mobilização e degradação de reservas (DIAS et al., 2018).

Torna-se importante salientar que a principal hemicelulose encontrada nas palmeiras são as mananas (BUCKERIDGE, 2010), e que os processos de mobilização e degradação de reservas são complementares. Sendo que, nas espécies da família Arecaceae esses processos são controlados, majoritariamente, pela ação das enzimas, com ênfase para a endo- β -mananase que é ativada por sinais emitidos pelo próprio embrião (DIAS et al., 2018).

Compreender a degradação de reservas de sementes é extremamente importante para avançar o conhecimento sobre os aspectos fisiológicos da formação de plântulas e para auxiliar o aperfeiçoamento de novas técnicas de propagação da espécie *E. edulis* (DIAS et al., 2020). Em função disto, a hipótese para essa pesquisa remonta a seguinte situação: com o decorrer dos dias após a germinação os constituintes da semente apresentam-se em quantidade reduzida, pois, são translocados ao eixo vegetativo, para promover a germinação e a formação de plântulas.

Diante disso, objetiva-se com este estudo caracterizar a degradação de reservas durante o período pós-germinação *in vitro* das sementes imaturas de *E. edulis* e associar esse processo à qualidade fisiológica da germinação dessa espécie, e a formação de plântulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os frutos de *E. edulis* foram colhidos em estágio imaturo (~180 dias após antese) em uma matriz silvestre localizada em Pedra Menina, situado na divisa dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, nos municípios de Espera Feliz - MG e Dores do Rio Preto - ES, próximo ao Parque Nacional do Caparaó, Brasil, nas coordenadas 20° 31' 32,3" S e 41° 48' 34,8" W, e em uma altitude de 1.164 m. Essa, possui uma altura de 11,56 m e DAP (diâmetro na altura do peito medido a 1,30 m do nível do solo) de 15,4 cm.

A colheita dos frutos foi realizada manualmente com auxílio de tesoura de poda, para evitar danos mecânicos. Imediatamente após a colheita, os frutos foram acondicionados em caixas térmicas e encaminhados para o Laboratório de Sementes Florestais e Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira (DCFM), Centro de Ciências Agrárias e Engenharia (CCAIE), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), onde foi realizada a montagem, o acompanhamento, o processamento e análise dos dados gerados no experimento.

2.2 Germinação *in vitro*

Com o intuito de iniciar o processo de germinação *in vitro* das sementes de *E. edulis*, os frutos foram inicialmente higienizados com água corrente, detergente neutro e hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (QBoa[®]) por 10 min, após essa etapa retirou-se o tegumento e imergiu as sementes em ácido ascórbico 2% (Dinâmica[®]), procedimento realizado a fim de evitar a oxidação fenólica dos tecidos vegetais. Após a retirada do tegumento, desinfestou-se as sementes em câmara de fluxo laminar, com auxílio de álcool etílico 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (QBoa[®]) por 10 min com agitação, e, solução de amoxicilina (Germed[®]) 3 g L⁻¹ por 10 min, também com agitação. Após cada etapa de desinfestação foi realizada tríplice lavagem com água destilada e autoclavada.

Depois de desinfestadas as sementes foram acondicionadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo alíquotas de 8 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma[®]), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica[®]), 1 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) (Synth[®]), 0,1 g L⁻¹ de

mioinositol (Sigma®) e 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi®). O pH do meio foi ajustado para 5,7±0,1 com KOH (Alphatec®) e/ou HCl (Vetec®) a 1,0 N, antes da deposição do ágar no meio. Os tubos, contendo apenas o meio, foram fechados com tampas rígidas de polipropileno, e, autoclavados a 120 °C por 20 min.

Após a inserção nos tubos, as sementes foram mantidas em sala de crescimento por 10, 20, 30, 40, 60, 120 e 180 dias após a germinação (DAG), sob temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 16 horas, e irradiância de 30 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por duas lâmpadas LED tubulares brancas de 1,20 m (Empalux®). No tempo 0 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: germinação (%) (BRASIL, 2009), índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962), e, tempo médio de germinação (TMG, dias) (LABOURIAU, 1983). Já no decorrer do experimento avaliou-se: massa seca de sementes (g), e, teor de água nas sementes (umidade) (%) de acordo com o método de estufa (Adamo®) regulada a 105±3 °C, por 24 horas, com quatro repetições de 25 sementes, em conformidade com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). A partir do tempo 40 dias, avaliou-se também altura da plântula (cm), diâmetro do coleto (mm), comprimento da maior raiz (cm), número de raízes, massa seca da plântula (g), massa seca da raiz (g), redução de reservas da semente (mg seed⁻¹) (Equação 1), eficiência de uso de reservas (mg mg⁻¹) (Equação 2), taxa de redução de reservas da semente (%) (Equação 3), e, taxa de mobilização de reservas (%) (Equação 4). As variáveis de mobilização de reserva foram calculadas de acordo com o proposto por Soltani, Gholipoor e Zeinali (2006). E ao final do experimento avaliou-se plântulas normais e anormais (%).

$$RRS = MSS - MSRE \quad \text{Equação 1}$$

$$EUR = MSP/RRS \quad \text{Equação 2}$$

$$TRRS = \left(\frac{RRS}{MSS} \right) * 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$TMR = \left(\frac{MSP}{MSS} \right) * 100 \quad \text{Equação 4}$$

em que *RRS* é redução de reservas da semente em mg seed^{-1} , *MSS* massa seca da semente em gramas, *MSRE* massa seca restante do endosperma em gramas, *EUR* eficiência de uso de reservas em mg mg^{-1} , e, *MSP* massa seca da plântula em gramas.

2.3 Análises bioquímicas

Com o intuito de extrair e analisar os compostos bioquímicos persistentes nas sementes após decorrido cada tempo em estudo utilizou-se a metodologia modificada de Bligh e Dyer (1959). Sementes acondicionadas por diferentes períodos em sala de crescimento, após sua germinação, foram desidratadas, sem tegumento, em estufa (Adamo[®]) a 60 °C até atingir massa constante. Em seguida, foram trituradas em um moinho de facas (Wyllie Micro - TE 650, Tecnal[®]) e peneiradas por granulometria de 60 mesh. O pó obtido nesse processo foi distribuído em três porções de 250 mg, por tratamento, e submetido à extração em série etanólica decrescente (98, 80 e 50%).

Após adicionar cada solução etanólica (2.000 μL) ao microtubo contendo a amostra, esse foi encubado por 20 min a 80 °C, e centrifugado a 10.000 rpm/10 min, posteriormente, a essa etapa o sobrenadante foi recolhido. Seguido da série etanólica, adicionou-se clorofórmio concentrado (1.500 μL) ao *pellet*, e após encubação nas mesmas condições descritas acima, a solução gerada foi adicionada ao sobrenadante recolhido anteriormente, juntamente com 2.000 μL de água destilada, o que promoveu a separação de fases, sendo que, a fase superior demonstrou natureza hidrofílica e a inferior hidrofóbica.

Para quantificar os lipídios totais presentes nas amostras, foi utilizado o método gravimétrico de Bligh e Dyer (1959). No qual a fase hidrofóbica, obtida no procedimento anterior, foi transferida para microtubos e evaporada em estufa (Adamo[®]) de circulação forçada a 60 °C, até a obtenção de massa constante. Os lipídios totais foram então determinados em uma balança analítica (Bel[®]) (0,0001 g) utilizando triplicatas.

Os fenóis solúveis, por sua vez, foram quantificados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLS, 1959), modificado. No qual foi administrado em um microtubo 11 μL da fase hidrofílica, juntamente com 189 μL de etanol 80% (Neon[®]), 800 μL de carbonato de sódio 4% (Neon[®]) e, 1.000 μL do reagente Folin-Ciocalteu (Êxodo Científica[®]). Essa solução foi acondicionada

por 30 min no escuro e, posteriormente, submetida a leitura em espectrofotômetro (Kasuaki®) a 760 nm, utilizando três réplicas. As concentrações foram determinadas pela confecção da curva padrão, utilizando ácido tânico (Neon®).

As concentrações de carboidratos solúveis presentes nas amostras foram determinadas pela confecção da curva padrão, utilizando glicose (Neon®), de acordo com o método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954), modificado. Para isso adicionou-se em um microtubo 2 µL de extrato da fase hidrofílica, 498 µL de etanol 80% (Neon®), e, 1.000 µL de antrona 0,2% (Êxodo Científica®). Essa solução foi encubada a 90 °C/10 min e submetida a leitura em triplicada no espectrofotômetro (Kasuaki®) à 620 nm.

A determinação de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) modificado, sendo que as concentrações foram determinadas pela confecção da curva padrão, utilizando albumina bovina (Sigma®). Nesse intuito adicionou-se 4.000 µL de hidróxido de potássio (KOH) 0,2 M (Dinâmica®) ao *pellet* resultante da extração dos compostos solúveis. A solução gerada foi encubada à 80 °C por uma hora e meia, e, posteriormente, centrifugada à 4.000 rpm/20 min. Após essa etapa 20 µL do extrato de proteínas gerado foi administrado, juntamente, com 180 µL de KOH 0,2 M (Dinâmica®), e, 1.000 µL do reagente Bradford (Sigma®) em um microtubo. Essas amostras foram lidas em triplicata no espectrofotômetro (Kasuaki®) à 595 nm, após, 10 min de encubação.

Para leitura do amido foi adicionado 2.000 µL de ácido clorídrico (HCl) 3% (Dinâmica®) ao *pellet* resultante da extração das proteínas. Encubou-se essa solução durante três horas, e, centrifugou-se a 4.000 rpm/20 min, o sobrenadante foi coletado e distribuído em microtubos, sendo que em cada microtubo administrou-se 2 µL desse extrato, 298 µL de HCl 3% (Dinâmica®) e 1.000 µL do reagente antrona 0,2% (Êxodo Científica®). Essa mistura de componentes foi encubada à 100 °C/15 min, e, submetida a leitura em espectrofotômetro (Kasuaki®) à 620 nm, utilizando três réplicas. Sendo importante salientar que, as concentrações foram determinadas pela confecção da curva padrão, utilizando amido solúvel (Êxodo Científica®).

A quantificação das fibras presentes nas amostras foi realizada em triplicatas utilizando o *pellet* resultante da extração do amido seco em estufa

(Adamo[®]) de circulação forçada à 60 °C até atingir peso constante. Já a concentração das cinzas foi determinada utilizando amostras de 1 g em triplicata acondicionadas em cadinhos e colocadas em mufla (Quimis[®]) por 2 h à 600 °C (CABRERA-BOSQUET; SANCHEZ; ARAUS, 2009).

2.4 Extrativos

Os extrativos que persistiram na semente de acordo com os tempos em análise foram extraídos com base no procedimento analítico recomendado pelo NREL/TP-510-42619 (SLUITER et al., 2008), e adaptado para o gênero *Euterpe* (LIMA et al., 2019; BURATTO; COCERO; MARTÍN, 2021; MELLO, 2022). Tal extração é necessária para quantificar lignina solúvel, insolúvel e carboidratos estruturais.

Inicialmente, foram inseridos em um papel filtro (Qualy[®]) de porosidade 25 µm, 4 g de amostra peneiradas na granulometria de 60 mesh (referente a cada tempo de análise) e 150 mL de hexano (Neon[®]). Essa composição foi submetida a refluxo no Soxhlet por 6 horas, sendo realizados 4 ciclos/h. O hexano presente na amostra foi evaporado em equipamento de evaporação a vácuo, e, o *pellet* resultante desse processo foi acondicionado em estufa (Adamo[®]) à 50 °C até que a amostra atingisse massa constante. Todo o procedimento descrito anteriormente foi repetido utilizando, separadamente e respectivamente, água destilada e etanol (Neon[®]), para finalizar a extração, modificando o refluxo para 12 h.

2.5 Lignina solúvel, insolúvel e carboidratos estruturais

Para quantificar lignina solúvel, insolúvel e carboidratos estruturais foi utilizado o procedimento analítico recomendado pelo NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2011). Inicialmente, adicionou-se em um tubo de vidro resistente, 300 mg de amostra livre de extrativos (representante de cada tratamento em triplicata), juntamente com 3 mL de ácido sulfúrico (72% m/m) (Neon[®]). As soluções geradas foram encubadas por 60 min à 30 °C agitando a cada 5 min. Posteriormente, diluiu-se as soluções com 84 mL de água tipo I e autoclavou-as à 121 °C/1 h.

O conteúdo autoclavado foi filtrado com o auxílio de bomba de vácuo em cadinho de vidro sinterizado. Esse recipiente foi previamente preparado com

uma camada de aproximadamente 3 mm de espessura de fibra de óxido de alumínio (Al_2O_3), e, seco em estufa (Adamo[®]) a 105 ± 2 °C e massa conhecida. Posteriormente, os cadinhos contendo o conteúdo autoclavado e filtrado foram secos em estufa (Adamo[®]) a 105 ± 2 °C até atingir a massa constante.

A porcentagem de lignina insolúvel foi calculada em triplicata a partir da massa com resíduo registrada após a secagem dos cadinhos preenchidos com as amostras. Já os teores de lignina solúvel (LS) foram determinados utilizando a recuperação do líquido produzido na filtração. Esse líquido foi diluído na proporção 1:5 (extrato - água destilada), e, posteriormente medido com auxílio de espectrofotômetro (Kasuki[®]) à 215 e 280 nm em triplicata (Equação 5).

$$\%LS = \frac{(4,53x|215|)-(280|x 100)}{300x0,3} \quad \text{Equação 5}$$

O líquido produzido na filtração do conteúdo autoclavado também foi utilizado para quantificar os carboidratos estruturais. Para isso, 20 mL desse líquido foi tratada com carbonato de cálcio (Neon[®]) até a neutralização em pH 5-6, utilizando filtro de nylon 0,2 μm (Unifil[®]) essas amostras foram transferidas para *vials* de 2 mL. Esses *vials* foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para realizar a análise por CLAE foi utilizado um sistema Shimadzu Prominence equipado com detector de índice de refração (RID-20A). Foi necessário separar os carboidratos em uma coluna Rezex RPM Monossacarídeo Pb^{+2} (8%) (100 mm \times 7,8 mm, tamanho de partícula de 8 μm , Phenomenex, Torrance, CA, EUA), utilizar uma coluna guarda de mesmo material antes da coluna cromatográfica, sendo importante salientar que a fase móvel desse procedimento foi realizada utilizando água tipo I com uma taxa de fluxo de 0,8 mL min^{-1} , e, que a temperatura do forno da coluna foi mantida em 80 °C. O volume de injeção da amostra foi de 10 μL .

As concentrações obtidas por CLAE apresentam perdas de carboidratos, devido ao processo de hidrólise ocorrido durante a união de dois monômeros para se obter um polímero. Esse procedimento é necessário, pois, o CLAE emite concentrações medidas na forma de monômeros, entretanto, os carboidratos que constituem a amostra encontram-se ligados na forma de polissacarídeos.

Diante disso, é sabido que os valores precisam ser relatados na forma polimérica. Portanto, os fatores de correção anidro para as hexoses é de 0,90 (162/180), e, para as pentoses o valor é de 0,88 (132/150) (ROCHA et al., 2015).

Finalmente, tem-se que as concentrações dos carboidratos nas amostras foram determinadas em triplicata utilizando as Equações 6 e 7, conforme o procedimento NREL (SLUITER et al., 2008).

$$Cx.corrigido = CCLAE \times Correçãoanidro \quad \text{Equação 6}$$

$$\%Carboidratos = \frac{Cx.corrigido \times Vf \times \frac{1g}{100mg}}{m} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

em que m é a massa da amostra em gramas sem extrativos, base massa seca, Vf é o volume do filtrado em mL e o subíndice x representa os diferentes carboidratos analisados.

2.6 Hormônios

Os hormônios foram extraídos e quantificados segundo a metodologia de Forcat et al. (2008), modificada. Essa extração foi realizada em sementes frescas retiradas em quatro estádios de germinação (0, 10, 60 e 180 dias). O primeiro passo para esse procedimento foi macerar as sementes em cadinho (0,220 g) juntamente com o extrator metanol:isopropanol:ácido acético (20:79:1), mantendo-as dentro de microtubos de 1.500 μ L, imersos em gelo.

Posteriormente, foi necessário adicionar 400 μ L da solução de extração nos microtubos, agitá-los em vortex por 20 s, repetir esse processo quatro vezes para cada amostra e sonicar por 10 min (passo 2). Em seguida as amostras foram mantidas em repouso durante 30 min sob gelo, e depois sonicadas por 10 min e centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min à 4 °C, ao final desse processo os sobrenadantes foram coletados (passo 3).

Os passos 2 e 3 foram repetidos, e as amostras filtradas em filtros de seringa PVDF 13 mm e 0,22 μ m (Kasvi®). Para a realização da leitura dos hormônios, as amostras foram injetadas no equipamento UHPLC-triploquadropolo (QQQ) (Agilent®), através de um *vial* contendo 300 μ L do

extrato. Os resultados foram analisados em triplicata no Software Skyline para a obtenção das áreas de cada pico e as massas calculadas em ng g^{-1} .

2.7 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por oito tratamentos (dias após a germinação: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120 e 180 DAG) e quatro repetições com 10 sementes cada, para as análises morfológicas (massa seca semente (g), altura da plântula (cm), diâmetro do coleto (mm), comprimento da maior raiz (cm), número de raízes, massa seca da raiz (g), massa seca da parte aérea (g), plântulas normais e anormais (%)), e, triplicatas para as análises fisiológicas (germinação (%), índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação (dias), umidade (%), hormônios) e bioquímicas (lipídios (%), carboidratos (mg g^{-1}), amido (mg g^{-1}), fibras (%), fenóis (mg g^{-1}), proteínas (mg g^{-1}), cinzas (%), lignina solúvel e insolúvel (%), manose (%), glicose (%), galactose (%)). Os dados foram submetidos à análise de variância, teste F ($p < 0,05$), e teste Tukey ($p < 0,05$), sendo ambos processados no Software Genes (CRUZ, 2016).

3 RESULTADOS

As sementes imaturas (~180 dias após a antese) possuíam no tempo 0 dias em média 17,32 g de massa fresca, com umidade de 63,73%, germinaram *in vitro* 100%, com IVG médio de 1,86, TMG de 21 dias, sendo importante acrescentar que aos 180 DAG foi observado 100% de plântulas normais.

Nas sementes imaturas, o embrião zigótico (ez) da *E. edulis* é subdividido em duas regiões, eixo embrionário (ee) e haustório (h) (Figura 1a), após a germinação apenas o haustório permanece embutido no endosperma (en) (Figura 1b), com 20 dias de pós-germinação é possível observar as seguintes regiões: raiz primária (rp), lígula (li) e pecíolo cotiledonar (pc) (Figura 1c), aos 40 dias nota-se também a presença do catafilo (ct) (Figura 1d), e, aos 60 dias o eófilo (e) já está formado (Figura 1e).

Com o decorrer do tempo pós-germinação, observou-se sementes germinadas e não germinadas, e, plântulas com variação de tamanho e de estruturas morfológicas (Figura 1f). Dentro desse mesmo período o haustório desenvolveu e o endosperma foi ligeiramente consumido, e, a partir dos 120 dias a semente começou a apresentar sinais de deterioração (Figura 1g).

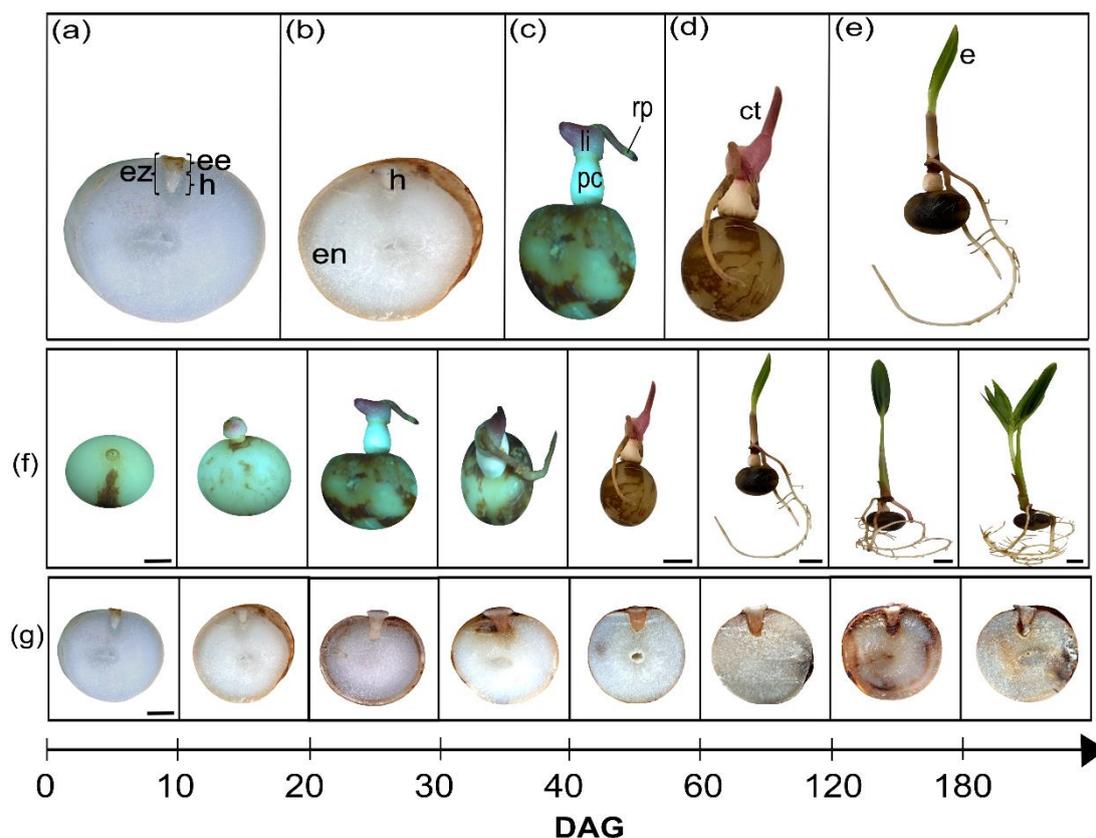


Figura 1. Síntese qualitativa das modificações morfofisiológicas que acometem as sementes de *E. edulis* durante a formação de mudas e degradação de reservas a 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120 e 180 dias após germinação - DAG. (a) Detalhes internos nas sementes de *E. edulis* não germinadas (ez, embrião zigótico; ee, eixo embrionário; h, haustório). (b) Particularidades intrínsecas vistas nas sementes antes e após a germinação (en, endosperma; h, haustório). (c) Estruturas morfológicas presentes nas sementes germinadas após 20 dias (rp, raiz primária; li, lígula; pc, pecíolo cotiledonar). (d) Especificidade externa acrescida nas sementes 40 dias após a germinação (ct, catafilo). (e) Característica externa formada nas sementes germinadas depois de 60 dias (e, eófilo). (f) Modificações morfológicas externas ocorridas na semente no período pós-germinação. (g) Diferenças encontradas no endosperma e no haustório durante o período em análise. Barras de escala: 1000 μ M (f - tempo 0, 10, 20, 30 dias, e g); 5 mm (f - tempo 40 dias); 1 cm (f - tempo 60, 120 e 180 dias).

Fonte: a autora.

A umidade das sementes de *E. edulis* só diferiu estatisticamente aos 180 DAG onde apresentou sua maior média (88,33%) (Figura 2a). O que ocorreu também para a massa seca de sementes⁻¹, porém, essa variável apresentou nesse mesmo período sua menor média (5,90 g) (Figura 2b).

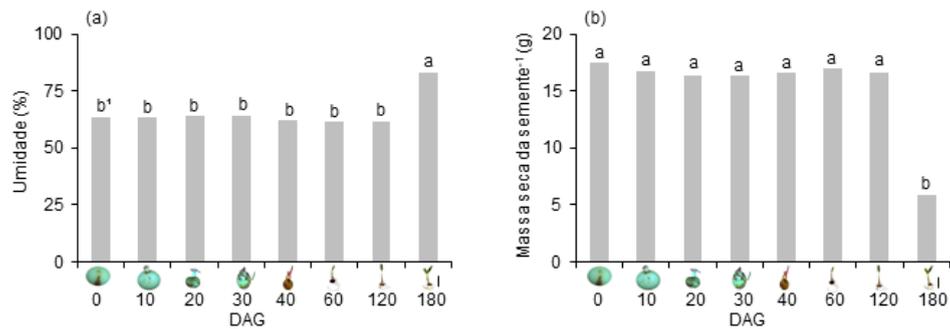


Figura 2. Umidade (%) (a) e massa seca de sementes⁻¹ (g) (b) de *E. edulis* analisados durante a formação das plântulas e degradação de reservas a 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120 e 180 dias após a germinação - DAG. ¹Médias não seguidas de mesma letra na comparação entre os tempos diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barra de escala: 0,2 cm.

Fonte: a autora.

Por sua vez, as variáveis de mobilização de reserva EUR (Figura 3a) e TMR (Figura 3b) apresentaram suas maiores médias aos 180 DAG, as quais diferem-se das demais, e possuem, respectivamente, os seguintes valores 0,33 mg mg⁻¹ e 35,51%. A RRS (Figura 3c) e TRRS (Figura 3d) também demonstram médias diferentes das demais aos 180 DAG, com os menores valores médios 3,82 mg seed⁻¹ e 64,48%, respectivamente.

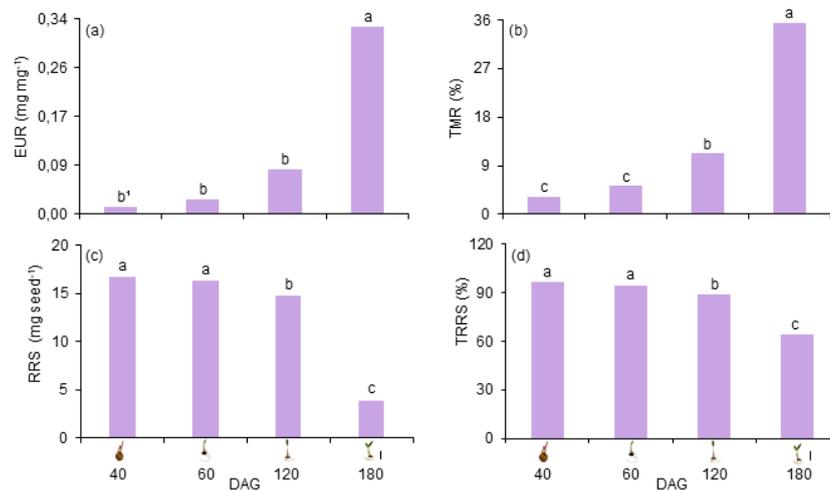


Figura 3. Taxa de mobilização de reservas analisada nas sementes de *E. edulis* durante a formação das plântulas a 40, 60, 120 e 180 dias após a germinação - DAG. (a) Eficiência de uso de reservas (EUR - mg g⁻¹). (b) Taxa de mobilização de reservas (TMR - %). (c) Redução de reservas da semente (RRS - mg seed⁻¹). (d) Taxa de redução de reservas da semente (TRRS - %). ¹Médias não seguidas de mesma letra na comparação entre os tempos diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barra de escala: 0,2 cm.

Fonte: a autora.

As plântulas de *E. edulis* demonstraram aumento até 180 DAG para as variáveis altura da plântula de 8,30 cm (Figura 4a), comprimento da maior raiz de 13,47 cm (Figura 4c), massa seca da parte aérea⁻¹ de 1,40 g (Figura 4d), massa seca da raiz⁻¹ de 0,84 g (Figura 4e), e, número de raízes de 2,88 (Figura 4f). Apenas a variável DC apresentou redução de suas médias a partir de 120 DAG, com menor média (2,01 mm) diferente das demais aos 180 DAG (Figura 4b).

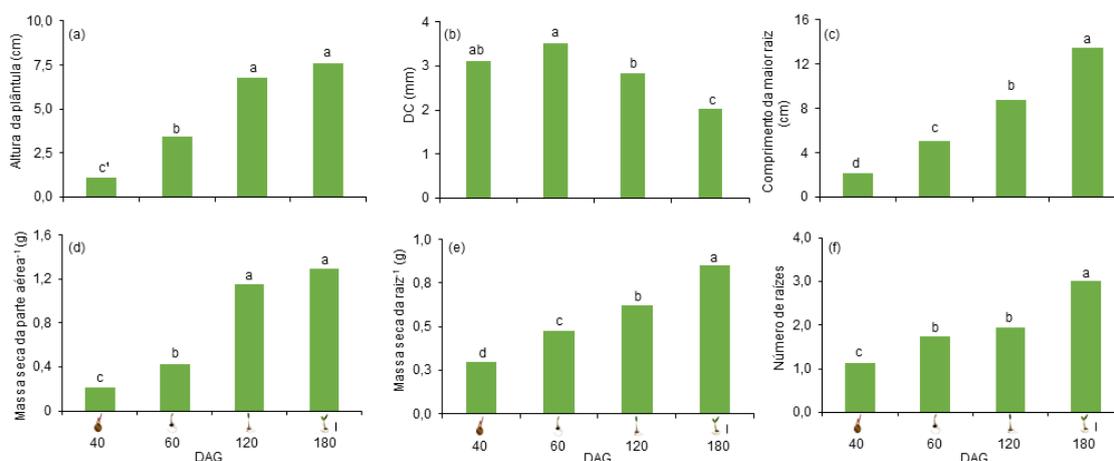


Figura 4. Variáveis morfológicas das plântulas de *E. edulis* avaliadas durante a degradação de reservas a 40, 60, 120 e 180 dias após a germinação - DAG. (a) Altura da plântula (cm). (b) Diâmetro do coleto (DC - mm). (c) Comprimento da maior raiz (cm). (d) Massa seca da parte aérea⁻¹ (g). (e) Massa seca da raiz⁻¹ (g). (f) Número de raízes. ¹Médias não seguidas de mesma letra na comparação entre os tempos diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barra de escala: 0,2 cm.

Fonte: a autora.

Em relação as reservas das sementes de *E. edulis* observou-se que os carboidratos, amido e lipídios apresentaram acúmulo em seus teores para posterior degradação. Para carboidratos detectou-se a maior média aos 40 DAG (Figura 5a). O amido apresentou maiores médias entre 30-120 DAG, o que não diferiu estatisticamente de 10-20 DAG (Figura 5b). Já para os lipídios, a maior média foi obtida aos 120 DAG (Figura 5c). As proteínas apresentaram médias superiores de 0-120 DAG (Figura 5d). Por sua vez, o teor de fenóis foi maior aos 0 DAG, o que não diferiu para os 10 DAG, e a partir deste tempo houve redução acentuada para essa variável (Figura 5e). A lignina solúvel, insolúvel e as cinzas foram maiores ao 0 DAG, sendo degradadas ao logo de todo período pós-germinação (Figuras 5f, g, i). As fibras apresentaram maior média aos 0 DAG,

não diferindo aos 10-30 DAG, com degradações a partir deste período, e redução drástica aos 180 DAG (Figura 5h).

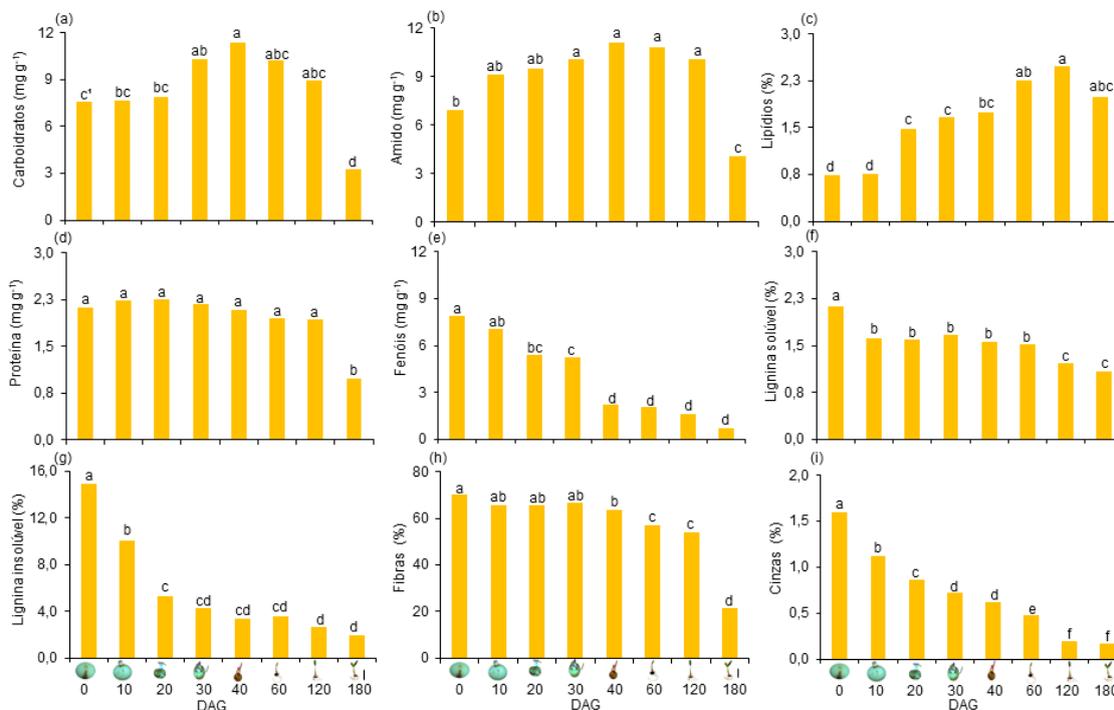


Figura 5. Variáveis bioquímicas analisadas nas sementes de *E. edulis* durante a formação das plântulas e degradação de reservas a 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120 e 180 dias após a germinação - DAG. (a) Carboidratos (mg g⁻¹). (b) Amido (mg g⁻¹). (c) Lipídios (%). (d) Proteína (mg g⁻¹). (e) Fenóis (mg g⁻¹). (f) Lignina solúvel (%). (g) Lignina insolúvel (%). (h) Fibras (%). (i) Cinzas (%). ¹Médias não seguidas de mesma letra na comparação entre os tempos diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barra de escala: 0,2 cm.

Fonte: a autora.

Nos carboidratos, tem-se que a manose e glicose apresentam maiores teores entre 0-30 DAG, com redução ao longo do período pós-germinação, entretanto, observou-se que a manose demonstra um menor declínio em seus teores passando de 118,19 a 59,58% (Figura 6a), enquanto a glicose reduz de 181,52 a 34,67% (Figura 6b). Por sua vez, observa-se que a galactose aos 10-20 DAG apresentou maiores médias, e que aos 30 DAG essa reserva foi totalmente consumida, sendo que seus teores são em geral muito inferiores aos outros dois carboidratos estruturais detectados durante o período em análise (Figura 6c).

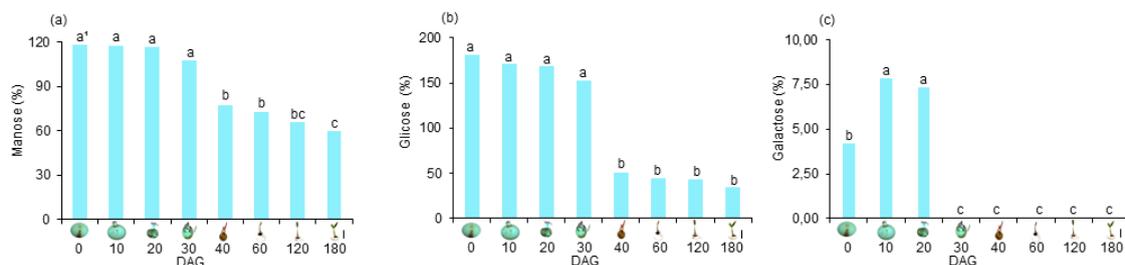


Figura 6. Carboidratos estruturais avaliados nas sementes de *E. edulis* durante a formação das plântulas e degradação de reservas a 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120 e 180 dias após a germinação - DAG. (a) Manose (%). (b) Glicose (%). (c) Galactose (%). ¹Médias não seguidas de mesma letra na comparação entre os tempos diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barra de escala: 0,2 cm.

Fonte: a autora.

O ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) apresentou a menor média ($0,71 \text{ ng g}^{-1}$) aos 180 DAG (Figura 7a). A espermina (SPM) e a espermidina (SPD) demonstraram o mesmo padrão de degradação com valores estatisticamente iguais, para cada variável isolada, aos 60 e 180 DAG (Figura 7b, c, respectivamente). A putrescina (PUT) e a prolina (PRO) foram consumidas gradativamente, apresentando médias estatisticamente diferentes em todos os tempos de análise, com médias mínimas de 26,34% (Figura 7d) e 55,99% (Figura 7e), respectivamente, aos 180 DAG. As médias dos hormônios zeatina, ácido indolacético (AIA) e ácido abscísico (ABA) também são estatisticamente diferentes, com menores médias aos 10 DAG, com reduções da zeatina de 364,12 a 21,15 ng g^{-1} (Figura 7f), do AIA de 20,91 a 8,19 ng g^{-1} (Figura 7g), e, do ABA de 3,30 a 2,10 ng g^{-1} (Figura 7h).

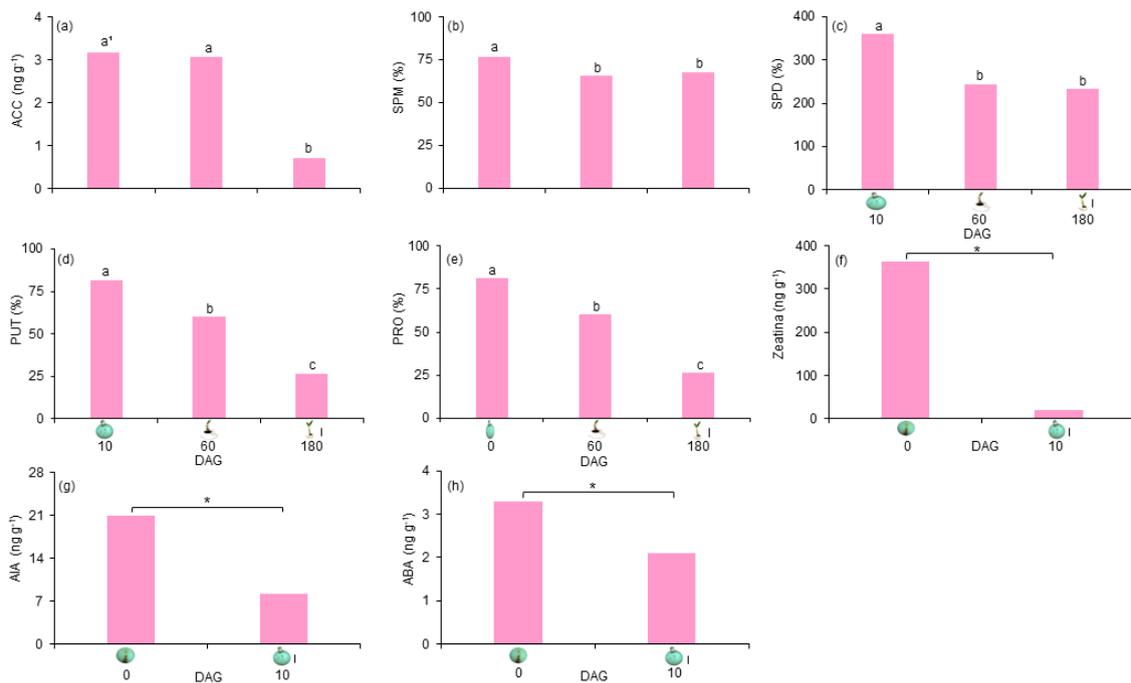


Figura 7. Precursor hormonal, hormônios e aminoácido analisados nas sementes de *E. edulis* durante a formação das plântulas e degradação de reservas a 10, 60, e 180 dias após a germinação - DAG (a-e), e, a 0 e 10 DAG (f-h). (a) Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC - ng g^{-1}). (b) Espermina (SPM - %). (c) Espermidina (SPD - %). (d) Putrescina (PUT - %). (e) Prolina (PRO - %). (f) Zeatina (ng g^{-1}). (g) Ácido Indolacético (AIA - ng g^{-1}). (h) Ácido abscísico (ABA - ng g^{-1}). Médias não seguidas de mesma letra na comparação entre os tempos diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Significativo ($p < 0,05$) e ⁿ não significativo pelo teste F, entre os dois períodos pós-germinação. Barra de escala: 0,2 cm.

Fonte: a autora.

4 DISCUSSÃO

As distintas estruturas morfológicas presentes nas sementes de *E. edulis* no decorrer do período pós-germinação também foram observadas para *Euterpe precatoria* Martius. Entre 10 e 15 dias após a semeadura (DAS) dessa espécie a parte proximal do embrião (eixo embrionário) emergiu. Depois dessa ocorrência o eixo embrionário intumescceu e formou o botão germinativo de onde surgiu a lígula e a raiz primária, aos 20 DAS. Decorridos 30 dias desse evento já se observava a presença do catafilo, e aos 80 dias, o eófilo encontrava-se bem formado e esverdeado (FERREIRA et al., 2020).

Assim como para *E. precatoria* a emergência do eixo embrionário de *E. edulis* faz com que apenas o haustório permaneça imerso no endosperma. Essa estrutura funciona como órgão de absorção, tornando-se responsável pela mobilização dos componentes de reserva durante a formação das plântulas. Logo, com o passar dos dias pós-germinação o haustório intumescce e consome as reservas do endosperma que, conseqüentemente, tem seu volume reduzido (FERREIRA et al., 2020). Depois de consumir os nutrientes endospermicos o haustório apresenta redução de seu tamanho, o que ocorreu nesse estudo por volta dos 180 DAG, isso indica a senescência dessa estrutura, fato que foi observado também em sementes de *Mauritia flexuosa* L. f. (DIAS et al., 2020).

No decorrer do processo de consumo das reservas e formação das plântulas, as sementes começam a evidenciar sua deterioração. A qual pode estar relacionada com o estresse sofrido pelas sementes cultivadas *in vitro*, que são expostas, no decorrer do tempo, a alta umidade relativa, baixa taxa de ventilação, e, reduzida disponibilidade de luz (US-CAMAS et al., 2014). O estresse, normalmente, induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a peroxidação lipídica, que refletem na oxidação dos tecidos e são consideradas como as principais causas de deterioração nas sementes (BARRETO; GARCIA, 2017).

Unido ao processo de degradação de reservas e deterioração das sementes, tem-se o aumento da umidade nessas estruturas, isso, porque após a mobilização e digestão do conteúdo endógeno celular, o potencial de pressão interno da semente diminui e facilita a entrada de água nas células (DIAS et al., 2020). Por volta dos 120 DAG nota-se o escurecimento do tecido endospermico, e aos 180 DAG observa-se o aumento da umidade, e, a redução na massa seca

das sementes, eventos que podem estar intimamente relacionados com a entrada excessiva de água nas células.

A umidade e a massa seca de sementes são características inversamente proporcionais que também se comportaram assim no processo de maturação das sementes de *E. edulis*. Entretanto durante essa fase, a umidade apresentou redução de suas médias e a massa seca acréscimo (MELLO, 2022). O aumento no teor de massa seca está relacionado com a intensa divisão celular ocorrida nas células durante o acúmulo das substâncias de reservas, logo, durante a degradação de reservas, processo complementar, porém, contrário, julga-se que essa variável apresente redução de seus valores (KOK et al., 2013).

Os parâmetros de mobilização de reservas da semente revelaram que a redução da massa seca das sementes (MSS) está intimamente relacionada com a eficiência de conversão de reserva mobilizada em tecido de plântula (EUR), isso porque, aos 180 DAG, a MSS apresenta redução significativa em suas médias, a EUR demonstra acréscimo, e, a redução de reservas da semente (RRS) apresenta teores estatisticamente diferente dos demais. Diferentemente, do encontrado no presente trabalho, Soltani, Gholipour e Zeinali (2006) utilizando esses parâmetros comprovaram que o acréscimo na massa seca de plântulas de trigo está ligado apenas com a redução de reservas mobilizadas nas sementes e não com sua eficiência de conversão.

Os dados morfológicos encontrados nesse estudo com *E. edulis* evidenciam a translocação das reservas endospermicas para promover a germinação, e, o crescimento do eixo vegetativo. O que é corroborado por Dias et al. (2020) em sua pesquisa com *M. flexuosa*, onde foi detectado desenvolvimento da parte aérea e raiz, além de aumento de massa seca da parte aérea, eventos esses que ocorreram concomitantemente com a redução de massa seca da semente.

O endosperma das sementes de *E. edulis* é constituído, principalmente, por lipídios, carboidratos, amido e proteínas. Sendo que a última reserva citada é a primeira desse grupo a ser metabolizada, pois, seu teor não apresenta aumento significativo durante o período pós-germinação, diferentemente, das outras reservas mencionadas. Isso ocorre também durante o desenvolvimento de plântulas de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. Mart., evidenciando a importância dessa reserva para o *start* da germinação dessas espécies, ambas

pertencentes a família Arecaceae (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2017).

Em relação ao crescimento do eixo vegetativo, lipídios e carboidratos são as principais reservas utilizadas, pois, são fonte de carbono e energia (BARRETO et al., 2016). Essas reservas podem ser estocadas na forma de amido nas plantas, e, todas as três possuem metabolismo relacionado pelo ciclo do glioxilato, o qual garante a acidificação do ambiente para a degradação do amido, e a síntese de carboidratos e lipídios (MA et al., 2016). O envolvimento do metabolismo dessas reservas dentro do mesmo ciclo explica o mesmo padrão de degradação encontrado para esses nutrientes na presente pesquisa com *E. edulis*. E assim como para *A. aculeata* a metabolização dos lipídios nesse estudo é considerada tardia levando em conta carboidratos e amidos como reservas contrastantes (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2017).

Alguns compostos derivados da síntese de carbono ocorrida no ciclo glioxilato são convertidos em aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) pela rota do ácido chiquímico. Isso ocorre, principalmente, quando as plântulas estão sujeitas a um ambiente estressante, pois, uma das funções dessas reservas é proteger as estruturas celulares das reações em cadeia dos radicais livres que são encadeadas por reações químicas (MARCHIOSI et al., 2020). Isso, esclarece a diminuição no teor de fenóis com o passar do tempo de cultivo *in vitro* das sementes de *E. edulis*.

Por sua vez, a diminuição no teor de lignina solúvel e insolúvel com o passar do período pós-germinação da espécie *E. edulis*, também é explicada pela rota do ácido chiquímico. Isso, porque essas moléculas são compostas por ácidos fenólicos simples que são translocados para as plântulas para conferir resistência mecânica à parede celular, além de possibilitar o transporte de água e nutrientes por capilaridade das raízes para as folhas (MARCHIOSI et al., 2020).

Ainda sobre as reservas bioquímicas tem-se que as fibras, encontradas em *E. edulis* tiveram evidente decaimento a partir dos 30 DAG. O que pode ser explicado pela formação dos catafilos que se iniciam nesse estudo aos 40 DAG. Os quais apresentam em sua constituição fibras associadas a feixes vasculares que conferem resistência mecânica, e, auxiliam a saída dessa estrutura pela fenda cotiledonar. Em *E. precatória* esse evento ocorre da mesma maneira, nesse caso para frutos maduros, porém aos 30 dias após a semeadura da

espécie em gerbox contendo vermiculita de granulação superfina (FERREIRA et al., 2020).

O teor de cinzas, também está enquadrado dentro das características bioquímicas, e, normalmente possui valor reduzido em espécies da família *Arecaceae*, nesse estudo as sementes de *E. edulis* continham de 1,60 a 0,17%. Tem-se, por exemplo, que sementes de *Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud possuem em média 1,18% de cinzas (NEHDI et al., 2010). Essa reserva é constituída por minerais que são requeridos de forma distinta durante o desenvolvimento das plântulas, para *Elaeis guineensis* Jacq., os elementos minerais manganês (Mn) e ferro (Fe) comportaram-se de forma inversamente proporcional, com o desenvolvimento da semente o teor de Mn reduziu e o de Fe aumentou (KOK et al., 2013).

Os carboidratos estruturais glicose, galactose, manose, xilose, e, arabinose, podem ser detectados nas sementes de *E. edulis*. Salieta-se que 80% dos carboidratos observados na espécie *E. oleracea*, em sementes maduras, são representados pelas manoses (NASCIMENTO et al., 2020). Já neste estudo com sementes imaturas de *E. edulis* notou-se que as manoses foram superiores ao teor de glicose apenas a partir dos 40 DAG, e, que a galactose chegou a não ser detectada nos tempos 30, 40, 60, 120, e 180 DAG. O baixo teor de galactanos encontrado nesse estudo é corroborado por Mello (2022) que evidência em sua pesquisa com a maturação de *E. edulis* que aproximadamente aos 185 dias após a antese essa reserva apresenta média de apenas 3%, podendo facilmente ser degradada a teor nulo durante a formação de plântulas.

Considerando as reservas hormonais das sementes de *E. edulis* tem-se que o ACC apresentou redução significativa com 180 DAG. O que está relacionado com a intensificação da conversão desse ácido em etileno durante esse período, já que com o crescimento da plântula o ambiente *in vitro* torna-se mais estressante e estimula a formação desse hormônio (LI et al., 2022). A zeatina, AIA e ABA também demonstraram redução significativa em suas médias, porém, no caso desses hormônios a diferença foi detectada entre 0 e 10 DAG. Tais hormônios são respectivamente, citocininas, auxinas, e ácido abscísico, e estão relacionados com o *start* da germinação das sementes, por isso reduzem nesse período. O primeiro hormônio auxilia na emissão do broto

germinativo (WYBOUW; RYBEL, 2019), o segundo na protrusão da raiz primária (XIAO; ZHANG, 2020) e o terceiro inibe a germinação (LIU et al., 2019).

Como visto anteriormente, o ABA funciona como inibidor da germinação, esse efeito pode ser anulado pela citocina, que nesse estudo está representada pela zeatina (SUBBIAH; REDDY, 2010). O que explica o fato desse último hormônio ter sido mais requerido durante a germinação das sementes de *E. edulis*, decrescendo em seu teor 342,97 ng g⁻¹ de 0-10 DAG. Essa inibição é retratada também por Subbiah e Reddy (2010), em sua pesquisa com *Arabidopsis thaliana* do ecótipo Columbia e suas cepas, nesse caso os efeitos do ABA foram inibidos no tipo selvagem e na cepa CS3071 (ein2-1) durante a germinação de sementes dessa espécie, adicionando a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP).

A prolina assim como o ABA inibe a germinação de sementes, sendo importante salientar que esse hormônio é o precursor desse aminoácido. Logo seus valores são diretamente proporcionais, o que justifica a redução no teor de prolina com o decorrer do período pós-germinação (THAKUR; SHARMA, 2005). Por fim, a diminuição observada nas poliaminas pode estar relacionada à regulação de processos fisiológicos como quebra de dormência, germinação e alongamento celular (MUSTAFAVI et al., 2018).

5 CONCLUSÕES

O produto da degradação de reservas endospermicas de *E. edulis* é destinado para germinação das sementes e crescimento das plântulas, o acréscimo dos valores médios da eficiência de uso de reservas, juntamente, com a redução da massa seca das sementes validam essa afirmação. O decréscimo da massa seca de sementes implica também no acréscimo das seguintes variáveis: altura, diâmetro do coleto e massa seca de plântulas, comprimento da maior raiz, e, massa seca de raízes.

As proteínas estão intimamente relacionadas com a germinação dessas sementes, já, os carboidratos, amidos e lipídios possuem maior relação com o crescimento das plântulas. Por sua vez, fibras, lignina solúvel e insolúvel estão ligadas a formação estrutural das mudas.

Dentre os carboidratos estruturais, manose e glicose estão presentes no endosperma das sementes de *E. edulis* em maior porcentagem. Não obstante a isso, tem-se que apenas os hormônios zeatina, AIA e ABA são encontrados nas sementes de *E. edulis* pós-germinação. A zeatina requerida em maior quantidade na germinação e a conseqüente redução nos níveis de ABA, pode estar relacionada com o efeito de nulidade desta citocinina sobre este hormônio da dormência. E, os teores de poliaminas, prolina e ACC reduzem com o passar do tempo de cultivo *in vitro*, devido suas respectivas relações com o desenvolvimento do embrião e germinação das sementes.

O endosperma apresenta sinais de deterioração aos 120 DAG, o que implica no aumento significativo da umidade e diminuição da massa seca das sementes aos 180 DAG, nesse mesmo período o haustório começa apresentar senescência sinalizando o final da degradação de reservas para espécie *E. edulis*.

6 REFERÊNCIAS

BARRETO, L. C. et al. Dynamic of reserve compounds of mesocarp and seeds of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) submitted to different storage conditions. **Trees**, v. 30, p. 1945-1952, 2016.

BARRETO, L. C.; GARCIA, Q. S. Accelerated ageing and subsequent imbibition affect seed viability and the efficiency of antioxidant system in macaw palm seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, p. 1-8, 2017.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOVI, M. L. A.; CARDOSO, M. Germinação de sementes de palmitheiro (*Euterpe edulis* Mart.). **Bragantia**, v. 34, p. 23-29, 1975.

BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCALION, P. H. S et al. Soil-mediated effects on potential *Euterpe edulis* (Arecaceae) fruit and palm heart sustainable management in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 284, p. 78-85, 2012.

BRASIL. Instrução normativa nº 148, de 07 de dezembro de 2022. Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 dez. 2022. Seção 1, p. 282.

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

BUCKERIDGE, M. S. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1017-1023, 2010.

BURATTO, R. T.; COCERO, M. J.; MARTÍN, Á. Characterization of industrial açai pulp residues and valorization by microwave-assisted extraction. **Chemical Engineering and Processing – Process Intensification**, v. 160, p. 108-269, 2021.

CABRERA-BOSQUET, L.; SANCHEZ, C.; ARAUS, J. L. How yield relates to ash content, D13C and D18O in maize grown under different water regimes. **Annals of Botany**, v. 104, p. 1207-1216, 2009.

CARPINÉ, D. et al. Valorization of *Euterpe edulis* Mart. agroindustrial residues (pomace and seeds) as sources of unconventional starch and bioactive compounds. **Journal of Food Science**, v. 85, p. 96-104, 2019.

CRUZ, C.D. Genes Software—Extended and Integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 38, p. 547-552, 2016.

DIAS, D. S. et al. Haustorium–endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae) seeds. **Annals of Botany**, v. 122, p. 267-277, 2018.

DIAS, G. P. et al. Reserve mobilization dynamics and degradation pattern of mannan-rich cell walls in the recalcitrant seed of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 445-460, 2020.

FERREIRA, C. D. et al. Morphostructural and histochemical dynamics of *Euterpe precatoria* (Arecaceae) germination. **Journal of Plant Research**, v. 133, p. 693-713, 2020.

FORCAT, S. et al. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, v.4, p. 16, 2008.

GATTI, M. G. et al. Frost resistance in the tropical palm *Euterpe edulis* and its pattern of distribution in the Atlantic Forest of Argentina. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 633-640, 2008.

JIANG, Y. et al. Phenolic compounds in *Lycium berry*: Composition, health benefits and industrial applications. **Journal of Functional Foods**, v. 77, p. 1-22, 2021.

KOK, S. Y. et al. Biochemical characterisation during seed development of oil palm (*Elaeis guineensis*). **Journal of Plant Research**, v. 126, p. 539-547, 2013.

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

LI, D. et al. Something old, something new: Conservation of the ethylene precursor 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid as a signaling molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 65, p. 102116, 2022.

LIMA, A. C. P. et al. Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açai (*Euterpe oleracea*) processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, p. 925-935, 2019.

LIU, J. et al. High temperature and drought stress cause abscisic acid and reactive oxygen species accumulation and suppress seed germination growth in rice. **Protoplasma**, v. 256, p. 1217-1227, 2019.

MA, Z. et al. Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. **Plant Science**, v. 248, p. 37-44, 2016.

- MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.
- MARCHIOSI, R. et al. Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, p. 865-906, 2020.
- MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H. C.; RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. **Protoplasma**, v. 254, p. 1563-1578, 2017.
- MELLO, T. de. et al. Reserve mobilization and in vitro germination of *Euterpe edulis* (Martius) seeds at different maturation stages. **Trees**, v. 36, p. 415-426, 2021.
- MELLO, T. de. **Desenvolvimento, maturação e germinação in vitro de sementes, e embriogênese somática de *Euterpe edulis* Mart.** 2022. 266 f. Tese – (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2022.
- MURASHIGE, T. M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MUSTAFAVI, S. H. et al. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, p. 1-19, 2018.
- NASCIMENTO, J. R. S. et al. Proteome dynamics of the cotyledonary haustorium and endosperm in the course of germination of *Euterpe oleracea* seeds. **Plant Science**, v. 298, p. 110569, 2020.
- NEHDI, I. et al. Characteristics and chemical composition of date palm (*Phoenix canariensis*) seeds and seed oil. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 360-365, 2010.
- ROCHA, G. J. M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.
- SCHULZ, M. et al. Aliphatic organic acids and sugars in seven edible ripening stages of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 1-7, 2021.
- SCHULZ, M. et al. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016.
- SLUITER, A. et al. **Determination of extractives in biomass.** NREL/TP-510-42619, 2008.

SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. NREL/TP-510-42618, 2011.

SOLTANI, A.; GHOLIPOOR, M.; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, p. 195-200, 2006.

SUBBIAH, V.; REDDY, K. J. Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. **Journal of Biosciences**, v. 35, p. 451-458, 2010.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I quantitative analysis of phenolics constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63-68, 1959.

THAKUR, M.; SHARMA, A. D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: Evidence suggesting a role of proline in seed germination. **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 517-523, 2005.

US-CAMAS, R. et al. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 187-201, 2014.

WYBOUW, B.; RYBEL, B. de. Cytokinin—a developing story. **Trends in Plant Science**, v. 24, p. 177-185, 2019.

XIAO, G.; ZHANG, Y. Adaptive growth: Shaping auxin-mediated root system architecture. **Trends in Plant Science**, v. 25, p. 121-123, 2020.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.

CAPÍTULO II

Histodiferenciação em embriões somáticos de *Euterpe edulis* Martius com o uso de poliaminas associadas ou não ao picloram

Resumo: *Euterpe edulis* Martius pertencente à família Arecaceae, sendo uma palmeira que possui germinação lenta, porte alto e sementes recalcitrantes, o que, juntamente com a ameaça de extinção, causada pela exploração de seu palmito doce, justificam a busca por métodos alternativos de propagação. A embriogênese somática surge nesse cenário como uma opção viável, pois, permite a produção de inúmeras plântulas a partir de apenas um explante, dentro dessa técnica uma das etapas é a indução e maturação de embriões somáticos. Durante essa fase algumas moléculas vem sendo testadas como os reguladores de crescimento, a exemplo, das poliaminas, as quais interagem com o conteúdo endógeno da célula estimulando processos embriogênicos. Diante disso, objetivou-se averiguar a responsividade das poliaminas, espermina e espermidina, e, definir as concentrações adequadas para uso destas moléculas na histodiferenciação de embriões somáticos de *E. edulis* aliado ou não ao picloram. Nos experimentos 1 e 2, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, cujos tratamentos foram as diferentes concentrações de espermina ou espermidina (0, 50, 100 e 150 μM) combinadas ou não com picloram (150 μM). A espermidina isolada (150 μM) apresentou o maior número de embriões somáticos, uma maior presença das zonas de formação desses embriões, diferentes estádios e formas dessa estrutura, além da intensa formação de procâmbio, meristema apical, e, protoderme bem definida, esses fatores evidenciam a maior influência dessa poliamina na histodiferenciação de embriões somáticos da espécie *E. edulis*. Acrescenta-se que os embriões somáticos formados podem apresentar origem uni ou multicelular, de acordo com a presença ou ausência de células basais de corpo globoso, respectivamente, e, seu desenvolvimento é assíncrono.

Palavras-chave: juçara, cultura *in vitro*, embriogênese somática, segmentos de caulículo, reguladores de crescimento.

Abstract: *Euterpe edulis* Martius belonging to the Arecaceae family, being a palm that has slow germination, tall size and recalcitrant seeds, which, together with the threat of extinction caused by the exploitation of its sweet palm heart, justify the search for alternative propagation methods. Somatic embryogenesis appears in this scenario as a viable option, as it allows the production of numerous seedlings from just one explant, within this technique one of the steps is the induction and maturation of somatic embryos. During this phase, some molecules have been tested as growth regulators, such as polyamines, which interact with the endogenous content of the cell, stimulating embryogenic processes. In view of this, the objective was to verify the responsiveness of the polyamines, spermine and spermidine, and to define the appropriate concentrations for use of these molecules in the histodifferentiation of somatic embryos of *E. edulis* combined or not with picloram. In experiments 1 and 2, the experimental design was completely randomized, whose treatments were different concentrations of spermine or spermidine (0, 50, 100 and 150 μM) combined or not with picloram (150 μM). The isolated spermidine (150 μM) showed the highest number of somatic embryos, a greater presence of the formation zones of these embryos, different stages and forms of this structure, in addition to the intense formation of procambium, apical meristem, and well-defined protoderm, these factors show the greater influence of this polyamine on the histodifferentiation of somatic embryos of the *E. edulis* species. It is added that the formed somatic embryos can present unicellular or multicellular origin, according to the presence or absence of basal cells of the corpora globose, respectively, and, their development is asynchronous.

Keywords: juçara, *in vitro* culture, somatic embryogenesis, stem segments, growth regulators.

1 INTRODUÇÃO

Euterpe edulis Martius, popularmente conhecida como juçara, pertence à família Arecaceae, e, é nativa da Floresta Atlântica (LEAL et al., 2021), sendo encontrada principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil (GARCIA et al., 2019). Essa espécie está classificada como vulnerável na Lista Brasileira de Espécies Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2022), isso, devido a intensa exploração de seu palmito ocorrida desde o final da década de 60 (SCHULZ et al., 2016).

A exploração do palmito da espécie *E. edulis* acarreta a morte da planta, pois, essa não produz perfilhos e não possui capacidade de rebrota, sendo classificada como monocaule (BRANCALION et al., 2012). A incapacidade de rebrota da *E. edulis* reflete no fato dessa espécie ser propagada exclusivamente por meio de sementes. Esse fator, juntamente, com outros como a dificuldade de colheita, germinação lenta (SCHULZ et al., 2016), recalcitrância das sementes (GATTI et al., 2008) e a alta mortalidade de mudas durante os primeiros anos de produção (FANTINI; GURIES, 2007), justificam a busca por métodos alternativos de propagação.

A embriogênese somática (ES) é um método alternativo de propagação, enquadrado dentro das técnicas de cultivo *in vitro*. Nessa metodologia de propagação, células vegetativas indiferenciadas são induzidas a formar embriões somáticos, e, posteriormente plântulas normais (KONG et al., 2020). A ES é o tema mais explorado quando se refere a regeneração de plantas (FEHÉR, 2015), sendo importante salientar que a efetividade dessa técnica só ocorre devido a totipotencialidade das células vegetais, além disso, essa eficácia é dependente da combinação adequada de alguns fatores, por exemplo, tipos de explantes, meio de cultura, indutores e suas concentrações (FREITAS et al., 2016).

Ainda sobre a ES é importante salientar as etapas que essa técnica compreende, tendo como finalidade produzir plântulas normais a partir de embriões somáticos. Inicialmente, induz-se a proliferação de células embriogênicas, as quais são representadas pelos calos. Depois dessa etapa o objetivo é induzir e maturar embriões somáticos, possibilitando que essas estruturas histodiferenciem de acordo com sua classificação em mono ou

eudicotiledôneas. Posteriormente, a histodiferenciação dos embriões o propósito é regenerar plantas (KONG et al., 2020).

A maturação dos embriões somáticos é imprescindível para a eficácia da técnica de embriogênese somática. Nessa fase ocorrem alguns procedimentos como expansão celular, diferenciação e acúmulo de reservas, os quais são indispensáveis para a regeneração de embriões somáticos (VALE et al., 2018). Diversas são as moléculas utilizadas para estimular a maturação, os grupos de substâncias mais usuais são: reguladores de crescimento (RC) e polímeros (REIS et al., 2016).

Dentro do grupo dos reguladores de crescimento tem-se o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (PIC), molécula conhecida como auxina sintética e herbicida auxínico, que interage com o conteúdo endógeno das células, promovendo alterações no metabolismo dos ácidos nucleicos, e, na plasticidade e proliferação celular. O PIC vem sendo altamente utilizado com êxito na embriogênese somática de palmeiras (MELLO, 2022; OLIVEIRA et al., 2022), e em casos mais específicos na histodiferenciação dos embriões (HASSAN et al., 2021; FERREIRA et al., 2022).

Já em relação as poliaminas sabe-se que as mais utilizadas são espermina (SPM) e espermidina (SPD), e que essas moléculas são formadas por grupos amino que estão presentes em plantas e animais. E que, interagem com o conteúdo endógeno da célula (ácidos nucleicos, fosfolipídios, células componentes de paredes, proteínas e outros) a fim de estimular diversos processos embriogênicos, como a histodiferenciação de embriões. As principais moléculas desse grupo presentes nas plantas são: espermina, espermidina e putrescina (PUT) (REIS et al., 2016).

A hipótese dessa pesquisa refere-se a seguinte situação: as poliaminas podem ser promissoras para a fase de maturação da embriogênese somática de *E. edulis*, pois, essas moléculas podem estar intimamente relacionadas com a histodiferenciação do embrião (MINOCHA; MINOCHA; LONG, 2004). E a interação dessa molécula com o picloram pode refletir na maximização do número de embriões, isso, porque o PIC é facilmente absorvido, mobilizado e metabolizado em locais específicos da planta (KARUN et al., 2004). Diante disso, objetivou-se com este estudo averiguar a responsividade das poliaminas, espermina e espermidina, e, definir as concentrações adequadas para uso desta

molécula, aliada ou não ao picloram, na histodiferenciação de embriões somáticos de *E. edulis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Frutos imaturos (~180 dias após antese) de *E. edulis* foram colhidos em uma matriz silvestre localizada no distrito de Pedra Menina, o qual fica localizado na divisa dos municípios de Espera Feliz - MG e Dores do Rio Preto - ES, próximo ao Parque Nacional do Caparaó – Brasil, nas coordenadas 20° 31' 32,3" S e 41° 48' 34,8" W, e em uma altitude de 1.164 m. Essa matriz possui uma altura de 11,56 m e DAP (diâmetro na altura do peito medido a 1,30 m do nível do solo) de 15,4 cm. A colheita foi realizada com auxílio de tesoura de poda. E os frutos foram acondicionados imediatamente em caixas térmicas, para transporte ao Laboratório de Sementes Florestais e Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira (DCFM), Centro de Ciências Agrárias e Engenharia (CCAIE), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), onde realizou-se o experimento.

2.2 Germinação *in vitro*

Inicialmente, os frutos foram higienizados com água corrente, detergente neutro e hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (QBoa[®]) por 10 min e submetidos a descascamento manual. Depois da retirada do tegumento as sementes foram submersas em solução de ácido ascórbico 2% (Dinâmica[®]), com intuito de impedir a oxidação fenólica dos tecidos. Já em câmara de fluxo laminar desinfestou-se as sementes utilizando imersão em álcool etílico 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (QBoa[®]) por 10 min, e, em solução de amoxicilina 3 g L⁻¹ (Germed[®]) por 10 min. Após cada uma dessas etapas realizou-se tríplice lavagem com água destilada e autoclava.

Posteriormente, a desinfestação, as sementes foram acondicionadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Sigma[®]), suplemento com 30 g L⁻¹ de sacarose (Dinâmica[®]), 1 g L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona) (Synth[®]), 0,1 g L⁻¹ mioinositol (Sigma[®]), e, 5,5 g L⁻¹ de ágar (Kasvi[®]) (meio basal). Antes de acrescentar o ágar o pH do meio foi ajustado para 5,7±0,1 com KOH (Alphatec[®]) e/ou HCl (Vetec[®]) a 1,0 N. Os tubos, contendo apenas o meio, foram fechados com tampas rígidas de polipropileno, e, autoclavados a 120 °C/20 min. Depois de acondicionadas em tubos de ensaio autoclavados, as sementes foram mantidas em sala de

crescimento por seis meses sob temperatura de 27 ± 2 °C, no escuro, para evitar a oxidação dos tecidos.

2.3 Indução de calos

A indução de calos embriogênicos, ocorreu a partir de explantes seccionados de plântulas com seis meses de idade, originadas a partir das sementes imaturas germinadas *in vitro*. Essas plântulas foram segmentadas em quatro explantes (segmentos de caulículo), sempre desconsiderando o ápice e a base. Tais segmentos foram dispostos na horizontal em placas de polietileno (90 x 15 mm) (Global Trade Technology, Brasil®) contendo 20 mL de meio MS basal (Sigma®) suplementado, após autoclavagem, com 150 µM de picloram (Sigma®) filtrado (MELLO, 2022). Depois de dispostos em placas os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 120 dias, sem subcultivos.

2.4 Indução e maturação de embriões somáticos

Os calos embriogênicos obtidos na indução foram transferidos para um novo meio de cultura MS basal suplementado com diferentes concentrações de espermina (Sigma®) (0, 50, 100 e 150 µM) ou espermidina (Sigma®) (0, 50, 100 e 150 µM), combinadas ou não com picloram (Sigma®) (150 µM). Durante a fase de indução e maturação os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C no escuro, por 90 dias. E analisou-se as seguintes características no tempo 0 e 90 dias de maturação: área do calo (AC) (mm²); número de embriões (NE); massa do calo (mg) (MC), e, taxa de crescimento (TC) ((área do calo com 90 dias de maturação - área do calo com 0 dias de maturação)/100)(%).

Amostras das diferentes concentrações estudadas da poliamina (50, 100 e 150 µM) aos 90 dias, sem adição de picloram, que demonstrou os melhores resultados foram encaminhadas para análise histológica.

2.5 Análises histológicas

Para realização dos estudos anatômicos as amostras foram desidratadas em série etílica, embebidas em metacrilato (Historesin®, Leica), e seccionadas de forma transversal e longitudinal numa espessura de 5 µm, com auxílio de um micrótomo de rotação automática (RM2155, Leica), equipado com navalha de

vidro descartável. As amostras também foram coradas quando expostas ao azul de toluidina, por 15 min, em pH 4,0 (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). As lâminas para análise foram confeccionadas em resina sintética (Permout[®]), e, a análise e a fotodocumentação foram realizadas em microscópio de luz (Olympus-AX 70) acoplado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo), disposto no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.6 Delineamento experimental

O delineamento utilizado nesse experimento foi o inteiramente casualizado, sendo dividido em dois experimentos para cada poliamina estudada, cujos tratamentos foram as diferentes concentrações de espermina ou espermidina (0, 50, 100 e 150 μM) combinadas ou não com picloram (150 μM). Ambos os experimentos possuíam cinco repetições de quatro segmentos de caulículo cada. Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de F ($p < 0,05$), e, análise de Scott-Knott ($p < 0,05$) com auxílio do software R (R CORE TEAM, 2022).

3 RESULTADOS

3.1 Espermina

Os calos embriogênicos que foram transferidos para maturação em meio MS acrescido com espermina (0, 50, 100 e 150 μM), combinada ou não com picloram (150 μM), apresentaram aos 90 dias taxa de crescimento, estatisticamente diferente das demais, para o tratamento controle (0,27%) (Figura 1a). Nesse mesmo período para MC (g) e NE não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 1b, d). Já para AC (mm^2) os valores superiores, estatisticamente diferente dos demais, foram observados nos tratamentos controle (61,69 mm^2), SPM (50 μM) (60,90 mm^2), SPM (50 μM) + PIC (51,62 mm^2), e, SPM (100 μM) + PIC (53,17 mm^2) (Figura 1c).

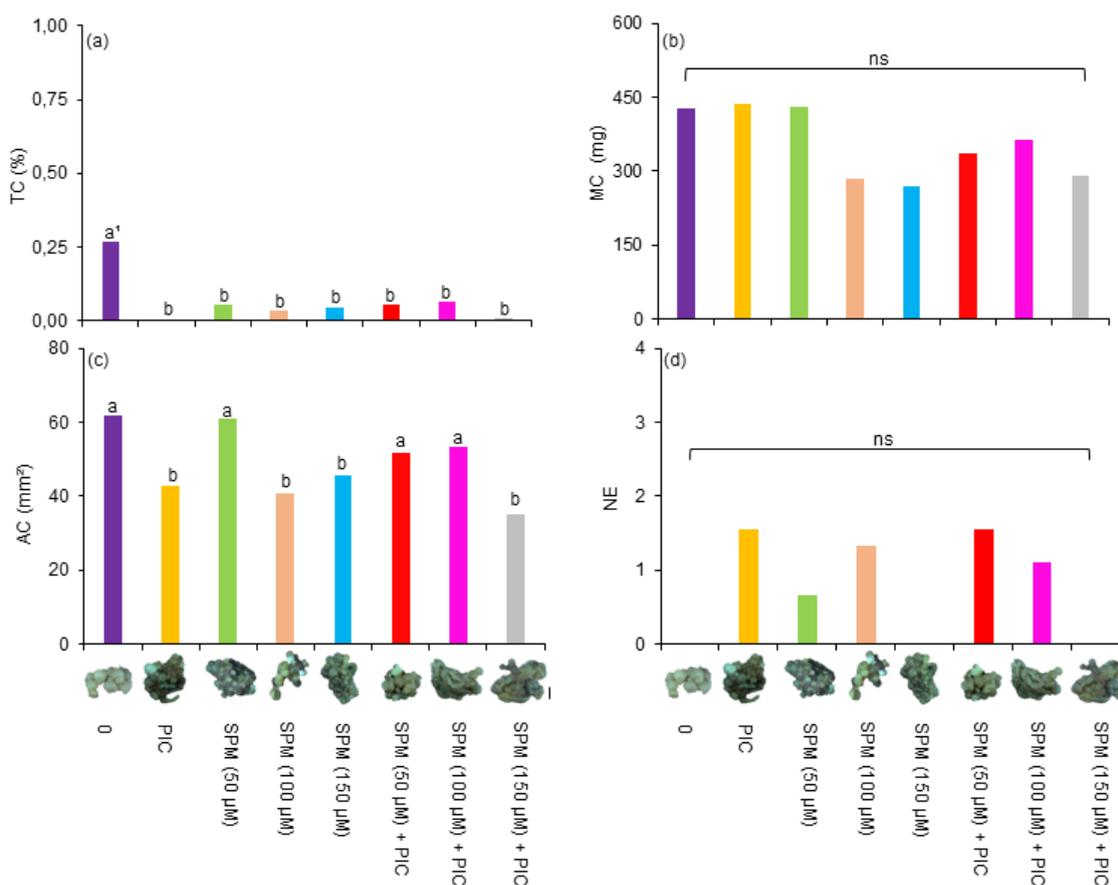


Figura 1. Indução de embriões somáticos de *E. edulis*, decorridos 90 dias de estabelecimento, em meio MS acrescido com espermina (SPM) (0, 50, 100 e 150 μM) combinada ou não com PIC (150 μM). (a) Taxa de crescimento (TC - %). (b) Massa do calo (MC - mg). (c) Área do calo (AC - mm^2). (d) Número de embriões (NE). ¹Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ($p < 0,05$). *Significativo ($p < 0,05$) e ^{ns}Não significativo pelo teste F. Barra de escala: 0,2 cm.

Fonte: a autora.

Enfatizando a variável NE tem-se que os calos embriogênicos transferidos para meio de maturação acrescido com PIC (150 μ M) (Figura 2a, b, c), SPM (50 μ M) (Figura 2d, e, f), SPM (100 μ M) (Figura 2g, h, i), SPM (50 μ M) + PIC (Figura 2j, k, l), e SPM (100 μ M) + PIC (Figura 2m, n, o) apresentaram embriões somáticos histodiferenciados. Com destaque para o tratamento SPM (100 μ M) + PIC, que apresentou embriões em fases distintas, globular, escutelar e coleoptilar, no mesmo calo embriogênico (Figura 2o), o que delimita o crescimento assíncrono.

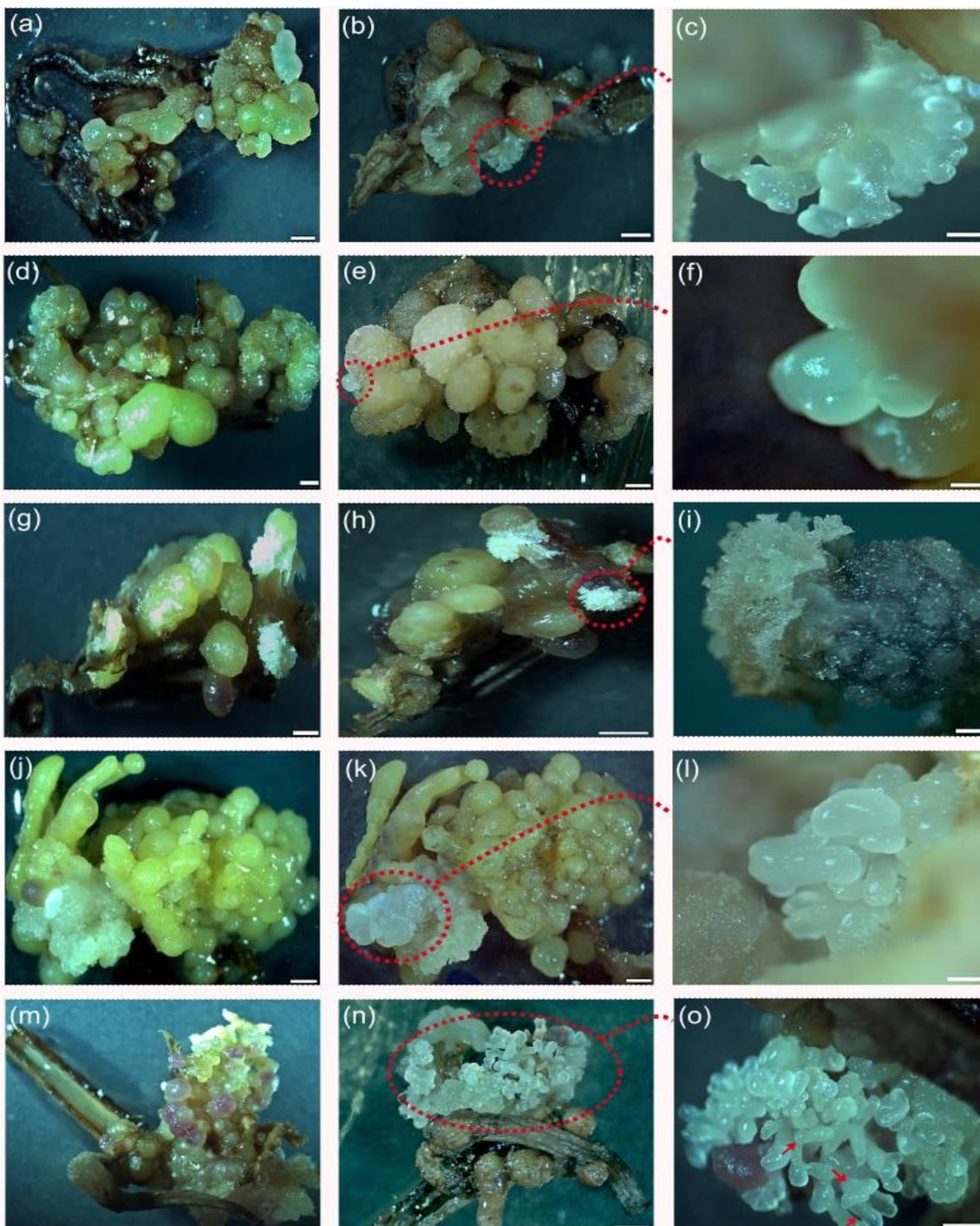


Figura 2. Embriões somáticos originados a partir de calos embriogênicos de *E. edulis*. (a) Calo embriogênico recém transferido para meio acrescido com PIC (150 μM). (b) Evolução do calo embriogênico em meio suplementado com PIC (150 μM) passados 90 dias de maturação. (c) Em destaque, cluster de embriões somáticos originados no tratamento PIC (150 μM). (d) Calo embriogênico recém estabelecido em meio acrescido com SPM (50 μM). (e) Desenvolvimento do calo embriogênico em meio suplementado com SPM (50 μM), 90 dias após o estabelecimento. (f) Em destaque, embrião globular originado no tratamento SPM (50 μM). (g) Calo embriogênico recém inserido em meio acrescido com SPM (100 μM). (h) Evolução do calo embriogênico no tratamento SPM (100 μM) com 90 dias de maturação. (i) Em destaque, cluster de embriões somáticos originados no tratamento SPM (100 μM). (j) Calo embriogênico inserido, recentemente, em meio acrescido com SPM (50 μM) + PIC. (k) Desenvolvimento do calo embriogênico 90 dias depois do estabelecimento em meio contendo SPM (50 μM) + PIC. (l) Em destaque, cluster de embriões somáticos originados no tratamento SPM (50 μM) + PIC. (m) Calo embriogênico com 0 dias de estabelecimento em meio suplementado com SPM (100 μM) + PIC. (n) Evolução do calo embriogênico decorridos 90 dias de maturação em meio acrescido com SPM (100 μM) + PIC. (o) Em destaque, cluster de embriões somáticos originados no tratamento SPM (100 μM) + PIC, com diferentes estágios de desenvolvimento (seta vermelha) globular, escutelar e coleoptilar, respectivamente. Barras de escala: 1000 μm (a, b, e, g, h, j, k, m, n); 200 μm (c, f, l); 500 μm (d, o); 20 μm (i).

Fonte: a autora.

3.2 Espermidina

Os calos embriogênicos que foram transferidos para maturação em meio MS acrescido com espermidina (0, 50, 100 e 150 μM), combinada ou não com picloram (150 μM), também apresentaram aos 90 dias taxa de crescimento, estatisticamente diferente das demais, para o tratamento sem adição de reguladores de crescimento (0,27%) (Figura 3a). MC (mg) (Figura 3b), AC (mm^2) (Figura 3c) e NE (Figura 3d) não demonstraram diferença estatística entre os tratamentos. Sendo importante considerar que nesse experimento apenas o tratamento controle não originou embriões somáticos e, que o uso de SPD (150 μM) apresentou maior valor médio do número de embriões (Figura 3d).

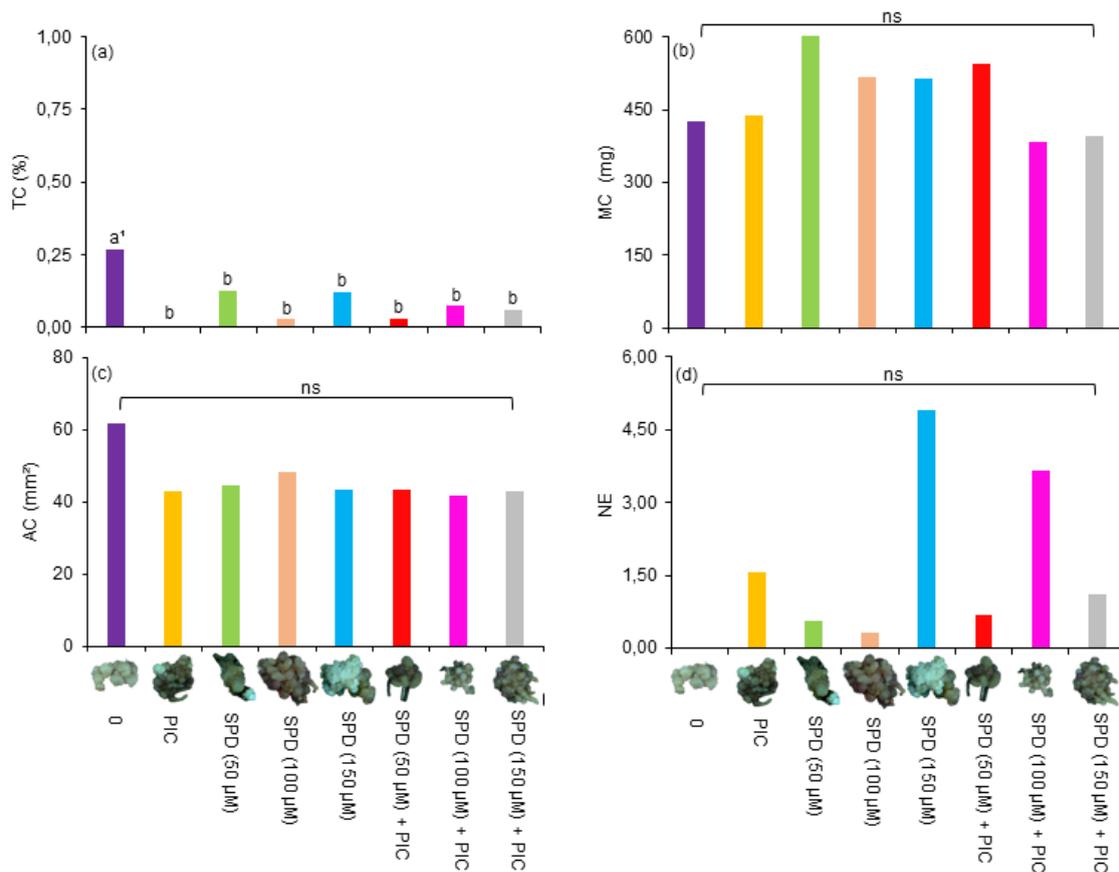


Figura 3. Indução de embriões somáticos de *E. edulis*, decorridos 90 dias de estabelecimento, em meio MS acrescido com espermidina (SPD) (0, 50, 100 e 150 µM) combinada ou não com PIC (150 µM). (a) Taxa de crescimento (TC - %). (b) Massa do calo (MC - mg). (c) Área do calo (AC - mm²). (d) Número de embriões (NE). ¹Médias não seguidas da mesma letra diferem entre si, pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ($p < 0,05$). *Significativo ($p < 0,05$) e ^{ns}Não significativo pelo teste F. Barra de escala: 0,2 cm.

Fonte: a autora.

A formação de embriões somáticos, após 90 dias de indução, ocorreu de forma assíncrona na concentração de espermidina (150 µM), sendo possível observar embriões em diferentes fases de desenvolvimento em um mesmo calo embriogênico (Figura 4a), globulares (Figura 4b), escutelares (Figura 4d) e coleoptilares (Figura 4e), e, em transição entre estádios (Figura 4c).

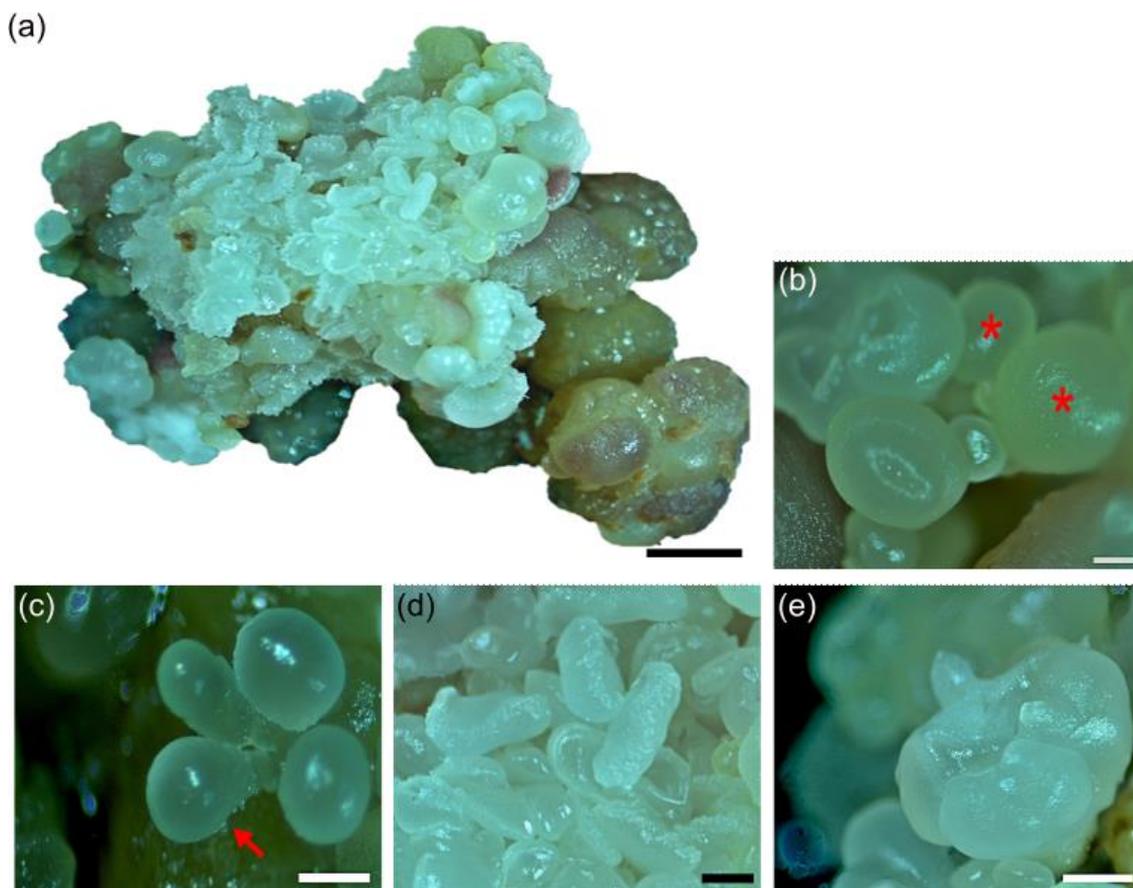


Figura 4. Maturação de embriões somáticos de *E. edulis*, decorridos 90 dias de estabelecimento, em meio MS acrescido com espermidina (150 μM). (a) Calo embriogênico. (b) Embriões somáticos globulares (asterisco). (c) Embrião somático em transição para escutelar (seta). (d) Embriões somáticos escutelares. (e) Embrião somático coleoptilar. Barras de escala: 1000 μm (a); 20 μm (b-d); 50 μm (e).

Fonte: a autora.

A concentração de espermidina (50 μM) apresentou cluster de embriões somáticos (Figura 5a, b), calos embriogênicos com células em intensa divisão, e, zonas parenquimatosa e meristemática bem definidas (Figura 5c). Nessa concentração, observou-se embriões globulares com presença de células basais de corpo globoso, meristema fundamental, protoderme bem delimitada, e, início da formação do procâmbio e do meristema apical da parte aérea (Figura 5d). Além de embrião somático escutelar com presença de protoderme, meristema apical da raiz, e da parte aérea com intensa divisão celular e formação dos primórdios foliares (Figura 5e, f).

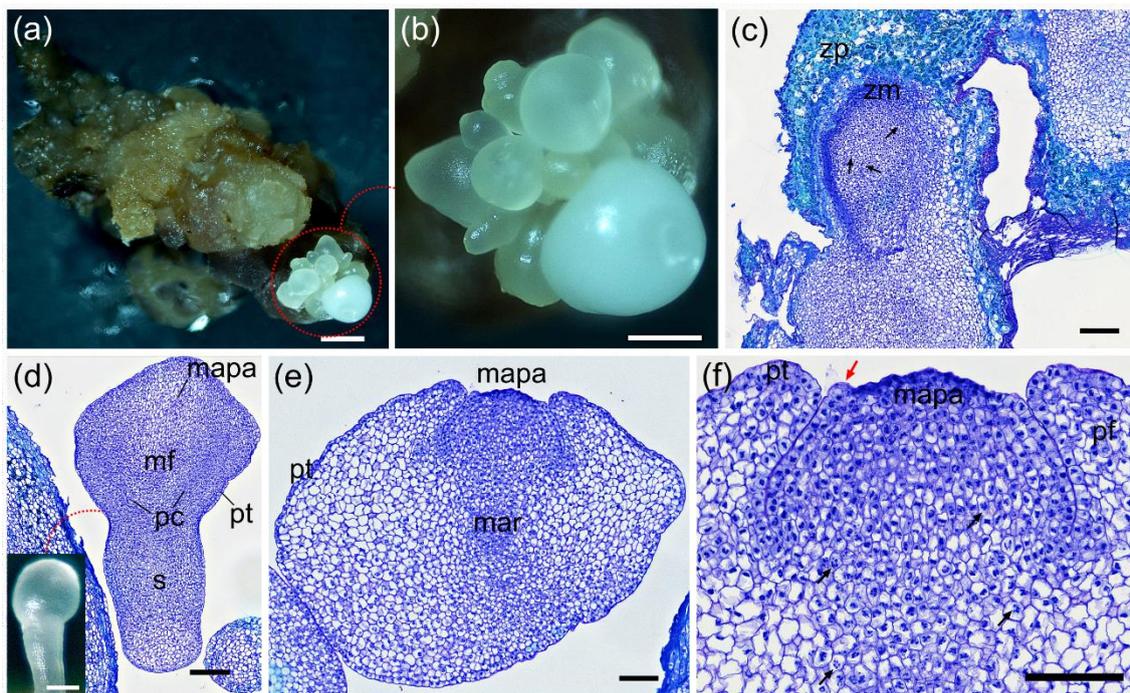


Figura 5. Histodiferenciação de embriões somáticos de *E. edulis*, oriundos de calos de segmentos de caulículos maturados durante 90 dias em meio de cultura suplementado com espermidina (50 μ M). (a) Calo embriogênico. (b) Em destaque, cluster de embriões somáticos. (c) Histologia do calo embriogênico, com células em divisão (setas). (d) Embrião somático em estágio globular, com presença de células basais de corpo globoso. (e) Embrião escutelar. (f) Aproximação do meristema apical da parte aérea do embrião escutelar, processo de divisão celular (setas pretas) e formação dos primórdios foliares (*pf*, seta vermelha). *zp* zona parenquimatosa, *zm* zona meristemática, *mapa* meristema apical da parte aérea, *mf* meristema fundamental, *pc* procâmbio, *pt* protoderme, *s* célula basal de corpo globoso, *mar* meristema apical da raiz, *pf* primórdio foliar. Barras de escala: 1000 μ m (a); 500 μ m (b); 100 μ m (c, d, e); 50 μ m (f).

Fonte: a autora.

Por sua vez, na concentração de espermidina (100 μ M) observou-se calos embriogênicos nodulares e alongados (Figura 6a), e, embriões somáticos com presença de células basais de corpo globoso (Figura 6b). Com a análise histológica foi possível observar a formação de calos nodulares rompendo a zona parenquimatosa (Figura 6c), com zonas e centros meristemáticos bem delimitados (Figura 6d). Sendo importante salientar que, quando desconectados do tecido inicial os calos nodulares demonstraram intensificação de sua divisão celular (Figura 6e).

Os calos alongados possuíam meristema fundamental, procâmbio, elementos de vaso, zonas parenquimatosas e meristemáticas (Figura 6f). Foi

possível observar também nesses calos embriogênicos, a formação de proembriões, e embriões globulares com formação da protoderme e rompimento da zona parenquimatosa do calo (Figura 6g, h). Em todas as partes dos tecidos embriogênicos foram observados compostos fenológicos (Figura 6e, f, i).

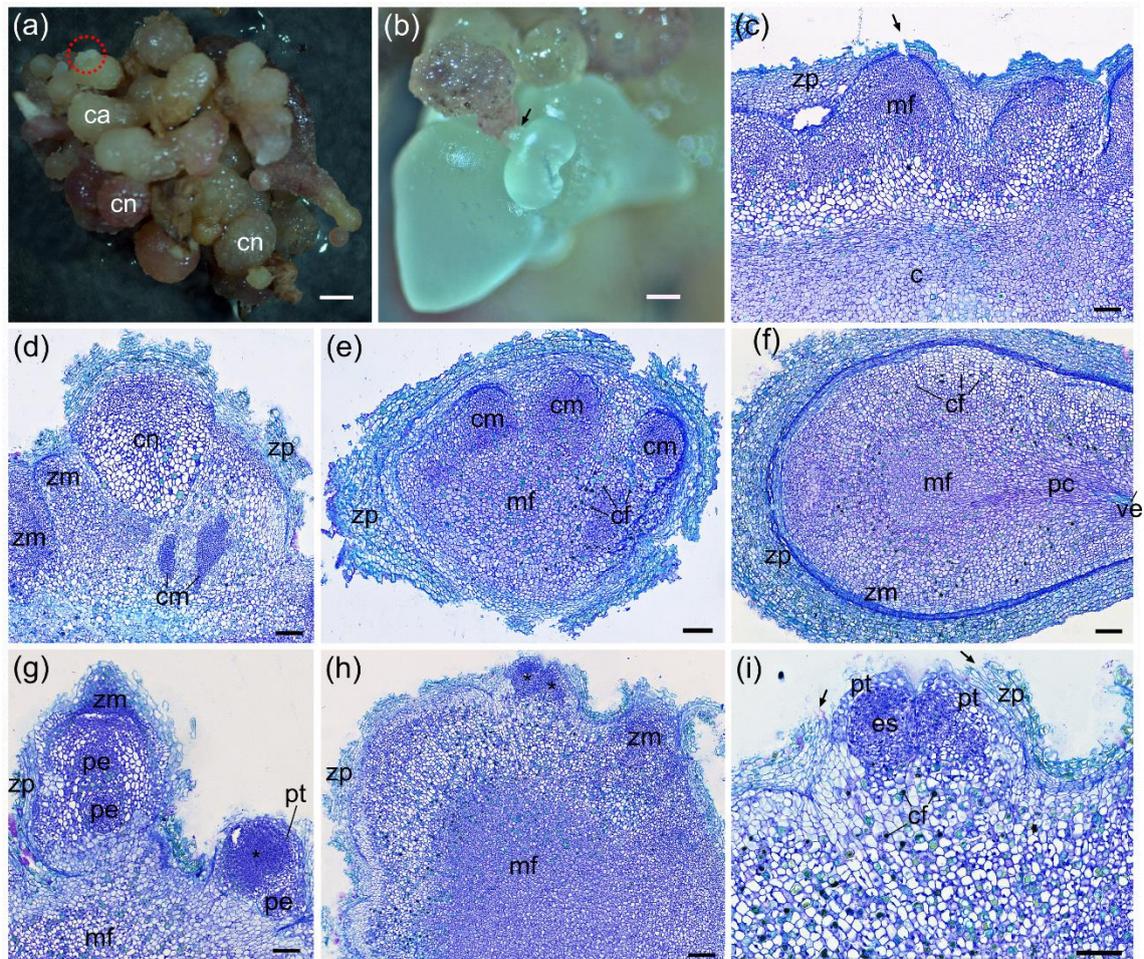


Figura 6. Histodiferenciação de embriões somáticos de *E. edulis*, oriundos de calos de segmentos de caulículos maturados durante 90 dias em meio de cultura suplementado com espermidina (100 μ M). (a) Calos embriogênicos nodulares e alongados, com destaque, cluster embriogênico (tracejado vermelho). (b) Embriões somáticos com presença de células basais de corpo globoso (seta). (c) Histologia da formação de calos nodulares, rompendo zona parenquimatosa (seta). (d) Calo nodular conectado ao calo inicial. (e) Calo nodular desconectado, com centros meristemáticos com intensa divisão celular. (f) Calo alongado. (g) Formação de proembriões e embrião somático globular (*) com início da formação da protoderme. (h) Calo embriogênico com embriões somáticos globulares. (i) Embriões somáticos globulares rompendo a zona parenquimatosa (seta). *ca* calo alongado, *cn* calo nodular, *zp* zona parenquimatosa, *mf* meristema fundamental, *c* calo, *zm* zona meristemática, *cm* centro meristemático, *cf* composto fenólico, *pc* procâmbio, *ve* elemento de vasos, *pt* protoderme, *pe* proembrião, *es* embrião somático. Barras de escala: 1000 μ m (a); 200 μ m (b); 100 μ m (c-i).

Fonte: a autora.

Já na concentração espermidina (150 μM) observa-se um maior número de embriões somáticos dispostos no calo embriogênico (Figura 7a, b). Nos cortes histológicos é possível observar uma maior presença das zonas de formação de embriões somáticos e da protoderme (Figura 7c, d, e). Detecta-se também, o desprendimento do embrião somático globular do calo (Figura 7f).

Além disso é possível observar embriões somáticos em diferentes estádios e formas (histodiferenciados), com presença e ausência de células basais de corpo globoso, protoderme bem definida, formação do procâmbio e meristemas apicais (Figura 7g-i). Esses fatores, juntamente, com a presença dos embriões somáticos em aglomerados (Figura 7h, i) evidenciam a superioridade desse tratamento.

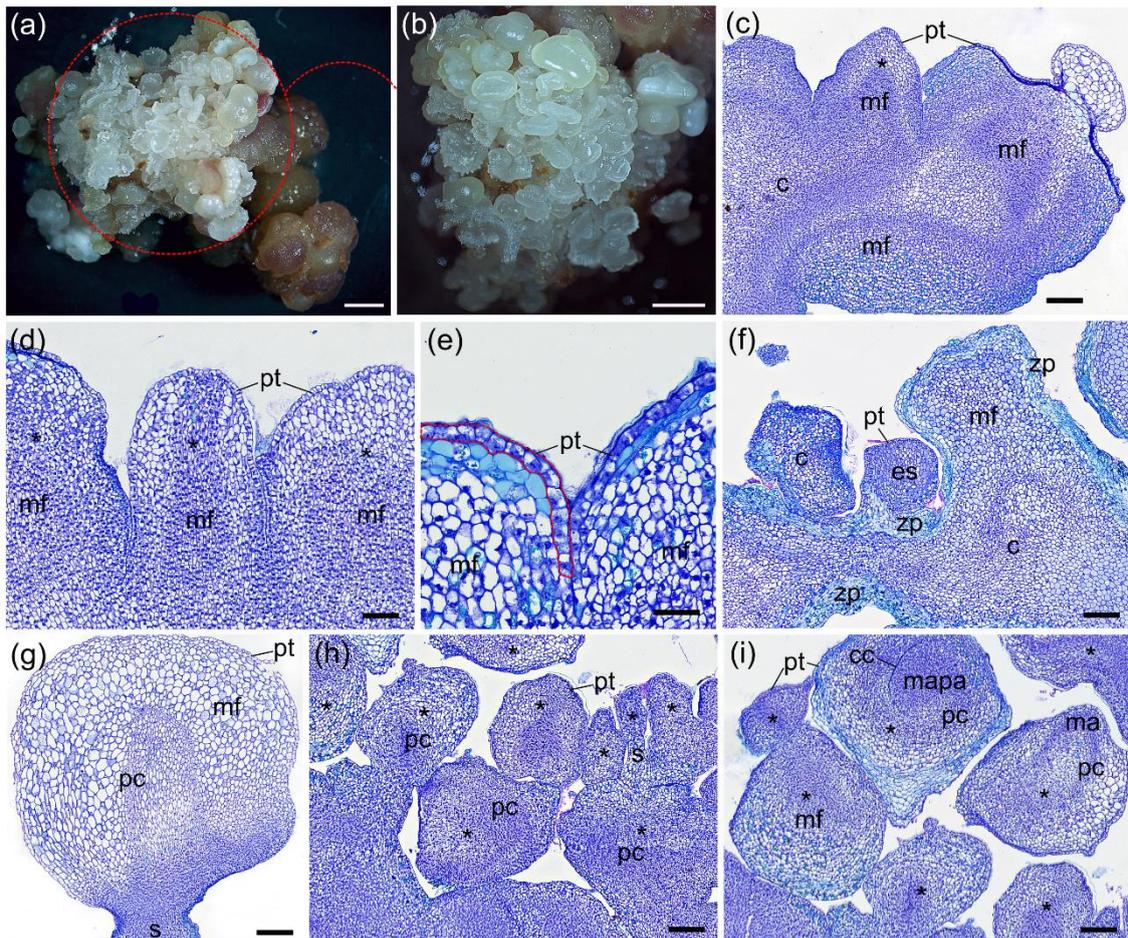


Figura 7. Histodiferenciação de embriões somáticos de *E. edulis*, oriundos de calos de segmentos de caulículos maturados durante 90 dias em meio de cultura suplementado com espermidina (150 μ M). (a) Calo embriogênico. (b) Em destaque, embriões somáticos. (c, d) Histologia do calo com a formação de embrião somático (*). (e) Destaque da formação da protoderme ao redor do embrião. (f) Embrião somático globular se despreendendo do calo. (g) Embrião somático globular com presença de células basais de corpo globoso e formação de procâmbio. (h, i) Aglomerados de embriões somáticos de diferentes formas e estádios. *c* calo, *mf* meristema fundamental, *pt* protoderme, *es* embrião somático, *zp* zona parenquimatosa, *pc* procâmbio, *s* célula basal de corpo globoso, *cc* cavidade cotiledonar, *ma* meristema apical, *mapa* meristema apical da parte aérea. Barras: 1000 μ m (a, b); 50 μ m (e); 100 μ m (c, d, f - i).

Fonte: a autora.

4 DISCUSSÃO

Os calos embriogênicos de *E. edulis* dispostos em placas de Petri contendo meio MS sem suplementação apresentaram aos 90 dias de cultivo maior taxa de crescimento, entretanto, nesse mesmo período tornaram-se não embriogênicos com evidente escurecimento dos tecidos. O estímulo a expansão dos calos é proporcionado normalmente sem fitohormônio, o que valida seu crescimento nessas condições, porém, a persistência desse cenário pode acarretar o declínio da capacidade embriogênica dos calos (VON ARNOLD et al., 2002). Isso é corroborado por Stefenon et al. (2020) que ao revisarem a embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze evidenciaram que a ausência de RC no período de expansão acarretou a oxidação dos tecidos, e, conseqüentemente, reduziu o potencial embriogênico dos calos dessa espécie.

O uso de espermina (150 μM) isolada e combinada com PIC (150 μM) não promoveu o surgimento de embriões somáticos para a espécie *E. edulis*, e as outras concentrações analisadas (50 e 100 μM) não diferiram estatisticamente do tratamento controle, não sendo, portanto, essa poliamina considerada eficiente para indução dos embriões somáticos em juçara. Segundo Jayashree et al. (2003), na regeneração de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. também observaram que maiores concentrações de espermina promoveram redução na porcentagem de embriões somáticos, esses autores testaram as seguintes concentrações de SPM (1, 2, 3, 4 e 5 mg L^{-1}), em que 2 mg L^{-1} foi superior, com 58% de embriões somáticos.

Por sua vez, todas as concentrações de espermidina (50, 100 e 150 μM) combinadas ou não com PIC (150 μM) originaram embriões somáticos de *E. edulis*, o que demonstra a eficácia dessa poliamina na indução destes embriões. Isso pode ser explicado com base no estudo de Liu et al. (2005) com *Citrus sinensis* Osbeck, que evidenciaram a maior expressão dessa poliamina durante a fase de maturação da embriogênese somática, com pico durante o estágio embrionário globular, sugerindo então a influência positiva dessa molécula na histodiferenciação dos embriões somáticos. Não obstante a isso, tem-se que o maior NE originado nos calos embriogênicos de *E. edulis* foi encontrado para SPD (150 μM), o que torna essa concentração superior as demais no processo de histodiferenciação de embriões somáticos de juçara. Esse resultado não pode

ser considerado para outras espécies, já que para *Cocus nucifera* L. as menores concentrações das poliaminas PUT (até 7,5 mM), SPD (até 0,05 μ M) e SPM (até 0,01 μ M) demonstravam-se superiores para a formação dos embriões somáticos dessa espécie (ADKINS et al., 2005).

A SPD apresenta-se em maior teor nas sementes de *E. edulis*, durante a degradação de reservas de sementes zigóticas e formação de plântulas, quando comparada a SPM e PUT, a 10, 60, e 180 dias após a germinação (COSTA, 2023). Isso pode justificar o fato dessa molécula ser requerida também em maior concentração durante a indução e a histodiferenciação dos embriões somáticos de *E. edulis*, pois, essa substância pode ser um fator limitante no controle de eventos morfogenéticos como formação de plântulas e de embriões somáticos. Durante o cultivo *in vitro* de *Curcuma longa* L. a PUT é encontrada em altos teores, diferentemente, de SPM e SPD, o que insere nesse caso a primeira poliamina citada como fator limitante para a formação de calos e raízes nessa espécie (VIU et al., 2009).

Os embriões originados nos dois experimentos possuem desenvolvimento assíncrono sendo esse fato considerado comum para as palmeiras do gênero *Euterpe* (GUERRA; HANDRO, 1988; 1998; LEDO et al., 2002; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016; FERREIRA et al., 2022; MELLO, 2022; OLIVEIRA et al., 2022).

Os calos embriogênicos de *E. edulis* dispostos em meio suplementado com SPD (50 μ M) apresentaram divisão celular caracterizada por grupos isolados de duas células, que representam a formação dos proembriões, os quais irão formar, posteriormente, os embriões somáticos de origem unicelular (CORREDOIRA; VALADARES, VIEITEZ, 2006). Além disso, o crescimento desses calos está relacionado com a presença das zonas meristemáticas (SCHWENDIMAN; PANNETIER, MICHAUX-FERRIERE, 1988).

Acrescenta-se que na concentração de SPD (50 μ M) detectou-se embriões somáticos globulares com início da formação procambial, tal associação entre essas estruturas e as células citadas vem sendo realizada também por outros autores em pesquisas com diferentes espécies como *Daucus carota* L. (GUZZO et al., 1994) e *Bactris gasipaes* Kunth (ALMEIDA et al., 2012). Os embriões citados anteriormente possuem células basais de corpo globoso, por isso considera-se sua origem como unicelular (SHARMA; MILLAM, 2004),

essas estruturas foram observadas também em *Euterpe oleracea* Mart. (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2016).

Ainda na concentração de SPD (50 μ M) tem-se a formação do embrião escutelar de *E. edulis* com meristema apical da parte aérea e raiz bem definidos, o que facilita a emissão futura dessas estruturas, impedindo a germinação precoce, caracterizada pela emissão de apenas um meristema, e, reflexo da histodiferenciação ineficiente dos embriões somáticos (FERREIRA et al., 2022). Esses embriões apresentavam também primórdios foliares assim como os embriões zigóticos de *Elaeis guineensis* (Jacq.) (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010).

Por sua vez, na concentração de SPD (100 μ M) observou-se calos embriogênicos nodulares e alongados de *E. edulis*, o que foi percebido também para *Elaeis guineensis*, var. *Pisifera* (ALMEIDA et al., 2020). Nessa concentração, assim como para SPD (50 μ M), embriões somáticos com células basais de corpo globoso foram formados, evidenciando a origem unicelular dessas estruturas (SHARMA; MILLAM, 2004), entretanto, não se pode descartar a ascendência multicelular, pois, pequenos centros meristemáticos são observados embutidos nos calos iniciais de *E. edulis*, o que possibilita a ocorrência de fusões, sendo esse fato observado também para *Euterpe precatoria* Mart (FERREIRA et al., 2022).

Os elementos de vaso presentes nos calos alongados de *E. edulis* na concentração de SPD (100 μ M) sinalizam a diferenciação do procâmbio, sendo esse processo semelhante para *E. precatoria*. Por último, tem-se que compostos fenólicos foram observados em todas as regiões embriogênicas dos tecidos de *E. edulis* o que pode estar relacionado com o processo oxidativo (FERREIRA et al., 2022) iniciado nos calos embriogênicos dessa espécie após 90 dias de estabelecimento em meio de maturação.

Por fim, na concentração de SPD (150 μ M) é possível observar um maior número de células embriogênicas, e, embriões somáticos, em diferentes estádios de desenvolvimento, o que indica que essa poliamina produz efeitos superiores na histodiferenciação de embriões somáticos de *E. edulis*. Além disso, nota-se também nessa concentração o desprendimento do embrião globular do calo, a presença ou ausência de células basais de corpo globoso, e um aglomerado dessas estruturas. A dissociação do embrião do calo inicial

indica a facilidade em separar essas estruturas (FERREIRA et al., 2022), que é requerida para dar continuidade ao respectivo processo de propagação. A presença de células basais de corpo globoso está relacionada com a origem unicelular (SHARMA; MILLAM, 2004), e, a inexistência com a ancestralidade multicelular (FERREIRA et al., 2022), o que indica uma origem variável para os embriões somáticos de *E. edulis*.

5 CONCLUSÕES

A espermina (50 e 100 μM) combinada ou não com picloram (150 μM) apesar de ter originado embriões somáticos não foi considerada estatisticamente diferente dos demais tratamentos, não sendo, portanto, recomendada para induzir essas estruturas em *E. edulis*.

Entretanto, a espermidina isolada (150 μM) demonstrou número de embriões estaticamente superior aos demais tratamentos (50 e 100 μM) durante a indução e maturação de *E. edulis*. Nessa concentração foi possível detectar a maior presença de zonas de formação de embriões somáticos, histodiferenciados, além da intensa presença de procâmbio, meristemas, e, aglomerados de embriões, o que reafirma a superioridade desse tratamento.

Tem-se ainda que os embriões somáticos de *E. edulis* gerados na presença de qualquer uma das poliaminas demonstraram desenvolvimento assíncrono.

6 REFERÊNCIAS

ADKINS S. W. et al. Coconut (*Cocos nucifera*) in vitro ecology: modifications of headspace and medium additives can optimize somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, v. 692, p. 21-32, 2005.

ALMEIDA, M. de. et al. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1495-1515, 2012.

ALMEIDA, R. F. et al. Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. *Pisifera*) from immature leaf tissues. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 229-239, 2020.

BRANCALION, P. H. S et al. Soil-mediated effects on potential *Euterpe edulis* (Arecaceae) fruit and palm heart sustainable management in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 284, p. 78-85, 2012.

BRASIL. Instrução normativa nº 148, de 07 de dezembro de 2022. Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 dez. 2022. Seção 1, p. 282.

CORREDOIRA, E.; VALLADARES, S.; VIEITEZ, A. M. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 525-533, 2006.

COSTA, J. S. **Degradação de reservas bioquímicas e hormonais durante a germinação *in vitro* de sementes imaturas e poliaminas associadas ou não ao picloram na embriogênese somática de *Euterpe edulis* Martius.** 2023. 92 f. Dissertação – (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2023.

FANTINI, A. C.; GURIES, R. P. Forest structure and productivity of palmitero (*Euterpe edulis* Martius) in the Brazilian Mata Atlântica. **Forest Ecology and Management**, v. 242, p. 185-194, 2007.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, p. 385-402, 2015.

FERREIRA, J. C. B. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of the palm tree *Euterpe precatoria* Mart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 148, p. 667-686, 2022.

FREITAS, E. O. de. et al. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açai palm (*Euterpe oleracea*): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p. 126-135, 2016.

GARCIA, J. A. A. et al. Chemical composition and biological activities of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit by-products, a promising underexploited source of high-added value compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 325-332, 2019.

GATTI, M. G. et al. Frost resistance in the tropical palm *Euterpe edulis* and its pattern of distribution in the Atlantic Forest of Argentina. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 633-640, 2008.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of *Euterpe edulis* mart. (Palmae): Control and structural features. **Journal of Plant Research**, v. 111, p. 65-71, 1998.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 550-552, 1988.

GUZZO, F. et al. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 1427-1432, 1994.

HASSAN, M. M. et al. High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from date palm immature inflorescences using picloram. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, p. 1-11, 2021.

JAYASHREE, R. et al. Genetic transformation and regeneration of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) transgenic plants with a constitutive version of an anti-oxidative stress superoxide dismutase gene. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 201-209, 2003.

KARUN, A. et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). **Current Science**, v. 86, p. 1623-1628, 2004.

KONG, E. Y. Y. et al. Cell suspension culture: A potential *in vitro* culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 1-19, 2020.

LEAL, A. et al. Landscape-scale forest loss shapes demographic structure of the threatened tropical palm *Euterpe edulis* mart. (Arecaceae). **Forest Ecology and Management**, v. 502, p. 1-8, 2021.

LEDO, A. D. S. et al. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 601-603, 2002.

LIU, H. Y. et al. Changes in polyamine levels in *Citrus sinensis* Osb. cv. Valencia callus during somatic embryogenesis. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 31, p. 275-280, 2005.

MELLO, T. de. **Desenvolvimento, maturação e germinação *in vitro* de sementes, e embriogênese somática de *Euterpe edulis* Mart.** 2022. 266 f. Tese – (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2022.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S. C.; LONG, S. Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 572-580, 2004.

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

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and select methods.** Melbourne: Termarcarphi Pty, 1981, 45p.

OLIVEIRA, L. B. et al. Morphoanatomical aspects of auxin herbicides-induced somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius, a symbol and threatened species of the Atlantic Forest. **Scientia Horticulturae**, v. 299, p. 1-13, 2022.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing.** Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<https://www.rproject.org/>>. Acesso em: 29 jun. 2022.

REIS, R. S. et al. Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, p. 170-179, 2016.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 109, p. 501-508, 2012.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 378-385, 2010.

SCHULZ, M. et al. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 89, p. 14-26, 2016.

SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIERE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, p. 43-52, 1988.

SHARMA, S. K.; MILLAM, S. Embriogênese somática em *Solanum tuberosum* L.: um exame histológico dos principais estágios de desenvolvimento. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 115-119, 2004.

STEFENON, V. M. et al. Advances and constraints in somatic embryogenesis of *Araucaria angustifolia*, *Acca sellowiana*, and *Bactris gasipaes*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 241-263, 2020.

VALE, E. M. et al. Morphological analyses and variation in carbohydrate content during the maturation of somatic embryos of *Carica papaya*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, p. 295-305, 2018.

VIU, A. F. M. et al. Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L. **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 501-504, 2009.

VON ARNOLD, S. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

A massa seca das sementes imaturas de *E. edulis* reduziu ao longo do período pós-germinação, enquanto as variáveis morfológicas apresentaram acréscimo em seus valores médios. As reservas endospermicas das sementes de *E. edulis* são degradadas e translocadas para o eixo vegetativo, o acréscimo dos valores médios da eficiência de uso de reservas, juntamente, com a redução na massa seca das sementes, comprovam essa afirmação. Dentre as principais reservas das sementes, tem-se que as proteínas estão intimamente relacionadas com o processo germinativo, já, os carboidratos, amidos e lipídios interferem principalmente na formação das plântulas.

Os carboidratos estruturais manose e glicose estão presentes no endosperma das sementes de *E. edulis* em maior porcentagem. E os hormônios encontrados no pós-germinação dessas sementes, são zeatina, AIA e ABA. Sendo que a zeatina possui efeito inibitório sobre a dormência provocada pelo ABA. O endosperma das sementes começa a apresentar sinais de deterioração aos 120 DAG, na sequência aos 180 DAG a massa seca das sementes apresenta redução significativa, e, a umidade acréscimo. Também aos 180 DAG o haustório começa a apresentar sinais de senescência, demarcando o final do período de degradação de reservas da espécie *E. edulis*.

A espermidina (150 μ M) apresentou o maior número de embriões somáticos durante a indução e maturação da espécie *E. edulis*. Nessa concentração observou-se aglomerados de zonas de formação de embriões, em diferentes estádios de desenvolvimento, além da intensa formação de procâmbio e meristemas, o que afirma a influência positiva dessa poliamina durante a indução e histodiferenciação dos embriões somáticos de *E. edulis*. Os embriões formados possuíam ou não células basais de corpo globoso, o que indica uma origem variável (uni ou multicelular) para essas estruturas. Por fim, tem-se que o desenvolvimento desses embriões foi classificado como assíncrono.