

UnB – Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

**Fisiologia da germinação *in vitro*, embriogênese somática e conservação *ex situ* de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng)**

**Emília Ordones Lemos Saleh**

Brasília, 2016

UnB – Instituto de Biologia  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

**Fisiologia da germinação *in vitro*, embriogênese somática e conservação *ex situ* de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng)**

**Emília Ordones Lemos Saleh**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UnB como requisito à obtenção do título de Doutor.

ORIENTADOR: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Brasília, 2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SSA163

f

SALEH, EMILIA O L

Fisiologia da germinação in vitro, embriogênese somática e conservação ex situ de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) / EMILIA O L SALEH; orientador JONNY E SCHERWINSKI-PEREIRA. -- Brasília, 2016.  
133 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Botânica) --  
Universidade de Brasília, 2016.

1. Arecaceae. 2. armazenamento de semente. 3. embrião zigótico. 4. embrião somático. 5. perfil metabólico. I. SCHERWINSKI-PEREIRA, JONNY E, orient. II. Título.

## Folha de Aprovação

Tese de Doutorado apresentada por Emília Ordones Lemos Saleh, com o título: Fisiologia da germinação *in vitro*, embriogênese somática e conservação *ex situ* de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UnB como requisito à obtenção do título de Doutor.

A Tese foi aprovada em sua forma final pela comissão julgadora instituída pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da UnB.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

---

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira (Presidente)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Departamento de Botânica, IB/UnB

---

Dra. Cristiane da Silva Ferreira (Membro interno)  
Departamento de Botânica, IB/UnB

---

Dra. Sarah Cristina C. Oliveira (Membro interno)  
Departamento de Botânica, IB/UnB

---

Dr. João Batista Teixeira (Membro externo)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Dra. Vanessa Cristina Stein (Membro externo)  
UFSJ – Campus Centro-Oeste, Divinópolis, MG

---

Dra. Regina Beatriz Bernd (Membro externo, Suplente)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

*Ao meu pai, Saleh, meu maior incentivador,*

*Ao Carlos, meu apoio incondicional*

*Ao João Pedro e à Maria Carolina, minhas razões de viver*

*A todas as mães pesquisadoras*

## Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, porque sem Ele nada seria possível.

A meu orientador, Jonny Everson Scherwinski-Pereira, que me acolheu como aluna de pós-graduação em seu laboratório, me orientou e me auxiliou de forma contínua ao longo deste período.

A todos os professores do PPG-Botânica da UnB, àqueles que contribuíram de alguma forma nesse processo, seja durante as disciplinas ou durante as etapas de defesa do projeto e de qualificação. Especialmente ao professor Thomas C. R. Williams, pelo auxílio fundamental nas análises bioquímicas e aos professores do estágio de docência: Cristiane da Silva Ferreira, Sarah Cristina Caldas Oliveira e Antônio Carlos Torres.

Aos técnicos dos laboratórios de Anatomia: Jéssika Paula S. Vieira, de Bioquímica: Juliana Bezerra de Melo e de Fisiologia Vegetal: Fábio Nakamura. Às secretárias da PPG-Botânica, particularmente Sarah Lee.

Aos colegas de pós-graduação do PPG-Botânica, com quem convivi, mesmo que brevemente, ao longo do período relativo ao Doutorado, especialmente Silvia D. da Costa Fernandes, Angélica Gaag, Nayra Bomfim, Thiago Moreira e Estela Andrade.

A todos os alunos de graduação e pós-graduação que passaram pelo Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, dentre os quais: Daiane G. Ribeiro, Elínea Oliveira, Fernanda Furlan, Filipe Sathler, Giuliano Frugeri, Glória Almeida, Hugo Gomes, Inaê Mariê A. Silva, Leandro Gomes, Luanna Pena, Luciana Lacerda, Nero Carlos, Patrícia Bartos, Paulo César, Rafaela Liz, Raphael F. Almeida, Rayssa Archeti, Samanta Campos, Stênio Steferson, Talita Balzon e Tatiane Monteiro, a quem agradeço pelo constante ambiente de amizade e coleguismo.

Agradeço a Filipe Sathler pela confecção das pranchas e ao Dr. Nelson Oliveira pelo auxílio com as análises estatísticas.

Agradeço especialmente às minhas amigas (que se auto-denominam “Luluzinhas”): Gabriela Nogueira, Jaqueline Vasconcelos, Jenifer Nogueira e Zanderluce Gomes Luis que me auxiliaram nos aspectos técnicos e profissionais relativos à pesquisa, e, principalmente, nos aspectos pessoais, ajudando a superar todos os desafios inerentes ao Doutorado.

Ao André Xavier de Souza, analista do LCT II, pelo pronto auxílio e paciência ao longo desses mais de quatro anos.

Ao Dr. João Batista Teixeira, por suas inúmeras contribuições a esta pesquisa que, durante a avaliação do projeto e dos resultados parciais, sem hesitar, colocou à nossa disposição sua enorme experiência em cultura de tecidos.

Aos pesquisadores Marcelo M. Cavallari, da EMBRAPA Cocais, em São Luís-MA, e Paulo C. C. Fernandes, da EMBRAPA Meio Norte, em Teresina-PI, pelo fornecimento das sementes para os experimentos; e às quebradeiras de coco babaçu do Piauí e do Maranhão.

À EMBRAPA e à UnB, instituições cuja parceria permitiu que esse trabalho fosse realizado.

À Universidade Estadual do Piauí (UESPI), minha casa, de onde sempre tive total apoio para alçar voos mais altos e aos meus colegas de profissão e amigos que sempre acreditaram em mim.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pela concessão da bolsa de Doutorado.

À minha família de Minas Gerais: meus pais, Saleh e Aparecida, minhas irmãs, cunhados e queridos sobrinhos e à minha família do Piauí: minha sogra, D. Antônia, minhas cunhadas, cunhados, sobrinhos queridos e minhas afilhadas do coração. Agradeço a compreensão pela longa ausência, pelos raros telefonemas e conversas.

Por último, porém não menos importante, agradeço ao Carlos, meu marido e companheiro e a João Pedro e Maria Carolina, meus filhos, por terem vivenciado comigo esta jornada, com tudo o que ela traz de bom e de ruim.

O meu “Muito obrigada” a todos porque eu jamais teria conseguido sem o apoio de vocês!

## Resumo

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng) é uma palmeira oleaginosa nativa do Brasil, fonte de diversas matérias-primas para as indústrias cosmética e alimentícia, de cujas amêndoas se extrai um óleo com amplas aplicações, inclusive para a produção de biodiesel, além de ser importante para as populações das regiões Norte e Nordeste. Os estudos básicos relativos à germinação, à regeneração e à conservação desta palmeira são essenciais para ajudar a compreender aspectos reprodutivos deste importante recurso genético. Este trabalho teve por objetivo estudar a germinação *in vitro* de *Attalea speciosa*, considerando os aspectos fisiológicos, morfo-anatômicos e bioquímicos, determinar um protocolo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos e determinar o comportamento de armazenamento das sementes, bem como as melhores condições de conservação *ex situ*. A biologia reprodutiva de babaçu foi investigada quanto aos aspectos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos e metabólicos da germinação *in vitro*. O crescimento e desenvolvimento do cotilédone e da plântula foram avaliados durante 0, 7, 14, 21, 30, 45, 90 e 120 dias de cultivo *in vitro*. As massas fresca e seca e o comprimento das estruturas da plântula foram determinados ao longo do período de germinação. Verificou-se que a germinação ocorreu lentamente, com o crescimento contínuo do cotilédone até os 45 dias, período a partir do qual surgiram os catafilos e o eófilo, seguidos da raiz primária. A análise do perfil metabólico e dos ácidos graxos permitiu confirmar que proteínas e lipídios são as principais reservas utilizadas pelo cotilédone no início da germinação, quando são degradados, liberando aminoácidos, glicerol e ácidos graxos livres. Visando reproduzir vegetativamente a espécie, o primeiro protocolo para embriogênese somática foi desenvolvido, a partir de embriões zigóticos. O meio de cultivo de MS com sais e vitaminas foi utilizado como meio básico, acrescido de L-glutamina ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), L-cisteína ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e sacarose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e de auxinas para indução de calos primários e embriogênicos. A concentração de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D, em meio básico, sem adição de carvão ativado, permitiu a formação de embriões somáticos em 80% dos calos embriogênicos e levou à obtenção o maior número de embriões formados por calo, após seis meses de indução. Em meio sem auxina, os embriões somáticos obtidos foram diferenciados, maturados e convertidos em plantas completas ao final de 12 meses. A conservação de sementes de *Attalea speciosa* com 5% de umidade foi testada em quatro temperaturas ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $6 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e quatro períodos de armazenamento (0, 90, 180 e 360 dias). Os testes de germinação pós-conservação foram realizados a partir do resgate e cultivo dos embriões zigóticos *in vitro*. Verificou-se uma queda significativa nas taxas de germinação nos materiais mantidos na



temperatura de 25 °C após 360 dias. Os resultados obtidos com esse trabalho sugerem que, por tolerar dessecação abaixo de 5% e conservação a baixas temperaturas (-196 °C, -20 °C), situações nas quais não houve redução nas taxas de germinação, as sementes de *Attalea speciosa* apresentem um comportamento de armazenamento ortodoxo. Os resultados aqui apresentados são os primeiros dados de perfil metabólico relatados para o embrião durante a germinação de uma palmeira, além de ser o primeiro protocolo desenvolvido para embriogênese somática e determinação do comportamento de armazenamento e condições de conservação para *Attalea speciosa*.

**Palavras chaves:** Arecaceae, armazenamento de semente, embrião zigótico, embrião somático, perfil metabólico, ortodoxo, 2,4-D.

## Abstract

The babassu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng) is a native oleaginous palm from Brazil, source of many raw materials to food and cosmetic industries, from whose seeds can be extracted an oil with many applications, including the production of biofuel and that, besides, is important for the people who live in North and Northeast regions of the country. Basic studies concerning the germination, regeneration and conservation of this palm tree are essential to the comprehension of reproductive aspects of this important genetic resource. The reproductive biology of the babassu was investigated in studies approaching physiological, morphological, biochemical and metabolic aspects of the *in vitro* germination. Growth and development of cotyledon and of seedling structures were evaluated during 0, 7, 14, 21, 30, 45, 90 and 120 days of *in vitro* culturing. Fresh and dry masses and the length of seedling structures were established along the germination time. It was found that the germination occurred slowly, with the continuous growth of the cotyledon until 45 days, moment from which the cataphylls and the eophyll emerged, followed by the primary root. The metabolite profile and fatty acids analysis allowed the confirmation that proteins and lipids are the main reserve used by the cotyledon in the beginning of the germination, when they are degraded, releasing amino acids, glycerol and free fatty acids. Attempting to the vegetative reproduction of the specie resulted in the development of the first protocol for the somatic embryogenesis, from zygotic embryos. The MS culture medium with salts and vitamins was used as basic medium, complemented with L-glutamine (0.5 g.L<sup>-1</sup>), L-cysteine (0.1 g.L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g.L<sup>-1</sup>) and auxins for the primary and embryogenic callus induction. The 2,4-D concentration of 2.5 mg.L<sup>-1</sup>, on basic medium, without activate charcoal, allowed the formation of somatic embryos on 80% of the embryogenic calli and the achievement of the greatest number of somatic embryos per callus, after six months of induction. The somatic embryos obtained were differentiated, matured and converted to full plants on a medium without auxins, after 12 months. The seed conservation of *Attalea speciosa*, with 5% of water content was tested under four temperatures (-196 °C, -20 °C, 6 °C e 25 °C) and four periods of conservation time (0, 90, 180 e 360 days). The germination tests post-conservation were made from the zygotic embryo rescue and culturing *in vitro*. There was a significant reduction on the germination rates from the materials that were kept on the temperature of 25 °C after 360 days. The results achieved from this work imply that, tolerating desiccation below 5% of humidity and conservation under low temperatures (-196 °C, -20 °C), situations where there was no reduction on the germination rates, the *Attalea speciosa* seeds show a storage behavior

orthodox. The results presented here are the first data of metabolite profile for a palm embryo during germination, besides, this is the first somatic embryogenesis protocol and a reliable determination of the storage behavior and of conservation conditions *for Attalea speciosa*.

**Key-words:** Arecaceae, metabolite profile, orthodox, seed storage behavior, somatic embryo, zygotic embryos, 2,4-D

## I. Lista de Figuras

### Revisão Bibliográfica

**Figura 1:** O babaçu: aspecto geral da planta adulta no BAG em Teresina; cacho com frutos maduros; frutos maduros e sem o epicarpo; fruto maduro em corte longitudinal mostrando a semente e o embrião.....4

### Capítulo I

**Figura 1:** Aspecto geral da árvore, fruto e semente de *Attalea speciosa*.....51

**Figura 2:** Etapas da germinação e estabelecimento da plântula de babaçu *in vitro*.....59

**Figura 3:** Comprimento médio do cotilédone, da parte aérea e da raiz primária durante 120 dias, após o início da germinação do babaçu e valores acumulados do número de plântulas que apresentaram emergência da parte aérea e da raiz primária.....60

**Figura 4:** Massa fresca e seca (em mg) e teor de umidade (em %) ao longo de 120 dias de germinação de embriões zigóticos de babaçu *in vitro*.....61

**Figura 5:** Teores de amido e açúcares solúveis totais (AST) durante a germinação de babaçu *in vitro*. (MS: massa seca).....62

**Figura 6:** Abundância relativa de glicerol, mio-inositol e carboidratos a partir do perfil metabólico durante a germinação de embriões isolados de babaçu *in vitro*.....63

**Figura 7:** Teor de ácidos graxos durante a germinação de embriões zigóticos de babaçu *in vitro*.....65

**Figura 8:** Cortes anatômicos do embrião de babaçu.....70

**Figura 9:** Fotomicrografias dos testes histoquímicos em cortes microseriados de embrião zigóticos de babaçu (*Attalea speciosa*).....71

**Figura 10:** Seções histológicas da porção apical do cotilédone durante os eventos de germinação de embriões zigóticos *in vitro* de babaçu.....73

**Figura 11:** Seções histológicas da porção basal do cotilédone durante os eventos de germinação de embriões zigóticos *in vitro* de babaçu.....76

## Capítulo II

**Figura 1:** Explante inicial e resultado da formação de calos primários a partir de embriões zigóticos maduros de babaçu, com altas concentrações de auxinas.....92

**Figura 2:** Aspecto dos tipos de calos formados a partir de embriões zigóticos de babaçu submetidos a tratamentos com 225  $\mu$ M de Picloram, após 6 meses de cultivo.....94

**Figura 3:** Aspecto dos calos e embriões somáticos formados a partir de embriões zigóticos de babaçu induzidos em meio com 225  $\mu$ M de Picloram.....95

**Figura 4:** Caracterização anatômica dos calos e estruturas embriogênicas de babaçu durante a embriogênese somática, em cortes longitudinais.....101

**Figura 5:** Cortes histológicos do embrião somático de babaçu (estádio de torpedo) e de estrutura embriogênica em estágio inicial de formação, no sentido longitudinal.....103

**Figura 6:** Etapas na formação e maturação dos embriões somáticos de babaçu.....105

**Figura 7:** Desenvolvimento de embriões somáticos de babaçu e conversão à plântula em resposta de indução por 2,4-D.....106

## Capítulo III

**Figura 1:** Avaliação do tempo de dessecação de sementes e embriões zigóticos de babaçu em estufa a 104 °C, com determinação da umidade (% de massa fresca) a cada 12h....121

- Figura 2:** Germinação de embriões zigóticos de babaçu isolados e cultivados *in vitro*, até oito dias de dessecação em sílica gel, em função do teor de umidade das sementes e dos embriões.....122
- Figura 3:** Plântulas de babaçu germinadas *in vitro* aos 2 meses, após 180 dias de conservação sob temperatura de 25 °C.....123
- Figura 4:** Plantas de babaçu aclimatizadas após a conservação e germinação *in vitro*.....126
- Figura 5:** Medidas das estruturas formadas durante a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu: cotilédone, parte aérea e raiz, após a conservação das sementes em diferentes períodos de tempo (0, 180 e 360 dias) e temperaturas (-196 °C, -20 °C, 6 °C e 25 °C), após 4 meses de cultivo.....127

## II. Lista de Tabelas

### Capítulo I

- Tabela 1:** Germinação de embriões zigóticos de babaçu *in vitro*, na presença ou ausência de carvão ativado e na presença ou ausência de luz.....57
- Tabela 2:** Variação na abundância relativa de compostos detectados pelo perfil metabólico: aminoácidos, ácidos orgânicos e amina ao longo da germinação de embriões zigóticos e estabelecimento da plântula de babaçu; o tempo 0 (1,0) foi utilizado como referência para o cálculo de abundância relativa.....68

### Capítulo II

- Tabela 1:** Avaliação de resposta à indução e formação de calos a partir de embriões zigóticos de babaçu com diferentes concentrações de auxinas: Picloram e 2,4-D, avaliados após 4 meses de indução.....93
- Tabela 2:** Ocorrência (% de explantes) dos diferentes tipo de calos induzidos a partir do embrião zigótico de babaçu, após 6 meses de cultivo na presença de Picloram, em função da região do embrião e da concentração da auxina.....95
- Tabela 3:** Efeito de baixas concentrações de 2,4-D e Picloram na porcentagem de explantes que responderam à indução, nas porcentagens de calos formados, de calos embriogênicos e na média de embriões somáticos formados por calo, após quatro meses em meio de indução e de cinco meses em meio de diferenciação e maturação, durante a embriogênese somática de babaçu, a partir de embriões zigóticos maduros.....97
- Tabela 4:** Ocorrência (% de explantes) de diferentes tipo de calos induzidos a partir do embrião zigótico de babaçu inteiro ou seccionado, após 6 meses de indução na presença de Picloram e 2,4-D, em função da região do embrião zigótico e da concentração das auxinas testadas.....98

**Tabela 5:** Frequência (%) de explantes que responderam à indução ou à germinação, frequência de formação de estruturas embriogênicas e média dos números de estruturas embriogênicas formadas nos calos embriogênicos, após 6 meses de indução na presença de 2,4-D ou Picloram, na concentração de 13,4  $\mu\text{M}$  e 6 meses de diferenciação/maturação.....99

### Capítulo III

**Tabela 1.** Efeito de diferentes temperaturas e períodos de tempo de conservação de sementes de babaçu sobre a germinação do embrião zigótico *in vitro*, em percentagem (%)..124



### III. Lista de Abreviaturas

<b>2,4-D</b>	ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
<b>2iP</b>	2-isopenteniladenina
<b>6-BA</b>	6-benziladenina
<b>ABA</b>	ácido abscísico
<b>AG</b>	ácido giberélico
<b>AIA</b>	ácido 3-indol-acético
<b>AIB</b>	ácido indol-butírico
<b>ANA</b>	ácido naftaleno acético
<b>CA</b>	carvão ativado
<b>DW</b>	massa seca do inglês: <i>dry weight</i>
<b>ES</b>	embriogênese somática
<b>EZ</b>	embrião zigótico
<b>GA</b>	giberelina
<b>GC/MS</b>	cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa do inglês: <i>Gas-chromatography–mass-spectrometry</i>
<b>KIN</b>	cinetina
<b>LEA</b>	proteínas de embriogênese tardia do inglês: <i>late embryogenesis abundant</i>
<b>MSTFA</b>	N-Metil-N-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamida
<b>NE</b>	não embriogênico
<b>Picloram</b>	ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
<b>TCP</b>	tris-2-clorometil fosfato
<b>TDZ</b>	tiazuron

## Sumário

Resumo.....	v
Abstract .....	vii
I. Lista de Figuras .....	ix
II. Lista de Tabelas.....	xii
III. Lista de Abreviaturas .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. O babaçu .....	3
2.2. A germinação em palmeiras .....	6
2.3. Propagação vegetativa e cultura de tecidos .....	9
2.4. Embriogênese somática .....	10
2.5. Conservação de Recursos Genéticos .....	24
2.6. Análises complementares em Fisiologia Vegetal .....	29
2.7. Referências Bibliográficas .....	32
3. CAPÍTULOS .....	47
Capítulo I: Fisiologia da germinação e estabelecimento da plântula de babaçu ( <i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng) <i>in vitro</i> : aspectos morfoanatômicos, bioquímicos e histoquímicos .....	48
Capítulo II: Embriogênese somática e regeneração de plantas de babaçu ( <i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng) a partir de embriões zigóticos .....	84
Capítulo III: Conservação <i>ex situ</i> de sementes de babaçu ( <i>Attalea speciosa</i> Mart. ex Spreng): determinação do comportamento e das condições fisiológicas e ambientais mínimas de armazenamento .....	114

## 1. INTRODUÇÃO

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng) é uma palmeira perene oleaginosa e nativa do Brasil (Miranda et al., 2001). As matas de babaçu são encontradas nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil (Lorenzi et al., 2010). Nestas regiões, essa palmeira é utilizada como fonte de alimentos e matéria-prima para a construção de barcos, pontes e casas e na ornamentação de jardins e praças (Santelli et al., 2009). O babaçu tem grande importância econômica para os Estados do Maranhão e Piauí, onde é explorado nos núcleos familiares de forma extrativista, e grande parte dos recursos vegetais desta planta é utilizada para a subsistência (Souza et al., 2011).

Uma característica importante do babaçu é a produção de frutos ao longo de quase todo o ano, dos quais se utilizam os principais componentes: epicarpo, mesocarpo, endocarpo e amêndoa (semente) (Miranda et al., 2001). O epicarpo é utilizado na confecção de vasos tipo “xaxim”; o mesocarpo é fonte de carboidratos, bastante nutritivo e o endocarpo é um excelente carvão vegetal (FAPEPI, 2010). Da amêndoa é extraído um óleo utilizado na alimentação humana, na produção de sabão, na medicina tradicional e na indústria de cosméticos (FAPEPI, 2010). Atualmente, esse óleo tem despertado interesse devido ao seu potencial como biodiesel (Lima et al., 2007).

Apesar do grande potencial de utilização do babaçu, cujos produtos derivados têm diversas aplicações, a exploração desta planta ainda hoje ocorre de forma extrativista e artesanal (Campos; Ehringhaus, 2003; Lima, 2009; FAPEPI, 2010). Os estudos básicos sobre essa palmeira são escassos e publicados em veículos regionais e de pouco acesso à comunidade científica. Aspectos como a ecologia, reprodução e fisiologia desta planta foram pouco estudados até o presente. Estas informações são importantes para o manejo sustentável das populações de babaçu, quaisquer que sejam as suas aplicações no futuro, além disso, estudos de germinação auxiliam na compreensão da interação entre palmeiras e seu ambiente natural (Neves et al., 2013).

Algumas particularidades do ciclo de vida do babaçu e de outras palmeiras, como o longo período de juvenilidade e a existência de um único meristema apical, que torna a propagação exclusiva por meio de sementes, limitam os estudos de características de interesse agrônomico e a seleção dessas características (Te-Chato e Hilae, 2007). O coqueiro (*Cocos nucifera* L.), uma palmeira perene pertencente à Subtribo Attaleinae (Tribo Cocosae), a mesma do babaçu, é propagado exclusivamente por sementes e tem na

cultura de tecidos uma alternativa viável para sua propagação vegetativa, para fim de reprodução vegetativa (Perera et al., 2007).

Há um vasto potencial de recursos ainda não explorados a partir de sementes oleaginosas que crescem em muitas partes do mundo, incluindo o babaçu. Quando geridas de forma cientificamente e economicamente competente, tais fontes de óleo a partir de sementes não tradicionais terão impacto na crescente demanda por essa importante fonte de energia renovável (Mitei et al., 2008).

O desenvolvimento de tecnologias viáveis para a produção de plantas de interesse econômico pode contribuir para o estabelecimento de plantações comerciais, que podem facilitar a produção de frutos e o uso sustentável do babaçu (Neves et al., 2013). Acredita-se que estudos de propagação *in vitro* constituam uma forma de viabilizar estratégias reprodutivas mais rápidas e eficientes, garantindo a aquisição de conhecimentos sobre a planta e a geração de tecnologias que poderão, no futuro, transformar o babaçu em uma importante cultura do ponto de vista do desenvolvimento sustentável das regiões onde a espécie ocorre.

Além disso, é necessário complementar as poucas informações sobre a germinação, o comportamento de armazenamento e condições de conservação para esta espécie, importante recurso genético para o desenvolvimento das regiões Norte e Nordeste do país.

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo estudar a germinação *in vitro* de *Attalea speciosa*, considerando os aspectos fisiológicos, morfo-anatômicos e bioquímicos, determinar um protocolo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos e determinar o comportamento de armazenamento das sementes, bem como as melhores condições de conservação *ex situ*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O babaçu

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng) pertence à família Arecaceae, que compreende as plantas conhecidas como palmeiras, características de regiões tropicais e subtropicais (Dransfield et al., 2008). As palmeiras são espécies chave para comunidades frugívoras e oferecem recursos para polinizadores como também são importantes para as pessoas, especialmente em comunidades rurais, porque fornecem material utilizado na construção, em fábricas, na obtenção de alimento, combustível, medicamentos e na ornamentação (Eisehardt et al., 2011).

A subfamília Arecoideae é a maior e mais diversa dentro da família Arecaceae, com cerca de 50% das espécies, que apresentam um grau excepcional de endemismo, marcadamente nas Américas e na região Indo-Pacífica. Algumas das mais importantes palmeiras do ponto de vista econômico estão entre as Arecoideae, entre elas o dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), o coco da Bahia (*Cocos nucifera* L.), a palmeira de betel (*Areca catechu* L.), a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e muitas outras espécies de importância no comércio local ou global (Baker et al., 2011).

O gênero de *Attalea* Kunth é um dos mais importantes da subfamília Arecoideae, com ocorrência em toda a região neotropical, desde o México ao Paraguai, passando por Bolívia, Brasil e o Caribe (Fava et al., 2011). Após ampla revisão, na qual foram renomeadas espécies incluídas entre os gêneros *Scheelea* e *Orbignya*, contam-se 72 espécies de *Attalea* nas Américas (Govaerts et al., 2011; WCSP, 2011; Tropicos, 2012).

No Brasil são encontradas 41 espécies de *Attalea* e destas, 19 são endêmicas. O babaçu está associado principalmente às fitofisionomias: floresta amazônica, mata atlântica e cerrado, e algumas espécies de caatinga. As espécies de *Attalea* são encontradas desde as regiões Centro-Oeste até o Norte e Nordeste do Brasil (Lorenzi et al., 2010). *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng (sinonímia *Orbignya phalerata*, WCSP, 2011), objeto desse estudo, tem ampla distribuição na América do Sul e no Brasil, é encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Pará, Piauí e Tocantins (Tropicos, 2012).

*Attalea speciosa* possui um caule solitário de 10 a 30 m de altura e inflorescências pistiladas e hermafroditas na mesma planta, raramente em plantas diferentes. As plantas de

*A. speciosa* florescem continuamente ao longo do ano e os frutos amadurecem durante a estação da seca (Lorenzi et al., 2010) (Figura 1A e B).

Os frutos do babaçu são oblongos-elipsóides, lisos, com cerca de 6,0 cm de diâmetro, de coloração marrom na maturidade (Figura 1C,D). A época de frutificação do babaçu ocorre durante o ano todo, sendo que o pico da produção ocorre nos meses de agosto a janeiro e cada planta pode produzir até 6 cachos (de 4 a 6 racemos) contendo dezenas de frutos, que, quando maduros, desprendem-se e caem no solo (Miranda et al., 2001).



**Figura 1:** *Attalea speciosa*: A) aspecto geral da planta adulta no Banco Ativo de Germoplasma em Teresina, PI; B) cacho com frutos maduros; C) frutos maduros (esquerda) e sem o epicarpo; D) fruto maduro em corte longitudinal mostrando a semente e o embrião (seta). Quadrículas: 1x1 cm. (A, D – E. O. L. Saleh; B, C – Lorenzi et al., 1996)

A planta de babaçu pode ser aproveitada por inteiro, podendo sua exploração resultar em mais de 60 produtos (FAPEPI, 2010). O fruto de babaçu apresenta elevado valor nutricional e pode ser dividido nas seguintes partes: epicarpo: a parte mais externa, com fibras que podem ser empregadas no artesanato e processo de pirogenação para obtenção de carvão reativado; mesocarpo: consiste numa camada de amido de excelente qualidade, alto valor nutritivo, dietético e até medicinal; endocarpo: consiste num tecido rico em feixes vasculares, fibras e parênquima de preenchimento, extremamente duro devido á lignificação das fibras. O mesmo tem textura grã-fina e grande vocação para a conversão em carvão e pode ser utilizado na refinação de acetatos, obtenção de ácido acético e utilização do carvão redutor e como fonte de calor para outros fins (Tenório,

1982). As amêndoas: constituem cerca de 6% do peso do fruto e apresentam mais de 60% de óleo, sendo o ácido láurico ( $C_{12}H_{24}O_2$ ) o principal ácido graxo presente (Lima et al., 2007). É o principal produto extraído do babaçu e o que possui maior valor mercantil e industrial. O número de amêndoas em cada fruto pode variar de 3 a 5, sendo que pouco se sabe sobre a sua formação (Lorenzi et al., 2010).

As amêndoas estão envoltas pelo endocarpo, separadas umas das outras por septos bastante resistentes. Estudos morfométricos obtiveram medidas de comprimento longitudinal, de perímetro, de massa, de volume, densidade e espessura entre o epicarpo e o mesocarpo. Dentre estes parâmetros, o mais relacionado com o número de amêndoas no fruto foi a massa. As amêndoas pesam, em média, de 3 a 4 g, e contêm entre 60 a 68% de óleo, podendo alcançar 72% em condições mais favoráveis de crescimento da palmeira. As amêndoas secas ao ar contêm aproximadamente 4% de umidade e têm sido o componente do fruto mais intensivamente utilizado (Soler et al., 2007).

A produção de amêndoas de babaçu no Brasil atingiu aproximadamente 89.000 toneladas em 2013, com valor de comercialização estimado em R\$ 121 milhões (IBGE, 2013). A quase totalidade das amêndoas foi colhida nos Estados do Piauí e Maranhão. O aproveitamento do babaçu que, além da folha e do caule, inclui principalmente a coleta e beneficiamento dos frutos, é uma atividade extrativista tradicional nos Estados do Piauí e Maranhão, a qual é realizada normalmente por mulheres, conhecidas como quebradeiras de coco, auxiliadas por pessoas dos seus núcleos familiares. Especialmente no Maranhão, a exploração do babaçu se caracteriza como uma atividade complementar e alternativa à agricultura de subsistência para mais de 300.000 pessoas (Souza et al., 2011).

Em função da elevada importância socioeconômica do babaçu, inúmeras publicações ressaltam que é imperativo a realização de um programa para aprofundar conhecimentos sobre essa espécie para melhor aproveitamento em toda a sua cadeia produtiva e seleção de variedades com melhor aproveitamento para a produção de biodiesel (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

O estudo da germinação auxilia na compreensão da interação entre palmeiras e seu ambiente natural e o desenvolvimento de tecnologias viáveis para a produção de plântulas pode contribuir para o estabelecimento de plantações comerciais, que podem facilitar a produção de frutos e o uso sustentável do babaçu (Neves et al., 2013). Nesse contexto, os estudos básicos relativos à germinação e à propagação vegetativa, visando o estabelecimento de protocolos para reprodução e a regeneração das plantas *in vitro* são de fundamental importância.

## 2.2. A germinação em palmeiras

O estudo da germinação é muito importante para o grupo das palmeiras, já que quase todas as espécies são propagadas preferencialmente por sementes e compreender este processo é claramente um passo importante na compreensão da biologia destas plantas (Henderson, 2006). Uma grande variedade de padrões de desenvolvimento de plântulas foi observada entre as diferentes espécies de *Arecaceae*, o que reforça a necessidade de estudos que avaliem os aspectos estruturais envolvidos na germinação e no desenvolvimento da semente (Henderson, 2006).

A dormência, frequentemente observada nas palmeiras, associada a seu longo ciclo de vida e limitada pela capacidade de propagação vegetativa, restringe a expansão de plantações comerciais e limita o melhoramento genético por métodos convencionais (Lédo et al. 2001, Pérez-Núñez et al., 2006). Além disso, poucas palmeiras produzem perfilhos que podem ser facilmente propagados (Tomlinson, 2006; Broschat et al., 2014) e a grande maioria das espécies é alógama e uma grande heterogeneidade é observada quando se obtém material a partir de sementes (Rajanaidu; Ainul, 2013).

Dentre os estudos com diversas espécies de palmeiras (*Acrocomia aculeata*, *Attalea vitrivir*, *Butia capitata*, *Elaeis guineensis*, *Euterpe edulis*, *Phoenix* spp, *Oenocarpus minor*, *Washingtonia filifera*) podemos destacar aqueles referentes à fisiologia da germinação em condições naturais (no solo) com enfoque nas variáveis ambientais e genótipos (Martins-Corder; Saldanha, 2006; Roberto et al., 2011; Green et al., 2013), nos aspectos ecofisiológicos da germinação (Orozco-Segovia et al., 2003; Baskin; Baskin, 2014), nos aspectos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais da semente e do embrião (DeMason, 1988; Moura et al., 2010) e do desenvolvimento da plântula (DeMason, 1985; Henderson, 2006; Iossi et al., 2006; Oliveira et al., 2010; Neves et al., 2013; Oliveira et al., 2013) e na proteômica da germinação (Sghaier-Hammami et al., 2009).

Outros estudos referentes à fisiologia da germinação foram realizados *in vitro*, testando condições de cultivo (Lédo et al., 2007; Pech y Aké et al., 2007; Thawaro; Te-Chato, 2010; Ribeiro et al., 2011; Silva et al., 2012; Waldow et al., 2013; Leite et al., 2014; Pádua et al., 2014;), aspectos morfológicos (Ribeiro et al., 2011; Koffi et al., 2013) e anatômicos (Magalhães et al., 2013; Ribeiro et al., 2012) de *Acrocomia aculeata*, *Attalea vitrivir*, *Butia* spp., *Cocos nucifera* e *Elaeis guineensis*, *Mauritia flexuosa* e *Orbignya oleifera*.



Esses trabalhos permitem concluir que a estrutura dos embriões e os processos de germinação das palmeiras são bastante peculiares e o conhecimento sobre ambos é bastante incipiente.

Dransfield et al. (2008) definem as características que devem ser utilizadas para o reconhecimento dos tipos de germinação: 1) Presença ou ausência de um pecíolo cotiledonar, que empurra a plântula em desenvolvimento para longe da semente; 2) presença ou ausência de uma lígula cotiledonar. Baseando-se na combinação das características descritas acima, podemos verificar três tipos de germinação em palmeiras: remota tubular, remota ligular e adjacente ligular (Figura 2).

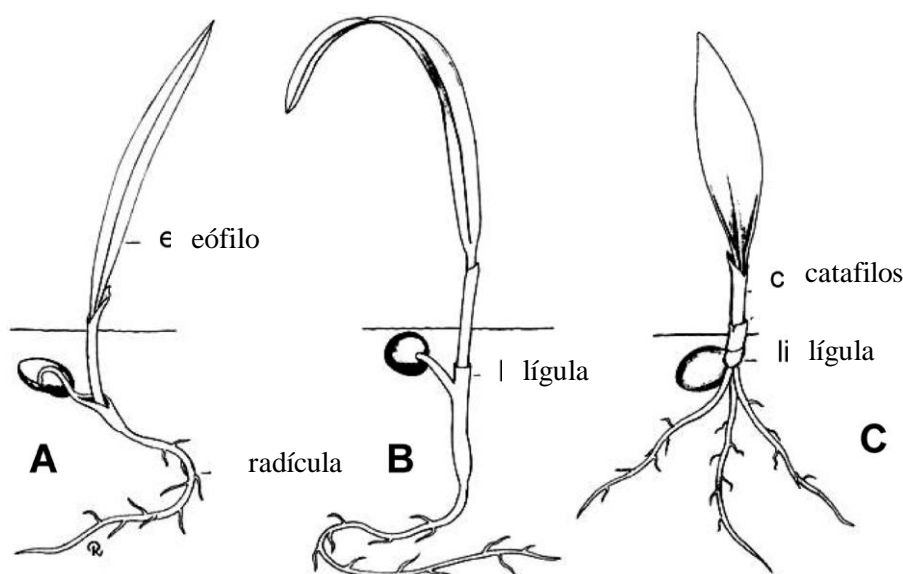


Figura 2. Tipos de germinação propostos por Gatin. A. germinação tipo remota tubular (*Phoenix*). B. germinação tipo remota ligular (*Sabal*). C. germinação tipo ligulada adjacente (*Phoenicophorium*) (Adaptada de Henderson, 2006).

Os embriões são pequenos, cilíndricos e de maturação tardia e grande parte de sua estrutura consiste no cotilédone (Dransfield et al. 2008). Durante a germinação, é possível diferenciar três partes do cotilédone: na porção distal encontra-se o haustório e na porção mediana o pecíolo cotiledonar e, juntos, formam o hiperfilo. A porção proximal (basal) é a bainha cotiledonar e envolve o eixo embrionário, sendo chamado de hipofilo (Tillich, 2007).

O cotilédone nunca é expandido como órgão aéreo fotossintético, já que o haustório permanece no interior do endosperma da semente, funcionando como um órgão de sucção

que absorve e transporta o alimento solúvel para o eixo embrionário através do pecíolo e da bainha do cotilédone (Tillich, 1998). O alongamento do pecíolo cotiledonar (e, às vezes da bainha tubular) empurra o eixo embrionário em direção ao solo e para longe da semente, caracterizando o tipo de germinação hipogeia (Tillich, 2007). A protrusão do embrião pode ocorrer como o resultado do desenvolvimento tanto da radícula quanto da plúmula (Orozco-Segovia et al., 2003).

Há divergências quanto a esta nomenclatura; Tillich (2007) não aceita o termo pecíolo para se referir à estrutura que fica entre o haustório e a bainha cotiledonar, denominando a mesma de acopole. O termo apocole foi introduzido para descrever a parte do cotilédone que se alonga para enterrar a plúmula no caso de germinação hipogeia, remota, encontrada nas palmeiras (Tomlinson, 1961). Desta forma, o termo apocole é restrito à parte do hiperfilo entre o haustório e a bainha cotiledonar de plântulas hipogeias de germinação remota (Tillich, 2007). No entanto, Henderson (2006) considera os termos pecíolo cotiledonar, porção mediana do cotilédone e acopole como sinônimos.

As espécies de *Attalea* possuem germinação do tipo remota tubular (ou seja, a planta se desenvolve distante do endosperma, após o crescimento do cotilédone de formato tubular) e este é um critério taxonômico que permite definir este gênero como pertencente à tribo Cocoseae, subtribo Attaleinae (Dransfield et al., 2008). Uma peculiaridade do desenvolvimento de *Attalea* é responsável por sua importância como espécie pioneira: o desenvolvimento de uma plântula remota-tubular, com o crescimento de um caule subterrâneo gravitrópico positivo antes de emergir o caule superficial. Estes caules não são facilmente destruídos pelo fogo, o que dá uma vantagem como espécie pioneira em áreas de queimada e permite que as plantas persistam apesar dos diversos distúrbios (Salm, 2004). Neves et al. (2013) acreditam que a adaptação de *A. vitrivir* para o ambiente cerrado, com um clima fortemente sazonal, seja favorecida pela estrutura do seu diásporo, pela abundância de reservas de endosperma que permitem que as mudas sobrevivam durante um longo período de tempo acima do nível do solo, e por um padrão de desenvolvimento de plântulas que protege o eixo vegetativo ao mantê-lo profundamente enterrado no solo.

As dificuldades na germinação de palmeiras do complexo babaçu foram relatadas por vários autores (Pinheiro, 2002; Neves et al., 2013) e estão provavelmente relacionadas a uma série de fatores estruturais e fisiológicos, incluindo dormência física, embebição lenta, exigência de temperaturas específicas, dormência fisiológica e suscetibilidade à deterioração e predação (Neves et al., 2013). A estrutura do opérculo do poro de

germinação, próximo ao embrião, é esclerófila e provavelmente protege o embrião da predação e é está relacionado com a de dormência física e fisiológica do diásporo (Neves et al., 2013).

Em *A. vitrivir* a germinação tubular ocorre pelo crescimento do pecíolo do cotilédone e é o resultado da atividade de dois meristemas proximais distintos: zona “M”, que leva ao deslocamento do opérculo, e o meristema do pecíolo, que cresce por divisão e alongamento celular (Neves et al. 2013). O haustório desenvolve uma epiderme secretora e um aerênquima, e participa ativamente da mobilização das reservas da semente, em sua maioria lipídicas (Neves et al. 2013). Não há estudos morfológicos ou anatômicos de germinação de *Attalea speciosa* até o presente.

### **2.3. Propagação vegetativa e cultura de tecidos**

A reprodução assexuada é bastante comum em plantas, permitindo-lhes sobreviver em seus habitats naturais completamente independentes da polinização por vetores. Dois tipos de reprodução assexuada são reconhecidos e em ambos a descendência é, normalmente, geneticamente idêntica à parental. Primeiro, a agamospermia ou apomixia refere-se à produção de sementes férteis, sem fusão sexual de gametas (Traveset, 1999). Segundo, a reprodução vegetativa é a reprodução assexuada de um indivíduo em unidades fisiologicamente independentes (Traveset, 1999). A propagação vegetativa pode ser obtida de forma artificial por vários processos: enraizamento de estacas, estolões, enxertia e micropropagação (Barrueto Cid, 2010).

A propagação *in vitro* constitui-se uma ferramenta importante utilizada em plantas que não apresentam reprodução assexuada, como o babaçu, e, portanto, não se propagam vegetativamente (Costa; Aloufa, 2007; Fermino Júnior et al., 2009) e também para a manutenção de bancos de germoplasma (Lédo et al., 2007). Como exemplo, a propagação vegetativa viável do dendê (*Elaeis guineensis*) só foi possível a partir do desenvolvimento de sistemas de cultivo de tecidos, com aplicação em programas de plantio e melhoramento genético (Low et al., 2008; Konan et al., 2010; Luis et al., 2010; Beulé et al., 2011).

Dentre as formas de micropropagação vegetal, a embriogênese somática (ES) se destaca por permitir que ocorra a formação de embriões somáticos a partir de células somáticas, sem que tenha havido fecundação de gametas. Esta pode surgir naturalmente, a partir de células somáticas isoladas, como tem sido observado em *Kalanchoe*, na qual

embriões somáticos formam-se espontaneamente no bordo das folhas, ou pode ser induzida experimentalmente *in vitro* (Zavattieri et al., 2010). De acordo com Fehér et al. (2003) este fenômeno é um dos exemplos de flexibilidade no desenvolvimento dos vegetais e demonstra dois aspectos importantes da embriogênese vegetal, a saber: (1) o efeito da fecundação pode ser substituído por mecanismos endógenos, e (2) em plantas superiores, outros tipos de células, além do óvulo fertilizado, podem manter ou recuperar a capacidade de desenvolvimento embrionário (Fehér et al., 2003). Este último exige a indução de competência embriogênica nas células que não são naturalmente embriogênicas (Dodeman et al., 1997). A indução de ES em plantas só é possível se as células somáticas retornarem à sua forma totipotente e adquirirem a competência necessária para responder aos sinais embriogênicos e iniciar a embriogênese (Pasternak et al., 2002).

## 2.4. Embriogênese somática <sup>1</sup>

A Embriogênese somática (ES) é um processo indutivo no qual uma célula competente ou um grupo de células sofre uma série de mudanças bioquímicas e moleculares que resultam na formação de um embrião somático bipolar (Rai et al., 2011). A indução de ES em plantas só é possível se as células somáticas recuperarem sua totipotência e adquirirem a competência necessária para responder aos sinais embriogênicos e iniciar a embriogênese (Pasternak et al., 2002), ou seja, deve ocorrer a indução de competência embriogênica nas células que não são naturalmente embriogênicas (Dodeman et al., 1997).

A ES possui inúmeras aplicações, entre as quais podem ser citadas a propagação clonal, a regeneração de plantas geneticamente modificadas, a formação de híbridos somáticos e a indução e seleção de mutantes (Gaj, 2004). De fato, o progresso no desenvolvimento de sistemas *in vitro* tem permitido a indução de ES em muitas plantas economicamente importantes (Santos et al., 1997; Zelená, 2000; Aoshima, 2005; Te-chato; Hilae, 2007). Um exemplo importante é a propagação vegetativa de dendezeiro (*Elaeis guineensis*), que tem permitido a produção de materiais uniformes para programas de plantio em campo e melhoramento genético (Low et al., 2008; Konan et al., 2010; Luis et al., 2010; Beulé et al., 2011).

---

<sup>1</sup> Esta revisão de Embriogênese somática foi publicada na íntegra como o capítulo: *Advances in Somatic Embryogenesis of Palm Trees (Arecaceae): Fundamentals and Review of Protocols* (Saleh; Scherwinski-Pereira, 2016) componente do livro intitulado *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and its Applications*, publicado pela Springer.

Além de ferramenta para a propagação vegetativa, os embriões somáticos também podem ser usados para estudos de regulação do desenvolvimento embrionário vegetal (Bhojwani; Razdan, 1992; Von Arnold et al., 2002; Karami et al., 2009; Zhang; Ogas, 2009). A ES inclui as vias pelas quais as células se desenvolvem em estruturas semelhantes a embriões zigóticos, através de uma série ordenada de estágios embriológicos característicos, sem que tenha ocorrido a fusão de gametas (Jiménez, 2005). Os embriões somáticos mostram muitas características e similaridades com estágios de desenvolvimento do embrião zigótico: são bipolares e apresentam meristema caulinar e radicular, com um sistema vascular fechado isolados do tecido materno (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014). Não raramente são formados a partir de uma única célula e produzem proteínas específicas (Jayasankar et al., 1999).

O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos via ES depende de diferentes fatores, como genótipo e tipo da planta, idade e estados fisiológico e de desenvolvimento do explante e estado da planta doadora e, entre os fatores externos, a composição do meio e condições físicas de cultivo (luz, temperatura) (Viñas; Jiménez, 2011). A interação entre todos esses fatores leva à indução e expressão de um modo específico de diferenciação e desenvolvimento celular, que leva à embriogênese (Gaj, 2004).

Normalmente, faz-se a distinção entre a ES direta e a indireta. No primeiro caso, o embrião é induzido diretamente a partir das células do explante original (sem uma etapa de desdiferenciação), enquanto no segundo caso o embrião é induzido indiretamente (passando por desdiferenciação), a partir da formação de um calo. Este último caso é a forma mais frequente de embriogênese (Gaj, 2004; Fehér, 2008; Zavattieri et al., 2010).

De fato, a calogênese é um pré-requisito para a formação de embriões somáticos em diversas palmeiras, como a tamareira (*Phoenix dactylifera*) (Sané et al., 2006). Othmani et al. (2009) verificaram a formação de embriões somáticos em folhas de tamareira pela via direta quando usaram  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Quando as concentrações de 2,4-D usadas foram maiores ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ocorreu a embriogênese somática indireta, indicando que existem diferentes modos de ação do fitorregulador sobre o explante ou espécie estudada (Othmani et al., 2009). Comparando com a embriogênese somática indireta, a indução de embriões diretamente do explante original geralmente reduz o tempo de formação dos embriões somáticos. Normalmente, essa via apresenta menos problemas com acúmulos de compostos fenólicos e possui menores taxas de contaminação (menor manipulação dos explantes e tempo de cultivo) (Kumar et al., 2006). Além disso, a variabilidade genética do material obtido por via direta é relativamente

menor (Cuenca et al., 1999). Embora não seja comum, alguns trabalhos relatam a propagação de palmeiras via embriogênese direta em *saw palmetto* (*Serenoa repens*) (Gallo-Meagher; Green, 2002) e via organogênese em tamareira (*Phoenix dactylifera*) (Asemota et al., 2007; Kriaa et al., 2012; Mazri, Meziani, 2013) e em pupunha (*Bactris gasipaes*) (Almeida; Almeida, 2006).

A embriogênese somática indireta é a forma mais eficiente de micropropagação entre as palmeiras (Ree; Guerra, 2015) e é, normalmente, um processo de regeneração em múltiplas etapas, iniciando-se com a formação de calos primários e embriogênicos, que evoluem até a formação de massas proembriogênicas. Em seguida, ocorre o desenvolvimento do embrião somático, seguido pela sua maturação e, finalmente, a regeneração da planta (Von Arnold et al., 2002; 2008).

Na fase de indução de ES as células somáticas diferenciadas adquirem competência embriogênica, seja diretamente ou indiretamente (Zavattieri et al., 2010). Para isso, as células somáticas sofrem uma reorganização do estado celular, incluindo aspectos fisiológicos, metabólicos e de expressão gênica (Jiménez et al., 2001). Embora os mecanismos envolvidos na transição do destino celular de somático para embriogênico ainda sejam pouco claros, de um modo geral, trata-se de um processo de desdiferenciação e ativação da divisão celular (Fehér et al., 2003), que normalmente culmina com a formação do calo proembriogênico (Viñas; Jiménez, 2011). Após a indução, os embriões somáticos passam pelos estágios típicos de embriogênese zigótica, isto é, estágios globular, escutelar e coleptilar, em monocotiledôneas (Toonen; De Vries, 1996; Jiménez, 2005). Finalmente, durante a maturação, diversas proteínas de reserva e as proteínas específicas de embriogênese tardia (do inglês LEA - *late embryogenesis abundant*), ácidos graxos e açúcares, todos necessários à germinação, são sintetizados (Von Arnold et al. 2002; Rai et al., 2011). Este acúmulo de reservas e o processo de dessecação permitem que os embriões somáticos se preparem para a germinação e se desenvolvam em plantas normais (Jiménez et al., 2001; Rai et al., 2011).

Em resumo, as etapas normalmente consideradas na ES somática indireta em palmeiras são (Jiménez, 2005; Fehér, 2008; Von Arnold, 2008):

- I) Calogênese: Desdiferenciação do tecido somático que passa a ser responsivo e evolui até a formação de massas proembriogênicas;
- II) Indução de estruturas embriogênicas: ocorre a multiplicação/proliferação do calo e o desenvolvimento embriogênico organizado;

III) Maturação dos embriões: as estruturas iniciais acumulam substâncias de reserva, passam por um processo de dessecação e completam o desenvolvimento embrionário, passando do estágio globular ao coleoptilar;

IV) Conversão: é o estabelecimento de plântulas completas (com parte aérea e raiz), a partir dos embriões somáticos.

Embora se possam definir as quatro etapas, nem todos os protocolos de ES para palmeiras as diferenciam ou determinam tratamentos diferentes para cada uma destas etapas.

A ES consiste, portanto, na substituição do padrão da expressão gênica no tecido do explante por um novo programa embriogênico (Zeng et al., 2007). Assim, quanto mais o padrão de expressão gênica do embrião somático se aproxime ou corresponda ao de embriões zigóticos, maior a chance de se obter sistemas de regeneração altamente eficientes (Merkle et al., 1995), e isto só é possível se as células são competentes e recebem os estímulos indutores adequados (Zavattieri et al., 2010).

#### 2.4.1 *Material vegetal e competência embriogênica*

As células somáticas com capacidade embriogênica cultivadas *in vitro* necessitam de estímulos para iniciar a embriogênese, ao contrário das células embriogênicas formadas *in vivo*, que não necessitam de estímulos externos (Zimmerman, 1993). Cada tecido possui um potencial embriogênico traduzido pela sensibilidade específica do mesmo a um sinal hormonal externo (Gaj, 2004). Após a mudança em uma ou mais condições de cultivo é que as células competentes podem atingir o estágio de expressão, na qual elas podem se diferenciar em proembriões e se desenvolver em embriões somáticos (Jiménez, 2005). Assim, são reconhecidas duas categorias de condições indutivas que permitem que células diferenciadas se desenvolvam em células desdiferenciadas competentes: reguladores de crescimento (níveis celulares interno e/ ou externo) e fatores de estresse (Zavattieri et al., 2010).

As células competentes têm características específicas, tais como ativação precoce do ciclo de divisão, pH vacuolar mais alcalino, metabolismo de auxinas alterado e a presença de leucoplastos (cloroplastos não diferenciados) (Pasternak et al., 2002).

Durante a indução da ES, um aumento transitório nos níveis endógenos de ácido indol-acético (AIA) parece ser uma característica comum a várias plantas e tecidos (Jiménez, 2005; Gueye, 2009). Assim, a síntese de auxina induzida por condições

embriogênicas deve ser um dos sinais cruciais que determinam o destino embriogênico de uma célula cultivada (Gaj, 2004). No entanto, deve-se levar em conta ainda a interação entre hormônios endógenos e os reguladores de crescimento nesse processo (Jiménez, 2005). Gueye et al. (2009) verificaram que a capacidade de segmentos foliares de tamareira em formar calos depende do estado de diferenciação celular, sendo que os segmentos mais calogênicos se encontravam dentro da zona de alongamento foliar.

Assim, o estabelecimento de um sistema de ES bem sucedido depende da escolha de material vegetal que possua células competentes e a determinação de fatores físicos e químicos que disparam/estimulam as vias de desenvolvimento embriogênico dessas células (Zavattieri et al., 2010). De acordo com Gaj (2004), embriões zigóticos imaturos representam uma fonte importante como propágulo em trabalhos de ES, pois são empregados em mais de um quinto dos protocolos estabelecidos entre 1995 e 2004, sendo que os embriões maduros são a segunda fonte mais utilizada.

Em palmeiras, o uso de tecidos embrionários tem sido testado *in vitro* para diversas espécies com sucesso: o embrião zigótico (EZ) maduro de pupunha, macaúba e dendezeiro (Steinmacher et al., 2007a, Moura et al., 2009; Balzon et al., 2013; Luis; Scherwinski-Pereira, 2014; Thawaro; Te-Chato, 2009), a plúmula isolada de coco (Fernando et al., 2003; Pérez-Nuñez et al., 2006; Sáenz et al., 2006) e o EZ imaturo de coco e de açaí (Karunaratne; Periyapperuma, 1989; Fernando; Gamage, 2000; Saldanha; Martins-Coder, 2012; Scherwinski-Pereira et al., 2012). Quando a clonagem é feita a partir de embriões zigóticos, estes, geralmente, são geneticamente diferentes da planta mãe devido à ocorrência de polinização cruzada, comum entre as palmeiras (Perera et al., 2007).

Quando se considera os tecidos somáticos, diversos tipos de explantes foram testados, porém em geral a resposta é limitada a algumas espécies. Poucos exemplos de sucesso incluem folhas de tamareira, dendezeiro e pupunha (Othmani et al., 2009; Konan et al., 2010; Santos et al., 2012) e raízes de *Areca* (Wang et al., 2006). O uso de estruturas reprodutivas resulta em exemplos bem sucedidos: flores femininas de tamareira (Kriaa et al., 2012), ovários imaturos (Perera et al., 2007) e anteras (Perera et al., 2009b) de coco. Estes últimos são bastante promissores, pois se tratam de tecidos somáticos e permitem a obtenção de clones fiéis à matriz (Gueye, 2009).

Os tecidos somáticos de plantas jovens também são boas fontes de explantes. Os ápices caulinares foram utilizados com sucesso em tamareira (Sané et al., 2006) e dendezeiro (Thawaro; Te-Chato, 2007). Utilizando a técnica de *Thin Cell Layer* (Tran Thanh Van; Bui, 2000) em explantes de plântulas germinando, Steinmacher et al. (2007b)



e Scherwinski-Pereira et al. (2010) obtiveram embriões somáticos de pupunha e dendezeiro, respectivamente.

A técnica de *Thin Cell Layer* parte do princípio de que explantes menores são mais responsivos, pois possuem uma maior superfície de contato com o meio de cultura e, proporcionalmente, recebem um estresse maior, capaz de aumentar o metabolismo celular e a resposta embriogênica (Fehér et al., 2003; Othmani, 2009). Além disso, em explantes de tamanho reduzido ocorre a síntese de novos componentes da parede celular, como oligossacarídeos, que agem como sinal para que a célula reinicie o ciclo celular (Tran Thanh Van; Bui, 2000). Othmani et al. (2009) testaram explantes foliares de tamareira de diversos tamanhos e verificaram que os menores (5-10 mm) apresentaram maior frequência de formação de calo embriogênico. Os autores sugerem que os explantes maiores (15–20 mm), que não formaram calos embriogênicos, permitem a manutenção das interações normais entre as células do tecido e que estas interações devem inibir a divisão celular ao manter os domínios simplásticos (Othmani et al., 2009).

A técnica de *Thin Cell Layer* tem sido utilizada com sucesso para a micropropagação de diversas plantas ornamentais, muitas delas monocotiledôneas (Silva; Dobránszki, 2013).

#### 2.4.2 Hormônios endógenos

O desenvolvimento de técnicas com sensibilidade suficiente para analisar moléculas como os hormônios vegetais, presentes em amostras de tecidos muito pequenas, permitiu investigar o papel destes compostos no direcionamento da ES e relacionar as suas concentrações endógenas à morfogênese e ao desenvolvimento (Gaj, 2004).

Em explantes foliares, os tecidos embriogênicos apresentaram maiores concentrações de AIA (ácido 3-indol-acético) e menores concentrações de citocininas endógenas do que os não embriogênicos, embora muitos resultados não indicam uma relação direta entre a concentração desses hormônios e a competência embriogênica do tecido (Jiménez, 2005). Outra evidência de que níveis elevados de auxinas endógenas estão correlacionados com a competência embriogênica vem de trabalhos nos quais a redução da capacidade embriogênica coincide com uma redução no AIA endógeno, praticamente para os níveis existentes nas linhagens não embriogênicas (Jiménez, 2005). A síntese de auxina e o transporte polar de auxina são eventos chave na formação do meristema que leva ao desenvolvimento do embrião (Nawy et al., 2008). Em tamareira (*Phoenix dactylifera*), os

segmentos foliares que têm maior competência na formação de calo são aqueles que contêm maior quantidade de AIA endógena livre e isso sugere que a homeostase de auxina deve ser um fator importante para que as células possam se desdiferenciar ao ser induzidas pelo 2,4-D (Gueye et al., 2009).

Considerando-se outras classes de reguladores, vários trabalhos apontam para um papel importante do ácido abscísico (ABA) endógeno durante a fase de indução da ES (Jiménez, 2005). Por outro lado, acredita-se que o etileno tenha um papel negativo sobre a indução de ES, como observado nos trabalhos que se usou inibidores da ação do etileno, tais como o nitrato de prata, na obtenção de embriões somáticos de soja e de tamareira (Santos et al., 1997; Al-Khayri; Al-Bahrany, 2001). Com respeito às giberelinas (GAs), a situação é menos clara, porque poucos trabalhos analisaram os conteúdos endógenos destes hormônios, em culturas embriogênicas e não embriogênicas, e os mesmos mostraram dados ambíguos (Jiménez, 2005).

#### *2.4.3 Reguladores de crescimento adicionados ao meio*

A concentração e composição relativa dos reguladores de crescimento (RCs) adicionados ao meio determinam tanto a habilidade de resposta do explante quanto o tipo de reação morfogênica (formação de embriões ou de gemas axilares). Os RCs são frequentemente adicionados ao meio de cultura em experimentos de tentativa e erro, quando são avaliadas diferentes substâncias, concentrações e momentos de aplicação para induzir o padrão de desenvolvimento desejado (Jiménez, 2005).

Para a indução de embriões somáticos, auxinas são utilizadas sozinhas ou combinadas com citocininas em 80% dos protocolos analisados por Gaj (2004), sendo que o 2,4-D (ácido 2, 4-diclorofenoxiacético) é a auxina utilizada em 65% dos protocolos. Dos 20 protocolos de ES em palmeiras analisados a partir de artigos publicados no período de 2000 a 2015, 14 (70%) utilizaram o 2,4-D na formação do calo e/ou na indução da embriogênese. O 2,4-D parece agir não somente como análogo de auxina, mas também como fator de estresse que dispara o desenvolvimento embriogênico em células sob cultivo, especialmente quando utilizado em altas concentrações (Fehér et al., 2003). A supressão da auxina indutora é essencial para que a embriogênese se complete, pois o crescimento contínuo em meio contendo 2,4-D não permite a redução das concentrações endógenas de auxina e resulta em inibição do desenvolvimento de embriões (expressão e diferenciação do embrião), mesmo em células induzidas (Nissen; Minocha, 1993).

Auxinas e citocininas são os fitorreguladores mais utilizados porque são capazes de regular o ciclo celular e disparar a divisão celular (Francis; Sorrell, 2001; Jiménez, 2005). Em palmeiras, o uso de citocinina aliado à auxina durante a calogênese ocorreu em apenas um trabalho (Steinmacher et al., 2007b). Porém, durante a fase de indução de estruturas embriogênicas e de maturação, 8 dos 20 trabalhos amostrados usaram uma citocinina, geralmente o 2-isopenteniladenina (2iP) , juntamente com a auxina (Sáenz et al., 2006; Sané et al., 2006; Steinmacher et al., 2007b; Zouine; El Hadrami, 2007; Konan et al., 2010; Saldanha; Martins-Coder, 2012; Scherwinski-Pereira et al., 2012; Balzon et al., 2013).

Utilizando-se o 2iP foi possível proliferar calos embriogênicos e regenerar plantas a partir de embriões somáticos de *Elaeis guineensis* (Balzon et al., 2013; Gomes et al., 2015), *Phoenix dactylifera* (Gabr; Tisserat, 1985) e *Cocos nucifera* (Perera et al., 2009a). No coqueiro, a regeneração de plantas a partir do uso de inflorescências imaturas como explantes na ES teve sucesso com o uso combinado de 6-benziladenina (BA), 2iP e 2,4-D (Perera et al., 2009a).

O ácido abscísico (ABA) promove a transição de embriões somáticos da fase de proliferação para a fase de maturação; tanto a síntese quanto a deposição de proteínas de reserva e de embriogênese tardia (LEA) durante a embriogênese somática são regulados pelo ABA e pela expressão de genes induzidos por estresse (Dodeman et al. 1997; Von Arnold et al., 2002, Rai et al., 2011). O ABA foi utilizado na indução de embriogênese somática em cultivo de plúmulas de coco (Fernando; Gamage, 2000) e na maturação de embriões somáticos de tamareira (Othmani et al., 2009) e de coqueiro (Perera et al., 2007). Porém, para o coqueiro há o relato de que o uso de ABA reduziu a formação de parte aérea nas plantas regeneradas de embriões somáticos (Perera et al., 2009a).

Outras moléculas biologicamente ativas, além dos RCs, podem induzir ES em diferentes espécies vegetais, entre elas as poliaminas (Gaj, 2004). Além disso, uma nova geração de RCs, como o tidiazuron, uma citocinina que pertence às difenilureias, surge como alternativa para altas frequências de regeneração direta de embriões somáticos, mesmo a partir de tecidos diferenciados (Jiménez, 2005). Perera et al. (2009a) obtiveram bons resultados ao utilizar o tidiazuron (TDZ) na fase de indução de calos em ovários não fertilizados de coqueiro (*Cocos nucifera* L.).

#### 2.4.4 Açúcares

Os açúcares são fonte essencial de energia e criam as condições osmóticas apropriadas para o crescimento de células *in vitro*. A fonte de carbono parece ter um papel importante na embriogênese somática e a sacarose é o açúcar mais utilizado em culturas de ES (Gaj, 2004; Yaseen et al., 2013). A necessidade de carboidratos de uma cultura depende da espécie e do estágio de desenvolvimento do tecido cultivado (Yaseen et al., 2013).

Em palmeiras, o carboidrato mais utilizado tem sido a sacarose na concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> (Ree; Guerra, 2015). No entanto, esta concentração foi aumentada em casos específicos como na indução de calo e na maturação dos embriões somáticos de tamareira (Fki et al, 2003) e na maturação e enraizamento de dendezeiro (Konan et al., 2010). Em tamareira, Sané et al. (2006) utilizaram a concentração de sacarose de 20 g.L<sup>-1</sup> em todas as etapas a partir da indução da embriogênese.

Açúcares alcoólicos, como o sorbitol, o manitol e o glicerol também são utilizados em cultura de tecidos e a adição de carboidratos ao meio de cultura tem um papel importante na regulação osmótica do estresse hídrico (Yaseen et al., 2013). A presença de substâncias com potencial osmótico no meio, como o sorbitol, aumentou o estresse hídrico, o que favoreceu a germinação de embriões somáticos de dendezeiro, induzindo a formação simultânea de parte aérea e de raízes (Hilae, Te-chato, 2005).

#### 2.4.5 Carvão ativado

O carvão ativado (CA) é comumente usado em cultura de tecidos para aumentar o crescimento e o desenvolvimento de células e tecidos e tem um papel importante nos protocolos de micropropagação e de embriogênese somática (Verdeil; Buffard-Morel, 1995). Os efeitos promotores do CA na morfogênese podem ser devidos, principalmente, a sua adsorção irreversível de compostos inibitórios no meio de cultura e à redução substancial dos metabólicos tóxicos, de compostos aromáticos, incluindo fenóis, e de exsudatos que oxidam o meio (De Touchet et al., 1991; Teixeira et al., 1994; Thomas, 2008; Othmani et al., 2009).

Além disso, as substâncias naturalmente presentes no CA promovem o crescimento, alteram o meio de cultura levando ao seu escurecimento e agem na adsorção de diversos compostos que podem ter um efeito estimulador ou inibidor, como vitaminas, íons metálicos e RCs, incluindo o ácido abscísico e o etileno gasoso (Thomas, 2008). Assim, o

uso de CA no meio de cultura pode auxiliar na indução da embriogênese somática, na maturação e na regeneração dos clones (Thomas, 2008; Othmani et al., 2009).

A adição de CA ao meio de cultura altera algumas de suas propriedades, como a condutividade e a osmolaridade, sendo que a alteração mais expressiva ocorre nos valores de pH, que sofrem alterações desde o primeiro dia de preparo do meio (Sáenz et al., 2010). Além disso, ocorrem diferenças na capacidade de adsorção do 2,4-D entre marcas diferentes de CA e estas diferenças se refletem na concentração ideal de 2,4-D necessária para a resposta de formação de calo embriogênico. Este dado é particularmente relevante porque um dos fatores mais importantes que afetam a resposta morfológica de explantes cultivados *in vitro* é a presença dessa auxina numa concentração considerada ótima (Ebert; Taylor 1990; Verdeil; Buffard-Morel 1995; Sáenz et al., 2010).

O tempo desde a preparação do meio influencia na disponibilidade final de 2,4-D. Assim, quando o carvão ativado (CA) é adicionado ao meio, o equilíbrio só é alcançado após cerca de 20 dias e depende da taxa de adsorção pelo CA e da taxa de difusão do 2,4-D no meio (Ebert; Taylor, 1990). Com o uso de marcadores radioativos, pôde ser calculada a taxa de adsorção de 99,5% dos 100  $\mu\text{m}$  de 2,4-D adicionados ao meio líquido, por 0,25% de carvão ativado, após 5 dias de preparação do meio (Ebert; Taylor, 1990). A adsorção do 2,4-D ao carvão é aumentada em pH ácido e reduzida pela adição de phytigel ou de agarose no meio de cultura (Ebert; Taylor, 1990).

Entre as palmeiras, o coqueiro (*Cocos nucifera*) possui o maior número de exemplos do uso positivo de CA na embriogênese somática. Por exemplo, utilizando o 2,4-D em concentrações superiores a 100  $\mu\text{M}$  e CA em concentrações que variam de 0,1% a 0,25% foi possível a indução de calos a partir de anteras (Perera et al., 2009b), ovários imaturos (Perera et al., 2007) e plúmula (Fernando et al. 2003; Sáenz et al., 2006). Outras espécies responderam de forma satisfatória ao uso de CA na ES, como *Elaeis guineensis*, a partir de embriões zigóticos maduros (Balzon, 2013), com 450  $\mu\text{M}$  de Picloram; *Euterpe edulis* e *Euterpe oleracea*, a partir de embriões zigóticos imaturos, com 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D (Saldanha; Martins-Coder, 2012) ou com 225  $\mu\text{M}$  de Picloram (Scherwinski-Pereira et al., 2012). Além da indução de calos, em *Elaeis guineensis* o CA tem ação positiva sobre a manutenção de calos (Teixeira et al, 1994; Eeuwens, 2002). Em *Bactris gasipaes* o uso de CA foi positivo sobre ES, tanto durante a formação do calo primário e na indução, quanto durante maturação dos embriões e no estabelecimento das plântulas (Steinmacher et al., 2007a; Steinmacher et al., 2007b).

Para *Phoenix dactylifera*, muitos autores indicam o uso de carvão ativado (Gueye, 2009). Porém, não há um consenso quanto à utilização na indução do calo primário, podendo ou não ser usado para um mesmo explante. Para ápices caulinares excisados de plantas *in vitro*, Sané et al. (2006) não utilizaram CA enquanto Zouine e El Hadrami (2007) acrescentaram  $0,15 \text{ g.L}^{-1}$  ao meio, utilizando 2,4-D em concentrações diferentes,  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Fki et al. (2003) não utilizaram CA em folhas jovens de brotações, enquanto Othmani et al., (2009) utilizaram  $0.3 \text{ g l}^{-1}$  de CA, em concentrações de 2,4-D de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Na indução de calos em flores femininas maduras, Kriaa et al. (2012) não utilizaram CA no meio, acrescido de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D, e para *Phoenix canariensis* o uso de CA teve um efeito negativo sobre formação de calo embriogênico (Thomas, 2008).

A utilização de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado no meio para indução de embriogênese somática direta na ameaçada palmeira garrafa (*Hyophorbe lagenicaulis*), preveniu o escurecimento dos tecidos e o lento crescimento (Sarasan et al., 2002).

#### 2.4.6 Outros fatores adicionados ao meio básico

##### Misturas complexas

As misturas complexas incluem proteínas hidrolisadas, extrato de levedura, água de coco, entre outros, e são utilizadas para complementar os meios de cultura quando não se alcançam os resultados esperados (Barrueto Cid; Teixeira, 2010).

O acréscimo de água de coco ao meio de cultura proporcionou resultados positivos para duas variedades de tamareira, em duas concentrações diferentes (10% e 15%), resultando num maior crescimento do calo e num aumento no número de embriões formados (Al- Khayri, 2010).

O extrato de caseína hidrolisada foi utilizado na ES de diversas espécies: *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2009), *Bactris gasipaes* (Valverde et al., 1987; Steinmacher et al., 2007a; Steinmacher et al., 2007b) e *Elaeis guineensis* (Konan, et al., 2010).

##### Compostos orgânicos

O inositol é um composto orgânico de baixo peso molecular, que possui vários isômeros encontrados normalmente nas plantas (Barrueto Cid; Teixeira, 2010). O mio-inositol tem uso bastante disseminado nos protocolos de ES em palmeiras: *Acrocomia*

*aculeata* (Moura et al., 2009), *Bactris gasipaes* (Valverde et al., 1987) e *Euterpe oleraceae* (Scherwinski-Pereira et al. 2012).

As principais vitaminas utilizadas são hidrossolúveis ou componentes do grupo B (Barrueto Cid; Teixeira, 2010). Em palmeiras, entre as vitaminas do complexo B bastante utilizadas estão a niacina, a piridoxina e a tiamina, normalmente na forma ácida (Wang et al., 2006; Wang et al., 2010; Kriiaa et al., 2012). O ácido ascórbico entrou na composição do meio de cultivo de *Elaeis guineensis* (Te-Chato; Hilae, 2007; Thawaro; Te-Chato, 2009) e o ascorbato de sódio, na composição do meio de *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2006). Alguns protocolos desenvolveram meios com uso de vitaminas de Morel e Wetmore (1951), que são as mesmas do meio MS, porém em concentrações menores (Sané et al. 2006; Steinmacher et al., 2007a; Saldanha; Martins-Corder, 2012).

Muitos aminoácidos também são acrescentados ao meio, sendo o mais comum a L-glutamina (Steinmacher et al., 2007a; Steinmacher et al., 2007b; Zouine; El Hadrami, 2007; Saldanha; Martins-Corder, 2012; Luis; Scherwinski, 2014). No entanto, a L-cisteína e a glicina também estão presentes em diversos protocolos, assim como o nucleotídeo adenina (Wang et al., 2006; Wang et al., 2010).

#### Compostos inorgânicos

A maioria dos protocolos utiliza o meio MS (Murashige, Skoog, 1962) como meio básico, na concentração de sais total ou modificada, dependendo da etapa da ES. O meio Y3 (Eeuwens, 1976) e versões modificadas do mesmo (Karunaratne, Periyapperuma, 1989) foram utilizados exclusivamente com duas espécies: *Cocos nucifera* (Sáenz et al., 2006; Perera et al., 2007; Perera et al., 2009a; Perera et al., 2009b) e *Acrocomia aculeata* (Moura et al. 2009; Luis; Scherwinski, 2014).

Valverde et al., (1987) substituíram o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e aumentaram a concentração de  $\text{KNO}_3$  na ES de *Bactris gasipaes*, embora outros trabalhos com a mesma espécie mantiveram as concentrações iniciais do meio MS (Steinmacher et al., 2007a; Steinmacher et al., 2007b). Outro trabalho aumenta a concentração final de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fki et al., 2003) e estas modificações têm como objetivo aumentar a disponibilidade de grupos essenciais, como os nitratos e os fosfatos no meio, aumentando a eficiência das etapas da ES (Barrueto Cid; Teixeira, 2010).

Alguns protocolos incluem o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) no meio (Steinmacher et al., 2007b; Perera et al., 2007) que funciona como inibidor da ação do etileno.

#### 2.4.7 Condições de luz

Estudos sistemáticos do efeito da luz sobre a resposta de explantes cultivados *in vitro* são limitados. Condições de fotoperíodo e de escuro total são requeridos para induzir ES em 49% e 44% dos protocolos, respectivamente (Gaj, 2004). No entanto, embriões nos primeiros estágios de desenvolvimento tiveram uma eficiência duas vezes maior quando cultivados no escuro. A influência da luz na morfogênese *in vitro* pode estar relacionada com o efeito estimulante ou inibitório da luz sobre diferentes substâncias endógenas, incluindo RCs (Zelená, 2000).

Em palmeiras, em apenas um dos protocolos analisados os explantes foram mantidos em condições de luz durante a calogênese (Hilae; Te-Chato, 2005), enquanto nos outros protocolos (90%) os explantes foram mantidos no escuro. Durante a fase de indução da embriogênese, 30% dos protocolos transferiram os calos para condições de luz, com fotoperíodo que varia de 12 a 16h de luz e durante a fase de maturação, o número chega a 50% dos protocolos. Durante a fase da regeneração da planta, todos os protocolos transferem os embriões para a luz, com fotoperíodo de 16h de luz em 85% dos casos.

#### 2.4.8 Conversão de embriões somáticos em plantas

A eficiência dos sistemas de multiplicação *in vitro* depende não apenas da formação de embriões, mas da capacidade destes embriões de se transformarem em plantas. O processo que envolve as mudanças no desenvolvimento que o embrião somático deve passar foi chamado conversão e envolve a formação de raízes primárias, de um meristema caulinar com primórdios foliares, de hipocótilo e de cotilédones funcionais (Gaj, 2004). Para estimular a conversão do embrião e para aumentar a eficiência da regeneração, o ácido giberélico é comumente utilizado no meio de cultura e acredita-se que ele seja especialmente necessário em culturas de embriões que entram em dormência. Outros RCs também podem ser utilizados, como AIB (ácido indol-butírico), ABA (ácido abscísico) e citocininas. O excesso ou a má distribuição da concentração das auxinas, principalmente o 2,4-D, pode causar anomalias morfogênicas nos embriões (Jiménez, 2005).



#### 2.4.9. Características citológicas e anatômicas durante a embriogênese

A iniciação do calo primário em explantes foliares de tamareira (*Phoenix dactylifera*) envolve uma resposta sequencial de dois tipos celulares do tecido vascular: o parênquima fascicular e a bainha perivascular (Gueye et al., 2009). Em *Elaeis guineensis* as análises histológicas mostraram que células adjacentes aos tecidos vasculares se dividiram e progrediram para formar massas meristemáticas, que são isodiamétricas, pequenas, com citoplasma denso, nucléolos e núcleo evidente (Silva et al., 2013).

As primeiras alterações detectadas quando os calos primários são introduzidos no meio para indução da embriogênese são o fechamento dos plasmodesmas e a deposição de calose na parede celular. As células embriogênicas se caracterizam por algumas particularidades celulares: profunda invaginação do invólucro nuclear, a proliferação de dictiosomos, com emissão de vesículas de Golgi diretamente relacionado com o aumento na espessura da parede celular. (Verdeil et al., 2001). As células embriogênicas possuem características citológicas próprias: núcleo volumoso observado em uma posição central e um vacúolo fragmentado que confere um formato de “estrela” ao citoplasma, características de células totipotentes (Rose; Nolan, 2006; Verdeil et al. 2007; Gueye, 2009).

O primeiro sinal da orientação bipolar do embrião somático pode ser indicado pelo acúmulo das reservas de amido nas células na base do embrião globular (que dão origem ao polo da raiz posteriormente) e a presença de células altamente meristemáticas que dão origem ao meristema caulinar. Um núcleo proeminente (com nucléolos distintos) no centro da célula é característico destas células meristemáticas. No embrião somático de palmeiras, no estágio polar, o haustório está localizado na extremidade distal enquanto a zona meristemática e o meristema apical podem ser vistos na extremidade proximal. Com o alongamento do embrião somático bipolar, os cordões de tecidos provasculares no haustório ficam mais diferenciados (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014).

A análise histológica permite concluir que os embriões somáticos de palmeiras podem ser formados tanto pela via unicelular quanto pela via multicelular (Perera, 2007; Moura et al., 2009).

A presença de estruturas globulares aparentemente isoladas e constituídas por células meristemáticas observadas entre as células meristemáticas da região central do calo nodular caracteriza a formação de embriões de origem multicelular (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014). Moura et al. (2008) relataram que os embriões de origem multicelular se

formam a partir de calos nodulares e embriões globulares de origem multicelular foram também observados por Balzon et al. (2013) a partir de calos embriogênicos de *E. guineensis*.

Na via multicelular, o primeiro estágio de desenvolvimento dos nódulos embriogênicos é a diferenciação da zona semelhante ao câmbio (Perera, 2007) e esta via de desenvolvimento multicelular foi descrita para os embriões somáticos obtidos a partir de explantes de inflorescência imatura (Verdeil et al. 1994;. Verdeil e Buffard-Morel 1995) e plúmula (Chan et al, 1998; Fernando et al 2003) de coco. Após o subcultivo dos embriões somáticos (originadas pela via multicelular) no meio de germinação, ocorre a diferenciação de meristemas caulinares e de tecidos haustoriais. No pólo distal do cotilédone do embrião somático observam-se feixes procambiais, células do parênquima e protoderme e no pólo proximal, assim chamado devido à sua proximidade com o suspensor, encontra-se o futuro eixo embrionário (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014). Durante a embriogênese somática de *A. aculeata*, *C. nucifera* e *E. guineensis*, Luis e Scherwinski-Pereira (2014), Fernando et al. (2003) e Silva et al. (2013) os embriões somáticos formados apresentaram bipolaridade e cotilédone. Um haustório bem desenvolvido caracteriza-se pela presença de estômatos na epiderme, células do parênquima com baixa razão núcleo por citoplasma, espaços intercelulares proeminentes, a presença de diversos feixes vasculares e cristais de oxalato de cálcio (idioblastos) em algumas células (Perera, 2007).

A via unicelular foi comprovada em *Acrocomia aculeata*, espécie na qual formam-se proembriões globulares apresentando suspensor multicelular (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014). A presença do suspensor confirma a origem unicelular dos embriões, uma vez que tal estrutura indica que o suspensor e o embrião são formados a partir da divisão assimétrica de uma única célula (Heidstra, 2007).

## **2.5. Conservação de Recursos Genéticos**

Diante da importância dos recursos fitogenéticos para a segurança alimentar mundial, é de suma importância que a diversidade genética das variedades tradicionais, bem como dos cultivares melhorados e das plantas silvestres seja preservada (Sánchez-Chiang, 2010). As ações humanas ligadas ao desenvolvimento levam ao desmatamento de extensas áreas de vegetação nativa com perda irreparável de recursos genéticos (Rao, 2004) e para minimizar os efeitos desta perda, os bancos de germoplasma e de sementes se

propõem a conservar *ex situ* muitas espécies silvestres e domesticadas de interesse (Wang et al, 2005).

A conservação e efetiva utilização de germoplasma de palmeiras se caracterizam por apresentar os mesmos problemas de outras famílias de plantas tropicais. As coleções in vivo, tanto selvagens ou em coleções, estão sujeitas a doenças, mutações, invasão humana e má administração, além de serem caras, em termos de gestão de recursos e espaço (Dickie et al., 1992).

Um exemplo de conservação *ex situ* de palmeiras é a formação de Bancos Ativos de Germoplasma (BAG). No caso do babaçu, na década de 80, foram realizadas coletas de populações naturais de *Attalea* para o estabelecimento de Bancos de Germoplasma no norte e nordeste do Brasil. Expedições de coletas de indivíduos de *A. speciosa* foram realizadas em vários locais de ocorrência no Brasil (Maranhão, Piauí, Pará, Ceará, Tocantins, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso), para a formação de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG). Durante estas coletas, verificou-se grande variabilidade morfológica das populações naturais de babaçu, principalmente em relação às dimensões dos cocos e suas partes componentes (Sittolin; Frazão, 2007). O BAG foi plantado inicialmente em Bacabal, Maranhão e, depois, replantado em 1985, em Teresina, Piauí, na atual Embrapa Meio-Norte. É constituído por cerca de 760 palmeiras, distribuídas em 185 acessos (Oliveira; Rios, 2014).

Outra forma de preservação *ex situ* é o armazenamento de sementes, extremamente necessário, não somente para garantir material vegetal de qualidade de um ano para o outro e as reservas de alimento na entressafra, mas também na forma de uma coleção básica que permite conservar os recursos genéticos a longo prazo (Berjak; Pammenter, 2008).

A finalidade biológica de uma semente é germinar e estabelecer uma nova planta (Ferreira; Borghetti, 2004). De acordo com Hong e Ellis (1996), “o objetivo dos estudos de conservação e armazenamento de sementes é o sucesso da germinação e do estabelecimento das plântulas”, sendo que o critério de germinação deve ser o desenvolvimento normal das plântulas.

O desenvolvimento da capacidade germinativa e a habilidade de manter essa capacidade após a dessecação e a dispersão são aspectos importantes do estudo sobre a maturação de sementes. Aspectos subsequentes relativos à maturação de sementes são: a germinabilidade (capacidade de germinar), a tolerância à dessecação, o vigor e a longevidade (Castro et al., 2004). A longevidade da semente (isto é, o período de sobrevivência), varia enormemente entre as espécies. Ele também pode variar entre acessos

de uma mesma espécie devido a diferenças no genótipo e na proveniência (Hawkes et al., 2000). Influências da proveniência na longevidade potencial resultam de efeitos cumulativos do meio ambiente sobre a maturação da semente, amadurecimento, dessecação e condições do ambiente antes da estocagem, e do tempo de maturação, duração do dessecamento e o período subsequente durante o qual a semente é armazenada antes da conservação (Blodner et al., 2007; Kochanek et al., 2010). O quanto da longevidade potencial, determinado por efeitos do genótipo e de proveniência, irá se manifestar depende das condições de estocagem posteriores aos eventos de maturação (Hong; Ellis, 1996).

Quando se pretende a conservação de determinado acesso de sementes, é essencial saber se a espécie apresenta um comportamento de armazenamento ortodoxo, intermediário ou recalcitrante para que se possa determinar, primeiramente, as melhores condições de armazenamento e, em segundo, qual deve ser duração do armazenamento. (Hong; Ellis, 1996). Em investigações com sementes arbóreas, por exemplo, o primeiro passo frequentemente utilizado ao se iniciar estudos de conservação tem sido determinar a viabilidade das sementes após reduzir o conteúdo de umidade para 5% ou menor (Hong; Ellis, 1996).

Vários autores defendem a ideia de que existe um *continuum* de tolerância à dessecação entre as sementes de diversas espécies de plantas (Berjak; Pammenter, 2001; Kermodé; Finch-Savage, 2002; Walters, 2015), porém, usualmente, fala-se em três categorias: ortodoxa (tolerante à dessecação), recalcitrante (sensível à dessecação) e intermediária. As categorias de classificação do comportamento das sementes estocadas se distinguem pela quantidade de água que cada categoria tolera perder sem levar a um dano letal e pelo tempo necessário para que danos letais se acumulem (Walters, 2015).

As sementes de muitas plantas passam por um período de desidratação no final do período de maturação e são tolerantes a uma dessecação extrema. Estas sementes, chamadas ortodoxas, podem ser estocadas por longos períodos de tempo com baixos conteúdos de água (abaixo de 7%) e sob baixas temperaturas. (Engelmann et al., 2013). A maioria das angiospermas possui sementes ortodoxas (91,7%) (Tweddle, et al., 2003) e, dentre estas, muitas são plantas de interesse agrícola (Engelmann, 2004).

Sementes de espécies que apresentam comportamento de armazenamento ortodoxo podem ser armazenadas em uma ampla variedade de condições ambientais, embora a sua longevidade possa variar enormemente, dependendo do ambiente (Hong; Ellis, 1996). As condições preferidas para o armazenamento de sementes com comportamento ortodoxo é

de 18 °C ou menos, com  $5\pm 1\%$  de conteúdo de umidade (Cromarty et al., 1982). Como as sementes ortodoxas apresentam alta qualidade depois de maduras, o período sob o qual elas podem ser armazenadas sem se deteriorarem pode ser predito sob condições definidas de baixa temperatura e umidade relativa. A longevidade do armazenamento de sementes ortodoxas aumenta logaritmicamente com a redução do conteúdo de água, embora pareça haver um limite mínimo de desidratação abaixo do qual nenhuma vantagem é obtida (Ellis et al., 1990) e, de fato, se excedido esse limite, esse evento pode ser danoso (Walters, 2015). Mesmo sob condições ideais, no entanto, as sementes ortodoxas têm um período de vida determinado, embora este tempo possa ser contado em termos de anos, décadas ou séculos, dependendo da espécie (Walters et al., 2005). Abaixo do limite de conteúdo de água predito por modelos de longevidade de sementes, tanto sementes ortodoxas quanto recalcitrantes se deterioram, sendo que as recalcitrantes morrem instantaneamente. Os valores de conteúdo mínimo de água em sementes ortodoxas e os valores de mortalidade instantânea em sementes recalcitrantes se sobrepõem em diversas espécies, variando entre 0,2 e 0,3  $\text{gH}_2\text{O.gDW}^{-1}$  (Walters, 2015).

Sementes sensíveis à dessecação perdem rapidamente a viabilidade quando secas e não podem ser facilmente armazenadas em bancos de sementes. As dificuldades apresentadas por estas sementes resultaram na sua denominação como recalcitrantes (Roberts, 1973; Tweddle, et al. 2003). Diferentemente das espécies ortodoxas, as sementes recalcitrantes normalmente não sofrem dessecação durante o amadurecimento e conseqüentemente apresentam altos conteúdos de água e são metabolicamente ativas durante a dispersão (Kermode; Finch-Savage, 2002). O teor de umidade a partir do qual a viabilidade é perdida difere significativamente entre espécies, mas é normalmente superior a 20% (Hong; Ellis, 1996) e em muitas espécies uma pequena alteração no conteúdo de água já é suficiente para causar grandes danos (Bewley; Black, 1994). Além disso, o nível de dessecação que uma espécie recalcitrante tolera depende de uma série de fatores, incluindo diferenças sazonais no período de maturação (Finch-Savage; Blake, 1994), e fatores ambientais de pós-colheita, ambos relativos à umidade (Berjak; Pammenter, 2013).

Como o próprio nome sugere, as sementes intermediárias têm características de armazenamento que se encontram entre as ortodoxas e as recalcitrantes (Ellis et al., 1990). A condição intermediária pode se manifestar de diversas formas, incluindo 1) sementes que sobrevivem a dessecação e atingem conteúdo de água abaixo das sementes recalcitrantes, porém não tão baixas como as sementes ortodoxas; 2) sementes que possuem respostas de longevidade anormais a temperaturas variando entre 10 e -30 °C ou

3) sementes que possuem curto período de vida não importando a umidade ou a temperatura (Walters, 2015).

Em geral, as sementes intermediárias toleram uma dessecação a níveis baixos, mas perdem a viabilidade abaixo de 10-12% de teor de umidade. E, diferentemente das sementes ortodoxas, elas normalmente perdem a viabilidade mais rapidamente a temperaturas baixas (p.ex. - 20°C) do que elevadas (p.ex. 15°C) (Hong; Ellis, 1996). Do ponto de vista ecológico, as sementes classificadas como intermediárias são essencialmente tolerantes à dessecação (Tweddle, et al. 2003).

Dentre os métodos de conservação *ex situ*, a conservação *in vitro* e a criopreservação se destacam porque ambos retiram pouco material da população original, necessitam de manutenção mínima por um longo período de tempo e garantem a estabilidade genética do material estocado (Reed, 2008).

No entanto, para longos períodos de armazenamento de sementes, a criopreservação é o único método indicado (Hay; Probert, 2013). A criopreservação se refere ao armazenamento de um organismo vivo a temperaturas ultrabaixas, normalmente do nitrogênio líquido (-196°C), de forma que ele pode ser revivido e retornar ao mesmo estado vivo de antes de ser estocado (Rajanaidu; Ainul, 2013). Sob esta temperatura, todos os processos metabólicos e as divisões celulares são paralisados e o material vegetal pode então ser estocado sem alteração ou modificação por períodos de tempo prolongados. Outra vantagem da criopreservação é que as culturas são estocadas em pequenos volumes, protegidas de contaminação e requerem baixa manutenção (Engelmann et al., 2013). A redução da umidade é essencial para a criopreservação de sementes, por isso, determinar a tolerância à dessecação de uma espécie é muito importante para a sua conservação.

### 2.5.1 *Arecaceae*

Entre as angiospermas, a ocorrência de plantas recalcitrantes está disseminada e não há evidência significativa de determinismo filogenético, com espécies recalcitrantes ocorrendo em uma ampla gama de famílias e ordens nas quais o comportamento ortodoxo predomina (Tweddle, et al. 2003).

A partir de dados obtidos do Seed Information Database [Royal Botanic Gardens Kew Seed Information Database (SID), 2015] sobre os dados de tolerância à dessecação de espécies de palmeiras, foi possível concluir que, embora a maioria delas seja ortodoxa, ocorrem também espécies intermediárias e recalcitrantes.

Do total de 72 espécies (de 48 gêneros) de Arecaceae que fazem parte do banco de dados, 31 espécies (43%) são ortodoxas, 12 (17%) são intermediárias e 29 (40%) são recalcitrantes. Neste levantamento, foram consideradas todas as espécies citadas no SID, inclusive aquelas cuja classificação do comportamento de estocagem está sob questionamento no site. Considerando que a família Arecaceae possui cerca de 2.400 espécies, o número de espécies investigado quanto ao comportamento das sementes é ainda muito baixo (inferior 3,0%).

Trabalhos sobre comportamento de armazenamento de sementes de babaçu foram feitos para três espécies: *Orbignya speciosa* (sin. *Attalea speciosa*) considerada intermediária (Gehlsen, 1937), *Orbignya cohune* (sin. *Atallea cohune*), considerada recalcitrante e *Attalea crassispata* (Dickie et al, 1992) considerada intermediária, com algumas ressalvas.

## 2.6 Análises complementares em Fisiologia Vegetal

### *Perfil Metabólico*

Historicamente, a quantificação de metabólitos era realizada através de ensaios espectrofotométricos capazes de detectar metabólitos isolados ou de separação cromatográfica de misturas de baixa complexidade. Porém, dos anos 2000 para cá, foram estabelecidos novos métodos que oferecem alta acuidade e sensibilidade para a análise de misturas de compostos altamente complexas (Lisec et al., 2006). Entre estes, estão: a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (do inglês *Gas-chromatography-mass-spectrometry*, GC/MS), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS), o *Fourier ion cyclotron resonance mass spectrometry* (FT-ICR-MS) e o NMR (do inglês *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*) (Ferne et al., 2004; Holmes et al., 2006; Lisec et al., 2006).

A análise de misturas altamente complexas de compostos recebe diversos nomes, como *metabolic fingerprinting* (impressão digital metabólica), perfil metabólico, metabolômica e metabonômica, sendo que o termo perfil metabólito tem sido mais amplamente utilizado (Ferne et al., 2004).

A determinação do perfil metabólico é uma ferramenta útil para caracterizar a diversidade genética nos sistemas de plantas, pois esse método permite uma determinação

não tendenciosa, simultânea e rápida de metabólitos (Roessner et al., 2001). O perfil metabólico pode elucidar as ligações e relações que ocorrem principalmente através de regulamentação a nível metabólico e tem o potencial não apenas de fornecer uma compreensão mais profunda de processos regulatórios complexos, mas também para determinar o fenótipo diretamente (Fiehn et al., 2000).

O perfil metabólico tem importantes aplicações na caracterização e no diagnóstico de diferentes condições genéticas e ambientais, que afetam diretamente o metabolismo e indiretamente o fenótipo (Lisec et al., 2006). Assim, esta técnica permitiu a análise da ação de herbicidas sobre plântulas de cevada (Sauter et al., 1991) e o papel de uma enzima durante o amadurecimento de frutos de tomate (Roessner-Tunali et al., 2003). Roessner et al. (2001) utilizaram os perfis metabólicos para comparar os conjuntos de dados obtidos para os sistemas transgênicos de batata, demonstrando o potencial destes dados na avaliação de como ferramenta para a genômica funcional.

As tecnologias de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) permitem a identificação e a quantificação robusta de algumas centenas de metabólitos dentro de um único extrato. Esta instrumentação tem sido muito utilizada para obtenção do perfil metabólico e, portanto, existem protocolos estáveis para a programação e manutenção dos equipamentos, preparação e análise de amostras e avaliação e interpretação do cromatograma final (Lisec et al., 2006). No entanto, considerando que esta é uma técnica de cromatografia baseada em gás, as abordagens só podem ser usadas com compostos voláteis ou compostos que possam ser volatilizados por derivatização (Ferne et al., 2004).

O perfil metabólico com base em espectrometria de massa gera intrinsecamente conjuntos de dados grandes e complexos, como a detecção simultânea de 100 compostos dentro de uma única análise, que incluem ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, álcoois, intermediários fosforilados e compostos lipofílicos (Fiehn et al., 2000; Roessner et al., 2000; Lisec et al., 2006).

Assim, o desafio para este método tem sido desenvolver softwares e algoritmos que permitam a extração e quantificação de muitos componentes individuais e bons softwares têm sido amplamente disponibilizados para encontrar compostos dentro de uma série de amostras e para proporcionar uma boa integração do sinal. No entanto, tem havido recentemente interesse na aplicação de algoritmos de desconvolução que fornecem uma separação eletrônica dos picos de componentes sem o conhecimento prévio destes componentes (Ferne et al., 2004). O algoritmo mais utilizado a este respeito é AMDIS



[*automated mass spectral deconvolution and identification system*, ou seja, sistema automatizado de deconvolução e identificação do espectro de massa (Stein, 1999)] (Wagner et al., 2003).

No que diz respeito à tecnologia de perfil metabólico, o número de metabólitos que pode ser detectado e quantificado com as atuais tecnologias representa a principal limitação (Fernie et al., 2004). O fato de que qualquer sistema biológico é altamente dependente de sua composição metabólica, indica que é imprescindível investir no desenvolvimento de sistemas amplos de identificação de compostos (Schauer et al., 2005).

Apesar disso, o campo tem se desenvolvido rapidamente, estabelecendo-se como uma ferramenta robusta, o perfil metabólico deve ser rápido, confiável, sensível e adequado para automação, bem como abrangendo um número significativo de metabólitos. A espectrometria de massa (GC/MS) tem se mostrado como a tecnologia mais desenvolvida capaz de cumprir estas exigências (Fiehn et al., 2000).

## 2.7 Referências Bibliográficas

AL-KHAYRI, J. M. Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water. **Biotechnology** v. 9, n.4, p. 477-484, 2010.

AL-KHAYRI, J. M.; AL-BAHRANY, A. M. Silver nitrate and 2-isopentenyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia Horticulturae** v. 89, p. 291–298, 2001.

ALANG, Zaleha Christine; MOIR, G. F. J.; JONES, Laurence H. Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Annals of Botany**, v. 61, n. 2, p. 261-268, 1988.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordia **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 9, p. 1449-1452, 2006.

AOSHIMA, Y. Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotics treatment. **Plant Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 277-280, 2005.

ASEMOTA, O.; Eke, C. R.; Odewale, J. O. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 20, p. 2353-2357, 2007.

BAKER, W. J. et al. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoideae). **Annals of Botany**, v. 108, p. 1417–1432, 2011.

BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 1, p. 41-50, 2013.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas** (ed.) Brasília: EMBRAPA, 2010, 303p.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Seed recalcitrance: current perspectives. **South African Journal of Botany**, v. 67, n. 2, p. 79-89, 2001.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, n.2, p. 213-228, 2008.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. 478, p. 1-9, 2013.

BEULÉ, T. et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormally in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Tree Genet Genomes** v. 7, p. 169-182, 2011.

BEWLEY, J. D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press; 1994.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice**. 6 ed. Amsterdam: Elsevier, 1992.

BLODNER, C.; GOEBEL, C.; FEUSSNER, I.; GATZ, C.; POLLE, A. Warm and cold parental reproductive environments affect seed properties, fitness, and cold responsiveness in *Arabidopsis thaliana* progenies. **Plant Cell Environment** v. 30, p. 165–175, 2007.

BROSCHAT, T. K.; ELLIOTT, M. L.; HODEL, D. R. Ornamental palms: Biology and horticulture. In: JANICK, J. (ed.) **Horticultural Reviews**, v. 42, p. 1-120, 2014.

CAMPOS, M. T.; EHRINGHAUS, C. Plant Virtues Are in the Eyes of the Beholders: A Comparison of Known Palm Uses Among Indigenous and Folk Communities of Southwestern Amazonia. **Economic Botany**, v. 57, n. 3, p. 324-344, 2003.

CASTRO et al. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F (org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 323p.

COSTA, N. M. de S.; ALOUFA, M. A. I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciência Agronômica Fortaleza**, v. 38, n. 3, p. 276-279, 2007.

CROMARTY, A.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **The Design of Seed Storage Facilities for Genetic Conservation**, International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 1982.

CUENCA, B.; SAN-JOSÉ M. C.; MARTINEZ, M. T.; BALLESTER, A; VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. **Plant Cell Reports**, 18:538–543, 1999.

DE TOUCHET, B.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Plant Cell Reports**, v. 10, n. 10, p. 529-532, 1991.

DICKIE, J. B.; BALICK, M. J.; LININGTON, I. M. Experimental investigations into the feasibility of *ex situ* preservation of palm seeds; an alternative strategy for biological conservation of this economically important plant family. **Biodiversity and Conservation**, v.1, p. 112-119, 1992.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 7, p. 1493-1509, 1997.

DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. **Genera Palmarum: the evolution and classification of palms**. Richmond: Kew Publishing, 2008.

EBERT, A.; TAYLOR, H. F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 20: 165-172, 1990.

EEUWENS, C. J. et al. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “mantled” flowering in clonally propagated oil palm. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 70, n. 3, p. 311-323, 2002.

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, n. 1, p. 23-28. 1976.

EISERHARDT, W. L., SVENNING, J. C., KISSLING, W. D.; BALSLEV, H. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scales. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1391–1416, 2011.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v.41, p. 1167-1174, 1990.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant** , v. 40, p. 427–433, 2004.

ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Cryopreservation. In: NORMAH, M.N. et al. (eds.), **Conservation of Tropical Plant Species**. Springer, New York, 2013, p. 107-119.

FAPEPI - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí. O Potencial do babaçu. **Sapiência**, Teresina, n<sup>o</sup> 24 ano VI, jun/2010. p. 4.

FAVA, W. S.; COVRE, W. S.; SIGRIST, M. R. *Attalea phalerata* and *Bactris glaucescens* (Arecaceae, Arecoideae): Phenology and pollination ecology in the Pantanal, Brazil. **Flora**, v. 206, p. 575–584, 2011.

FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 52, n. 1, p. 53-56, 2008.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transient of somatic plant cells to an embryonic state. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 74, p. 202-228, 2003.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Agricola, Piracicaba**, v. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009.

FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C. K. A. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science**, v. 151, p.193–198, 2000.

FERNANDO, S. C.; VERDEIL, J. L., HOCHER, V., WEERAKOON, L. K., Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera* L. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, 72, p. 281–284, 2003.

FERNIE, A. R.; TRETHERWEY, R. N.; KROTZKY, A. J.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 763-769, 2004.

FERRARI, R. A.; SOLER, M. P. Obtention and characterization of coconut babassu derivatives **Scientia Agricola**, v.72, n.4, p.291-296, 2015.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F (org.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 323p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DÖRMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 11, p. 1157-1161, 2000.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BLAKE, P. S. Indeterminate development in desiccation-sensitive seeds of *Quercus robur* L. **Seed Science Research**, v. 4, n. 02, p. 127-133, 1994.

FKI, L.; Masmoudi, R.; Drira, N.; Rival, A. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 517–524, 2003.

FRANCIS, D.; SORRELL, D. A. The interference between the cell cycle and plant growth regulators: a mini-review. **Plant Growth Regulation**, v. 33, p.1-12, 2001.

GABR, M. F.; TISSERAT, B. Propagating palms in vitro with special emphasis on the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Scientia horticultrae**, v. 25, n.3, p. 255-262, 1985.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, n.43, p. 27-47, 2004.

GALLO-MEAGHER, M. E GREEN, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 253–256, 2002.

GEHLSSEN, C.A. Observações sobre o babassu (*Orbignya speciosa*) e sua germinação - a germinação da oiticica. **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio de Pernambuco**. Recife, Brazil, v. 2, p. 428-433, 1937.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Optimizing rooting and survival of oil palm (*Elaeis guineensis*) plantlets derived from somatic embryos **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 2015. DOI 10.1007/s11627-015-9669-x

GOVAERTS, R., DRANSFIELD, J., ZONA, S.F, HODEL, D.R.; HENDERSON, A. **World Checklist of Arecaceae**. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2011. Disponível em <http://apps.kew.org/wcsp/> acesso em 22 março 2012.

GUEYE, B. et al. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 35–45, 2009.

HAWKES, J. G.; MAXTED, N.; FORD-LLOYD, B. V. **The ex situ conservation of Plant Genetic Resources**. New York: Springer, 2000. ISBN: 978-94-010-5805-6 (Print) 978-94-011-4136-9 (Online)

HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, v. 1, p. 1-11, 2013.

HEIDSTRA, R. Asymmetric cell division in plant development. **Progress In Molecular and Subcellular Biology**, v. 45, p. 1-37, 2007.

HENDERSON, F. M. Morphology and Anatomy of Palm Seedlings. The New York Botanical Garden (Pbs.) **The Botanical Review**, v. 72, n. 4, p. 273-329. 2006.

HILAE, A.; TE-CHATO, S. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27 (Suppl. 3), p. 629-635, 2005.

HOLMES, E.; TANG, H.; WANG, Y. SEGER, C. The assessment of plant metabolite profiles by NMR-based methodologies. **Planta Medica**, v. 72, n. 9, p. 771, 2006.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behavior. In: ENGELS, M.M.; Toll, J. (eds) **IPGRI Technical Bulletin**, N. 1. J. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 1996.

IBGE **Produção da Extração Vegetal e Silvicultura**, v. 28, 2013, 69p. Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2013/default\\_xls\\_gr\\_e\\_uf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2013/default_xls_gr_e_uf.shtm)> Acesso em 18 ago 2015.

JAYASANKAR, S.; GRAY, D. J.; LITZ, R. E. High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. **Plant Cell Reports**, v 18 (7-8), p. 533-537, 1999.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91–110, 2005.

JIMÉNEZ, V. M. et al. Endogenous hormone levels in habituated nucellar *Citrus* callus during the initial stages of regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 92–100. 2001.

KARAMI, O.; AGHAVAISI, B.; POUR, A. M. Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. **Journal of Chemical Biology**, v. 2, p. 177–190, 2009.

KARUNARATNE, S.; PERIYAPPERUMA, K. Culture of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.): callus proliferation and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 62, p. 247–253, 1989.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (eds) Desiccation and survival in plants: Drying without dying. **CABI Publishing**, Oxon UK, p. 149-184, 2002.

KOCHANNEK, J. et al. Pre-zygotic parental environment modulates seed longevity. **Austral Ecology**, 35(7), p. 837–848, 2010. DOI: 10.1111/j.1442-9993.2010.02118.x

KONAN, E. E.; et al. In vitro conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 1-13, 2010.

KRIAA W. et al. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropropagation using completely mature female flowers **Comptes Rendus Biologies**, v. 335, p. 194–204, 2012.

KUMAR, V.; NAIDU, M. M.; RAVISHANKAR, G. A. Developments in coffee biotechnology—in vitro plant propagation and crop improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 87, n. 1, p. 49-65, 2006.

LÉDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, M. S. P. Cultura in vitro de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 13–22, 2001.

LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo in vitro de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 42, n.2, p. 147-154, 2007.

LIMA, J. R. DE O. et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 600-603, 2007.

LIMA, R. M. B. F. Territorialidade e Resistência: práticas espaciais criando novas regras de uso do território no extrativismo do babaçu. 2009. Disponível em: [http://egal2009.easyplanners.info/area02/2210\\_Figueiredo\\_Lima\\_Roberta\\_Maria\\_Batista\\_de.pdf](http://egal2009.easyplanners.info/area02/2210_Figueiredo_Lima_Roberta_Maria_Batista_de.pdf)

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 387-396, 2006.

LORENZI, H. KAHN, F.; NOBLICK, L. R.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira: Areaceae**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010.

LOW, E. T.; ALIAS, H.; BOON, S. H.; SHARIFF, E.; TAN, C. Y.; OOI, L.; SINGH, R.. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 62, 2008.

LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p. 209-215, 2010.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 485-496, 2014.

MAZRI M. A.; MEZIANI, R. An improved method for micropropagation and regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 176-184, 2013. DOI 10.1007/s13562-012-0147-9

MERKLE, S.A.; PARROTT, W.A.; FLINN, B.S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. ed. **In vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 155-203, 1995.

MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Frutos de Palmeiras da Amazônia**. Manaus: MCT/INPA, 2001. 120p.

MITEL, Y. C.; NGILA, J. C.; YEBOAH, S. O.; WESSJOHANN L.; SCHMIDT, J. NMR, GC-MS and ESI-FTICR-MS Profiling of Fatty Acids and Triacylglycerols in Some Botswana Seed Oils. **J Am Oil Chem Soc** v. 85, p. 1021-1032, 2008.

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



MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; DE SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic Embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 447–454, 2009.

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

NAWY, T.; LUKOWITZ, W.; BAYER, M. Talk global, act local – patterning the *Arabidopsis* embryo. **Current Opinion on Plant Biology**, v. 1, p. 28-33, 2008.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; CUNHA, I. R. G.; PIMENTA, M. A. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N. Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*). **Flora**, v. 208, p. 68-78, 2013.

NISSEN, P.; MINOCHA, S. C. Inhibition by 2,4-D of somatic embryogenesis in carrot as explored by its reversal by difluoromethylornithine. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 673–680, 1993.

OLIVEIRA, M. S.P.; RIOS, S. A. **Potencial econômico de algumas palmeiras nativas da Amazônia**, jan 2014. Conference Paper [http://www.researchgate.net/publication/272175377\\_Potencialeconomico\\_de\\_algunas\\_palmeiras\\_nativas\\_da\\_Amazonia](http://www.researchgate.net/publication/272175377_Potencialeconomico_de_algunas_palmeiras_nativas_da_Amazonia)

OROZCO-SEGOVIA, A., BATIS, A.I., ROJAS-ARÉCHIGA, M., MENDOZA, A. Seed biology of palms: a review. **Palms**, v. 47, p. 79–94, 2003.

OTHMANI, A.; BAYOUDH, C.; DRIRA, N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 71–79, 2009.

PÁDUA, M. S., PAIVA, L. V., PIRES, M. F., DA SILVA, L. G. T., DE CASTRO, E. M., & STEIN, V. C. Influence of culture medium and age of zygotic embryos on in vitro germination of *Elaeis guineensis* Jacq. **African Journal of Biotechnology**, 13(14): 1515, 2014.

PASTERNAK, T. P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VANONCKELEN, H. A.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfalfa. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1807-1819, 2002.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON, L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 21–28, 2007. Disponível em DOI 10.1007/s00299-006-0216-4

PERERA, P. I. P.; YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCHER, V.; · VERDEIL, J. L.; WEERAKOON, L. K. Effect of growth regulators on microspore embryogenesis in coconut anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 2, p. 171-180, 2009a.

PERERA, P. I. P.; VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; GUNATHILAKE, T. R.; YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCHER V.; VERDEIL, J. L.; WEERAKOON, L. K. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 73–81, 2009b.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SÁENZ, L.; GONZÁLEZ, T.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* L. plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 42, n 1, p. 37-43, 2006.

PINHEIRO, C.U.B. Germination strategies of palms: the case of *Schippia concolor* Burret in Belize. **Brittonia**, v. 53, p. 519–527, 2002.

RAI M. K.; SHEKHAWAT, N. S.; HARISH; GUPTA, A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 179–190, 2011.

RAJANAIDU N.; AINUL, M. M. Conservation of Oil Palm and Coconut Genetic Resources IN: NORMAH, M.N. et al. (eds.) **Conservation of Tropical Plant Species**, Springer: New York, 2013.

RAO, N. K. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.

REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. 2015. DOI 10.1007/s11627-015-9722-9.

REED, Barbara M. **Cryopreservation—practical considerations**. In: Plant cryopreservation: A practical guide. Springer New York, p. 3-13, 2008.

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination **Trees**, 26:851–863, 2012. DOI 10.1007/s00468-011-0659-2

ROBERTS, E.H. (1973). Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, 1:499-514.

ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHERWEY, R.N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. **Plant Journal**, v. 23, p. 131–142, 2000.

ROESSNER-TUNALI, U.; HEGEMANN, B., LYTOVCHENKO, A., CARRARI, F., BRUEDIGAM, C., GRANOT, D., & FERNIE, A. R. ET AL. Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. **Plant Physiology**, v. 133, p. 84–99, 2003.

ROSE, Ray J. et al. Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular-derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 10, p. 2227-2235, 2006.

ROYAL BOTANIC GARDENS KEW: **Seed Information Database (SID)** Version 7.1., 2015. Available from: <http://data.kew.org/sid/> (Access on February 2015)

SÁENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMANDARIZ, B.; CHAN, J. L.; VERDEIL, J.-L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 42:19–25, 2006.

SÁENZ, L.; HERRERA-HERRERA, G.; UICAB-BALLOTE, F.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*) **Plant Cell Tiss Organ Cult** v. 100, p. 301–308, 2010.

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.

SALEH, E. O. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA. Advances in Somatic Embryogenesis of Palm Trees (Arecaceae): Fundamentals and Review of Protocols. In: A. Mujib (ed.), **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and its Applications** Springer India, 2016. DOI 10.1007/978-81-322-2683-3\_15

SALM, R. Tree species diversity in a seasonally-dry forest: the case of the Pinkaití site, in the Kayapó Indigenous Area, southeastern limits of the Amazon. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 3, p. 435 – 443, 2004.

SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ, V. M. Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. **Agronomía mesoamericana**, v. 21, n.1, p. 193-205, 2010.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histochemical Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*) **Annals of Botany** v. 98, p. 301–308, 2006.

SANTOS, K. G. B.; MUDSTOCK, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. **Plant Cell Reports**, v.16, p. 859–864, 1997.

SANTOS, M. R. A.; ROCHA, J. F. DA; FERREIRA, M. G. R.; CORREIA, A. DE O. Estabelecimento in vitro e calogênese em explantes foliares de pupunheira **Revista de Ciências Agrárias.**, v. 55, n.3, p. 197-203, 2012.

SANTELLI, P.; CALBO, M. E. R.; CALBO, A. G. Fisiologia pós-colheita de frutos da palmeira *Mauritia vinifera* Mart. (Arecaceae) **Acta botanica brasílica** v. 23, n.3, p. 697-702, 2009.

SANTOS, M. F.; DAMASCENO-SILVA, K. J.; CARVALHAES, M. A.; LIMA, P. S. C. Genetic variation detected by RAPD markers in natural populations of babassu palm (*Attalea speciosa* Mart.) **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n.2, p. 6124-6135, 2015.

SARASAN, V.; RAMSAY, M. M.; ROBERTS, A. V. In vitro germination and induction of direct somatic embryogenesis in “Bottle Palm” (*Hyophorbe lagenicaulis* (L. Bailey) H. E. Moore), a critically endangered Mauritian palm. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1107-1111, 2002.

SAUTER, H.; LAUER, M.; FRITSCH, H. Metabolic profiling of plants—a new diagnostic technique. **ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)**, v. 443, p. 288–299, 1991.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; FERMINO JR., P. C. P.; SILVA, T. L.; COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, n.4, p. 378-385, 2010.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO JR., P. C. P.; LUIS, Z. G; FREITAS, E. de O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*) **Plant cell, Tissue and Organ Culture** v. 109, p. 501–508, 2012.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S. et al. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS letters**, v. 579, n. 6, p. 1332-1337, 2005.

SILVA, J. A. T. da; DOBRÁNSZKI, J. Plant Thin Cell Layers: A 40-Year Celebration **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, p.922–943, 2013.

SILVA, R. de C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) **Journal of Plant Growth Regulation**, 2013. DOI 10.1007/s10725-013-9837-0

SOLER, M. P.; VITALI, A. D. A.; MUTO, E. F. Tecnologia de quebra do coco babaçu (*Orbignya speciosa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 717-722, 2007.

SOUZA, M. H. S. L. et al. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p.1–5, 2011.

STEIN, S. E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from GC/MS data. **Journal of American Society of Mass Spectrometry**, v. 10, p. 770–781, 1999.

STEINMACHER D.A., CANGAHUALA-INOCENTE G.C., CLEMENT C.R., GUERRA M.P. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 43, p.124–132, 2007a.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany** v. 100, p. 699–709, 2007b.

TE-CHATO, S; HILAE, A. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *tenera*). **Journal of Agricultural Technology** v. 3, n.2, p. 345-357, 2007.

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports** v. 13, n. 5, p. 247-250, 1994.

TENÓRIO, E. C. **O babaçu e coqueiros assemelhados em Minas Gerais**. Belo Horizonte, 1982, 216p.

THAWARO, S.; TE-CHATO, S. Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. **Journal of Agricultural Technology** v. 5, n. 1, p. 167-177, 2009.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances** v. 26, p. 618–631, 2008.

TILLICH, H.-J. Development and organization. In: **Flowering Plants· Monocotyledons**. Springer Berlin Heidelberg, 1998, p. 1-19.

TILLICH, H. J. Ancestral and derived character states in seedlings of monocotyledons. **Monocots. Systematics and evolution**. Melbourne: CSIRO, p. 221-228, 2000.

TILLICH, H. J. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). **Annals of Botany**, v. 100, n. 7, p. 1413-1429, 2007.

TOMLINSON, P. B. Anatomy of the monocotyledons. II. Palmae. **Clarendon Press: Oxford University Press.**, 1961.

TOMLINSON, P. B. The uniqueness of palms. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 151, p. 5–14, 2006.

TOONEN, M. A. J.; DE VRIES, S. C. Initiation of somatic embryos from single cells. In: WANG T.L. AND CUMING A. (eds), **Embryogenesis: the Generation of a Plant**. Bios Scientific Publishers, Oxford, p. 173–189. 1996.

TRAN THANH VAN K., BUI V. L. Current status of thin cell layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis. In: Mohan SJ, Gupta PK, Newton RJ (eds) **Somatic embryogenesis in woody plants**. Kluwer, Dordrecht, p. 51–92, 2000.

TRAVESET, A. **Ecology of plant reproduction**: Mating systems and pollination. In: PUGNAIRE, F. I.; VALLADARES, F. eds. **Handbook of Functional Plant Ecology**. New York; Marcel Dekker, Inc., 1999.

TROPICOS Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em <http://www.tropicos.org> acesso em 13 Apr 2012.

TWEDDLE, J. C.; DICKIE, J. B.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology** v. 91, n. 2, p. 294-304, 2003.

UHL, N. W.; DRANSFIELD, J. **Genera Palmarum**: A Classification of Palms Based on the Work of Harold E. Moore Jr. Lawrence, Kansas: L. H. Bailey Hortorium and International Palm Society, 1987.

VALVERDE, R.; ARIAS, O.; THORPE, T. A. Picloram-induced somatic embryogenesis in pejobaye palm (*Bactris gasipaes* HBK). **Plant cell, tissue and organ culture** v. 10, n. 2, p. 149-156, 1987.

VERDEIL JL, HUET C, GROSDÉMANGE F, BUFFARD-MOREL J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 13, p.218–221, 1994. doi:10.1007/BF00239896

VERDEIL, J. L.; BUFFARD-MOREL, J. Somatic Embryogenesis in Coconut (*Cocos nucifera* L.) In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.) **Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I** Biotechnology in Agriculture and Forestry v. 30, p. 299-317, 1995.

VERDEIL L, ALEMANN L, NIEMENACK N, TRANBARGER TJ. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v.12, p. 245–252, 2007. doi:10.1016/j.tplants.2007.04.002

VIÑAS, M.; JIMÉNEZ, V. M. Factores que influyen em la embriogénesis somática in vitro in palmas (Arecaceae) **Revista Colombiana de Biotecnología** v. XIII, n. 2, p. 229-242, 2011.

VON ARNOLD, S. Somatic embryogenesis. In: GEORGE, E. F. et al. (eds) **Plant propagation by tissue culture** 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant cell, Tissue and Organ culture** v. 69, p. 233-249, 2002.

WAGNER, C., SEFKOW, M. & KOPKA, J. Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. **Phytochemistry** v. 62, p. 887–900, 2003.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, v. 242, p. 397–406, 2015. DOI 10.1007/s00425-015-2312-6

WALTERS, C.; WHEELER, L. M.; ANDGROTHENHUIS, J. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. **Seed Science Research**, v. 15, p. 1–20, 2005. doi: 10.1079/SSR 2004195

WANG, H.C.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, root and stem-derived callus cultures of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, v. 50 n. 2, p. 279-282, 2006.

WANG, H.C.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. Morphogenetic routes of long-term embryogenic callus culture of *Areca catechu*. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 1-5, 2010.

WANG, Y. L.; FAN, M. J.; LIAW, S. L. Cryopreservation of in vitro–grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Botanical Bulletin of the Academia Sinica**, v. 46, p. 29-34, 2005.

WCSP - **World Checklist of Selected Plant Families**. Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-17840>> Acesso em 06 nov. 2011.

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

ZAVATTIERI, M.A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology** ISSN: 0717-3458 V.13 N.1, Issue of January 15, 2010.

ZELÉNÁ, E. The effect of light on metabolism of IAA in maize seedlings. **Plant growth regulation**, v. 30, n. 1, p. 23-29, 2000.

ZENG, F.; ZHANG, X.; CHENG, L.; HU, L.; ZHU, L.; CAO, J.; GUO, X. A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. **Genomics**, v. 90, n. 5, p. 620-628, 2007.

ZHANG, H.; OGAS, J. An Epigenetic Perspective on Developmental Regulation of Seed Genes. **Molecular Plant** , v. 2, n. 4, p. 610–627, 2009.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

ZOUINE, J.; EL HADRAMI, I. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 221–226, 2007.



### 3. CAPÍTULOS

## Capítulo I

### **Fisiologia da germinação e estabelecimento da plântula de babaçu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng) *in vitro*: aspectos morfoanatômicos, bioquímicos e histoquímicos**

#### **Resumo**

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng) é uma palmeira oleaginosa nativa do Brasil, importante como fonte de diversas matérias-primas para as indústrias cosmética e alimentícia, cuja germinação foi pouco estudada até o momento. Os estudos básicos relativos à germinação e à regeneração das palmeiras *in vitro* são importantes para ajudar a definir parâmetros indicativos de propagação. Este trabalho teve como objetivo estudar os aspectos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e bioquímicos da germinação de embriões zigóticos de babaçu *in vitro*. Para isso, o crescimento e o desenvolvimento do cotilédone e das estruturas da plântula foram avaliados durante 0, 7, 14, 21, 30, 45, 90 e 120 dias após a inoculação do embrião no meio de cultivo. As massas fresca e seca, além do comprimento das estruturas, foram determinados ao longo do período de germinação. As análises bioquímicas incluíram a quantificação dos teores de amido e de açúcares solúveis totais, a análise do perfil metabólico e dos ácidos graxos e os resultados foram comparados com testes histoquímicos. Verificou-se que a germinação ocorreu lentamente, com o crescimento do cotilédone até os 45 dias, período a partir do qual surgiram os catafilos e o eófilo, seguidos da raiz primária. A quebra de proteínas e lipídios no início da germinação garantiu a fonte de carbono e energia para as fases iniciais da germinação. Aos 7 dias, após o início da germinação, os triacilgliceróis foram degradados, liberando a molécula de glicerol mais, pelo menos, 11 diferentes ácidos graxos. Neste mesmo período, aminoácidos com apenas um grupo amino foram encontrados em maior quantidade nos tecidos do cotilédone. Após 45 dias, os teores de asparagina apresentaram um aumento acentuado, relacionado à transferência de nitrogênio para a plântula em desenvolvimento. Estes são os primeiros dados de perfil metabólico relatados para o embrião durante a germinação de uma palmeira. A germinação *in vitro* de embriões isolados é uma alternativa rápida e viável para a obtenção de plantas de *Attalea speciosa*.

**Palavras-chave:** ácidos graxos, Arecaceae, embrião zigótico, GC-MS, perfil metabólico

## Introdução

As palmeiras, plantas da família Arecaceae, são nativas de regiões tropicais e subtropicais (Dransfield et al., 2008) e são economicamente importantes porque fornecem material para a construção, obtenção de alimentos, de combustíveis, de medicamentos e para a ornamentação e ainda são utilizadas para a subsistência (Eiserhardt et al., 2011; Meerow et al., 2012).

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng) é uma palmeira perene oleaginosa nativa do Brasil (Miranda et al., 2001) encontrada nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (Lorenzi et al., 2010). Nestas regiões, essa palmeira é aproveitada de forma extrativista e utilizada como fonte de alimentos e matéria-prima para a construção de barcos, pontes e casas e na ornamentação de jardins e praças (Santelli et al., 2009; Souza et al., 2011). A grande maioria das palmeiras é propagada principalmente por sementes, devido à limitação de formas de propagação vegetativa, restritas a poucas espécies; por isso, o estudo da germinação é importante para a compreensão da biologia destas plantas (Henderson, 2006).

O estudo da germinação auxilia na compreensão da interação entre palmeiras e seu ambiente natural. O desenvolvimento de tecnologias viáveis para a produção de plantas jovens pode contribuir para o estabelecimento de plantios comerciais, escalonamento da produção de frutos e o uso sustentável do babaçu (Neves et al., 2013). Nesse contexto, os estudos básicos relativos à germinação e o estabelecimento de protocolos para a clonagem e a regeneração das plantas *in vitro* são de fundamental importância, pois podem ajudar a definir as condições ideais para a germinação e padronizar a terminologia usada na descrição das plântulas (Ribeiro et al., 2012).

A estrutura dos embriões e os processos de germinação das palmeiras são bastante peculiares (Uhl; Dransfield, 1987), com o desenvolvimento de estruturas especiais como um pecíolo cotiledonar ou uma lígula (Dransfield et al., 2008). O tipo de germinação é um dos critérios taxonômicos para o gênero *Attalea*, e é do tipo remota tubular e de caracteriza pelo desenvolvimento da planta distante do endosperma, após o crescimento do cotilédone de formato tubular ((Dransfield et al., 2008; Neves et al., 2013).

As dificuldades na germinação de palmeiras do complexo babaçu já foram relatadas por vários autores (Orozco-Segovia et al., 2003; Pinheiro, 2002; Neves et al., 2013) e estão provavelmente relacionadas a uma série de fatores estruturais e fisiológicos, incluindo dormência física, embebição lenta, exigência de temperaturas específicas, dormência

fisiológica e suscetibilidade à deterioração e predação (Neves et al., 2013). Estudos recentes em *A. vitrivir* concluíram que o opérculo possivelmente protege o embrião da predação e causa a dormência do diásporo verificada nesta espécie (Neves et al., 2013).

Uma grande variedade de padrões de desenvolvimento de plântulas foi observada entre as diferentes espécies de Arecaceae, o que reforça a necessidade de estudos que avaliem os aspectos estruturais envolvidos na germinação e no desenvolvimento da semente (Henderson, 2006).

Entre os estudos com diversas espécies de palmeiras podemos destacar aqueles referentes à fisiologia da germinação em condições naturais (em substrato), com enfoque nas variáveis ambientais e genótipos (Martins-Corder; Saldanha, 2006; Roberto et al., 2011; Green et al., 2013), nos aspectos ecofisiológicos da germinação (Orozco-Segovia et al., 2003; Baskin; Baskin, 2014), nos aspectos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais da semente e do embrião (DeMason, 1988; Sekhar; DeMason, 1988; Moura et al., 2010) e do desenvolvimento da plântula (DeMason, 1985; Henderson, 2006; Iossi et al., 2006; Oliveira et al., 2010; Neves et al., 2013; Oliveira et al., 2013), além da proteômica da germinação (Sghaier-Hammami et al., 2009).

Os estudos sobre fisiologia da germinação realizados *in vitro* testaram principalmente condições de cultivo (Lédo et al., 2007; Pech y Aké et al., 2007; Thawaro; Te-Chato, 2010; Ribeiro et al., 2011; Silva et al., 2012; Waldow et al., 2013; Leite et al., 2014; Pádua et al., 2014). Poucos analisam aspectos morfológicos (Ribeiro et al., 2011; Koffi et al., 2013) e anatômicos (Magalhães et al., 2013; Ribeiro et al., 2012; Silva et al., 2014). Adicionalmente, poucos dentre os citados tratam de aspectos bioquímicos e de mobilização de reserva durante a germinação (DeMason, 1985; DeMason 1988, Oliveira et al., 2013).

As tecnologias de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) permitem a identificação e a quantificação robusta de algumas centenas de metabólitos dentro de um único extrato, que incluem ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, álcoois, intermediários fosforilados e compostos lipofílicos (Fiehn et al., 2000; Roessner et al., 2000; Liseč et al., 2006). O perfil metabólico tem importantes aplicações na caracterização e no diagnóstico de diferentes condições genéticas e ambientais, que afetam o metabolismo e o fenótipo das plantas (Fiehn et al., 2000; Liseč et al., 2006), podendo ser utilizados para complementar dados fisiológicos da germinação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos fisiológicos da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu, incluindo aspectos relacionados com a morfogênese, anatomia, histoquímica e bioquímica.

### Material e métodos

Os frutos maduros de babaçu foram coletados de matrizes adultas em populações naturais de São Luís e Codó, MA, para o teste preliminar de germinação. As coletas foram realizadas em outubro de 2011 e outubro de 2012.

Para os experimentos relacionados aos aspectos morfológicos, bioquímicos, anatômicos e histoquímicos da germinação, os frutos maduros de babaçu foram coletados de matrizes adultas que fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Babaçu da Empresa Meio Norte – CPAMN, Teresina, PI. A coleta foi realizada em dezembro de 2013 (Figura 1).



**Figura 1:** Aspecto geral da árvore, fruto e semente de *Attalea speciosa*. A) Matriz com cachos maduros no Banco Ativo de Germoplasma, Teresina, PI, com cerca de 7 m de altura; B) fruto (fr) em corte longitudinal evidenciando a posição da semente (se) e do embrião (em); C) semente isolada; D) semente em corte longitudinal evidenciando o tegumento (te), o endosperma (en) e o embrião (em). Os quadrados representam 1x1cm. (Fotos: E. O. L. Saleh)

Os frutos foram processados no próprio local de coleta, tendo sido despolpados e o endosperma foi quebrado manualmente para a retirada da semente (amêndoa), que foi mantida intacta. As sementes foram mantidas em caixas de papelão, à temperatura ambiente, por uma semana, antes do início dos experimentos.

#### *Desinfestação das sementes e extração dos embriões zigóticos*

As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, com imersão em álcool 70% (v/v) por 3 min e, posteriormente, imersas em solução de hipoclorito de sódio (2,5% i.a., v/v) por 30 min, lavadas três vezes com água destilada estéril, antes da retirada dos embriões. Ainda em condições assépticas, as sementes foram colocadas sobre uma placa de Petri e os embriões zigóticos foram removidos utilizando-se pinça e bisturi e, em seguida, foram inoculados no meio de cultivo.

#### *Condições básicas para o cultivo dos embriões*

O meio de cultivo básico utilizado foi o de MS (Murashige e Skoog, 1962), com 50% dos sais e 100% das vitaminas (Maciel et al., 2010), acrescido de ácido pantotênico a  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  e biotina a  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  (Luis et al., 2010). O pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes de se adicionar Phytigel<sup>TM</sup> (Sigma) a  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  e carvão ativado (Sigma) a  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , quando utilizado. Após o preparo, o meio foi esterilizado com vapor a  $121^\circ \text{C}$  à pressão de 1.3 atm por 15 min.

Todos os experimentos foram realizados em tubos de ensaio de 25x150 mm contendo 10 mL do meio de cultura básico e os tubos de ensaio foram vedados com filme plástico de PVC. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e de intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas tipo LED, sob fotoperíodo de 16 horas (Luis et al., 2010).

#### *Avaliação das condições de iluminação e presença/ausência de carvão ativado na germinação de embriões zigóticos in vitro*

Após serem isolados em câmara de fluxo laminar, cada embrião foi acondicionado em um tubo de ensaio de 25x150 mm, contendo 10 mL do meio de cultura básico, acrescido ou não de carvão ativado (Sigma) a  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , sob condições de iluminação ou escuro, por 28 dias, quando as plântulas jovens ou os embriões foram subcultivados em meio original

de MS A partir deste momento, as plântulas, germinadas sob luz ou escuro, foram mantidas em sala de crescimento, nas condições descritas acima.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos, com 18 embriões para cada tratamento. Os tratamentos foram: 1. Meio MS + carvão ativado + luz; 2. Meio MS + carvão ativado - luz; 3. Meio MS - carvão ativado + luz e 4. Meio MS - carvão ativado - luz. A germinação das plantas foi avaliada após 1 e 5 meses, considerando-se o desenvolvimento do haustório, do pecíolo cotiledonar, da parte aérea e da raiz.

O material foi fotografado com câmara digital Sony DSCH-9 e, para as avaliações morfológicas, foi utilizado o estereomicroscópio Stemi SV-Zeiss.

#### Germinação de embriões zigóticos de babaçu *in vitro*

A partir da análise dos estudos preliminares, constatou-se que o tratamento em que o meio MS foi acrescido de carvão ativado, sob iluminação. Este protocolo foi utilizado para os estudos subsequentes relativos à germinação do embrião de babaçu *in vitro*.

Após serem isolados em câmara de fluxo laminar, cada embrião foi acondicionado em um tubo de ensaio de contendo 10 mL do meio de cultura básico adicionado de carvão ativado (Sigma) a  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento, nas condições descritas anteriormente.

Os aspectos relativos à germinação do embrião e ao estabelecimento inicial da plântula foram avaliados em oito períodos de tempo: 0, 7, 14, 21, 30, 45, 90 e 120 dias, com 26 embriões para cada tempo, após serem cultivadas da maneira descrita anteriormente.

#### Avaliação morfológica da germinação

A avaliação morfológica foi realizada em 20 plântulas para cada período de tempo, utilizando-se o estereomicroscópio Stemi SV-Zeiss e régua de 30 cm (Mendonça-Queiroz; Bianco, 2009). O material foi fotografado com câmara digital Sony DSCH-9 e as avaliações do comprimento do embrião, do haustório e do pecíolo cotiledonar, da parte aérea e da raiz foram obtidas a partir da utilização do programa Image Pro-Plus V. 4.5 (Media Cybernetica).

Além das medidas, o desenvolvimento normal do haustório e do pecíolo cotiledonar, da parte aérea e da raiz também foram avaliados. A caracterização

morfológica usou a nomenclatura de Orozco-Segovia et al. (2003), Henderson (2006) e Dransfield et al. (2008).

Estas mesmas 20 plântulas tiveram a massa fresca determinada em balança analítica e, posteriormente, foram congeladas em nitrogênio líquido por 48h e armazenadas em freezer a -80°C. As plântulas congeladas foram liofilizadas por 48h e tiveram a massa seca determinada em balança analítica.

#### *Avaliação bioquímica da germinação*

As 20 plântulas congeladas e liofilizadas, na etapa anterior, foram pesadas e maceradas com nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80 °C. O material foi pesado e submetido às análises de açúcares solúveis totais, amido, perfil metabólico e ácidos graxos.

*Extração e quantificação de açúcares solúveis totais (AST) e amido* – A extração de AST, a partir de 10 mg de material vegetal, foi realizada com etanol 80% por quatro vezes. O extrato foi quantificado pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) em espectrofotômetro Spectro Evolution 201 (Thermo Scientific). A curva padrão foi preparada com 8, 16, 32, 64 e 128 mg/mL de glicose. O amido restante, após a extração de AST, foi solubilizado e digerido duas vezes pelo método enzimático (Amaral et al., 2007), utilizando-se  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase (Megazyme). A quantificação foi realizada com a adição de GODPOD (Glicose PAP Liquiform/CENTERLAB), utilizando método colorimétrico. As medidas colorimétricas foram feitas em equipamento Spectra Max 190 (Molecular Devices) e analisadas com ajuda do programa Soft Max v. 6.1. As medidas foram realizadas em 8 repetições para cada tratamento, sendo que cada repetição foi lida em triplicata.

*Perfil metabólico* - O extrato foi obtido a partir de 5 mg de material, utilizando-se metanol e clorofórmio como solventes, e a derivatização foi feita com MSTFA (N-Metil-N-(Trimetilsilil)trifluoroacetamida) e hidrocloreto de metoxiamina, de acordo com o protocolo adaptado de “Fiehn Method” (Fiehn et al., 2000). As amostras foram injetadas no GC-MS (Agilent, 7890-5975), com coluna: HP-5MS, 30 m, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 $\mu$ m espessura de filme. Injeção: Splitless, 230 °C. Separação: fluxo de gás Hélio constante a 0,6 mL/min, programa de temperatura iniciando em 70 °C por 5 minutos, subindo para 330 °C à taxa de 5 °C/min. Detecção: atraso do solvente de 10 min., scan mode m/z de 70 a 600, com voltagem de -70 eV.

Os programas utilizados para análise dos cromatogramas foram o AMDIS (v.32) e a NIST MSSearch junto com uma biblioteca contendo compostos de interesse. O



alinhamento dos cromatogramas das 3 repetições de cada amostra foi feito utilizando o programa Metalign (Lommen, 2009) e a abundância relativa de cada composto foi obtida utilizando-se íons específicos. As medidas foram realizadas em 3 repetições para cada tratamento, cada repetição com leituras feitas em triplicata.

*Ácidos graxos* – Os ácidos graxos contidos em 5 mg de massa seca foram convertidos para sua forma metil-éster (FAMES) usando o método *in situ* com ácido hidróclorídrico/metanol (Laurens et al., 2012). As amostras foram aquecidas a 85 °C por 1h na presença de 0,2 mL de solução clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e 0,3 mL de ácido clorídrico 6% em metanol. Os FAMES foram extraídos pela adição de 1,0 mL de hexano. Após uma hora, a fase sobrenadante do hexano foi removida e transferida para frascos de vidro, para a análise em GC-MS. As amostras foram analisadas no GC-MS, equipado com uma coluna capilar INNOWAX de 30 m (Agilent Technologies). Injeção: 1 µL de amostra foi injetada na razão 30:1 com temperatura de injeção de 250 °C. Separação: fluxo de gás Hélio constante 1 mL/mL, programa de temperatura iniciando em 70 °C, subindo para 130 °C à taxa de 20 °C/min e depois para 260 °C à taxa de 10 °C/min, posteriormente mantendo a temperatura final por 5 minutos. Quantificação: programa Agilent ChemStation e uma mistura padrão de FAMES (Grain FAME standard, Sigma-Aldrich, USA). As medidas foram realizadas em quatro repetições para cada tratamento, cada repetição com leituras feitas em triplicata.

#### *Anatomia e histoquímica da germinação*

Para cada tempo, 0, 7, 14, 21, 30, 45, 90 e 120 dias, seis plantas foram fixadas em Karnovsky (1965) modificado com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4%, por 24 h sob vácuo e posteriormente foram lavadas por três vezes com tampão cacodilato a 0,05 M. As amostras foram seccionadas e armazenadas no mesmo tampão sob refrigeração para análises anatômicas e histoquímicas posteriores.

Após uma série de desidratação alcoólica, modificada em função do tamanho das amostras, as amostras foram embebidas e incluídas em historresina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha) de acordo com especificações do fabricante. Seções longitudinais das amostras foram cortadas de forma seriada em micrótomo rotativo manual (Leica RM 2125RT) a 0,7 µm e posicionadas em lâminas de vidro para posterior coloração.

Para análise anatômica as lâminas foram coradas com azul de toluidina a 5% (O'Brien, 1964). As análises histoquímicas foram feitas com Xilidine Ponceau, para

proteínas (Vidal, 1970) e com PAS (reagente de Schiff) para polissacarídeos neutros (O'Brien; McCully, 1981). As lâminas foram preservadas com Entellan® e lamínula.

Amostras de embrião zigótico não fixado, a fresco, foram seccionadas com micrótomo de bancada e os cortes foram corados com Sudan IV para lipídios totais (Gerlach, 1984) e com Lugol (Jensen, 1962) para amido. As lâminas foram vedadas com glicerina (50%) e lamínula, antes de serem fotografadas.

As lâminas foram analisadas com microscópio Leica (DM 750) com sistema de captura de imagem e utilizando-se o software Leica Application Suite (LAS EZ).

#### *Desenho experimental e análise estatística*

O desenho experimental foi inteiramente casualizado e os resultados dos experimentos foram submetidos a teste de análise de variância utilizando o Programa SISVAR (DEX/UFLA v.5.3) (Ferreira, 2011). As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Scott Knott, com 5% de significância. Dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo a fórmula arco seno  $(x/100)^{0,5}$ .

## **Resultados e Discussão**

### *Avaliação das condições de iluminação e presença/ausência de carvão ativado na germinação de embriões zigóticos in vitro*

A germinação e o estabelecimento de plântulas foram avaliados através do crescimento e desenvolvimento das seguintes estruturas: cotilédone (pecíolo cotiledonar e haustório), parte aérea e raiz. Embora a protrusão da radícula seja o critério comumente utilizado para avaliar a germinação, no caso das palmeiras, esta avaliação é feita a partir do crescimento do cotilédone. Verificou-se que o desenvolvimento do cotilédone ocorreu de forma semelhante nos quatro tratamentos (Tabela 1). As condições de luz e a presença de carvão ativado favoreceram o desenvolvimento posterior das plântulas, como a formação de raízes (76,5%), de parte aérea (76,5%) e a maior formação de plantas normais (70,6 %). Somente com o desenvolvimento da parte aérea e da raiz, ou seja, a formação de uma planta normal, é que é possível que ocorra o estabelecimento das plantas posteriormente no ambiente *ex vitro*, pois se verificou que plantas que não apresentaram um desenvolvimento normal até o quinto mês, não se desenvolveram normalmente posteriormente (dados não mostrados).

**Tabela 1:** Germinação de embriões zigóticos de babaçu *in vitro*, na presença ou ausência de carvão ativado e na presença ou ausência de luz

Condições experimentais		Germinação após 1 mês	Crescimento e desenvolvimento após 5 meses			
Luminosidade	Carvão ativado		Embriões viáveis (%)	Parte aérea (%)	Raiz (%)	Cotilédone (%)
<b>Luz</b>	+	94,0 a	76,5 a	76,5 a	100 a	70,6 a
	-	88,0 a	25,0 b	12,5 b	100 a	0,0 b
<b>Escuro</b>	+	94,0 a	52,9 b	41,2 b	100 a	29,4 b
	-	94,0 a	29,4 b	23,5 b	100 a	23,5 b

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

Outros trabalhos envolvendo germinação *in vitro* de palmeiras testaram diferentes meios para germinação e concluíram que o meio de MS é eficiente, tanto com 100% dos sais (Waldow et al., 2013) quanto com 50% dos sais, com sacarose e sem acréscimo de fitorreguladores (Thawaro; Te-chato, 2010; Pádua et al., 2014).

Em um estudo sobre a germinação de embriões de *A. vitrivir*, Leite et al. (2014) concluíram que há a necessidade de acrescentar fitorreguladores ao meio de cultivo. No entanto, as percentagens de germinação dos embriões tratados com ANA e KIN não diferiram estatisticamente do controle no trabalho daqueles autores.

Em nosso estudo com *A. speciosa*, no entanto, não foi necessário o uso de fitorreguladores e o meio de MS se mostrou adequado para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos.

#### *Avaliação morfológica da germinação*

O comprimento médio do embrião de *A. speciosa* observado neste trabalho foi de 9,0 mm, portanto, muito próximo do comprimento do embrião de *A. vitrivir*, em torno de 1 cm (Leite et al., 2014). Embora este seja pequeno quando comparado com o tamanho da semente (cerca de 4,5 cm), o embrião de babaçu é um dos maiores em comprimento, quando comparado com embriões de outras palmeiras, tais como *Acrocomia aculeata*, com 6,2 mm (Ribeiro et al., 2012) e *Phoenix roebelenii*, com 1,7 mm (Iossi et al., 2006), fato também confirmado por Leite et al. (2014) para *Attalea vitrivir*.

Os embriões de *A. speciosa* são pequenos e cilíndricos, ligeiramente elípticos em seção transversal, formados basicamente pelo cotilédone, em cuja porção basal se encontra o eixo embrionário. A maior porção do cotilédone é distal e é chamada hiperfilo, é de cor

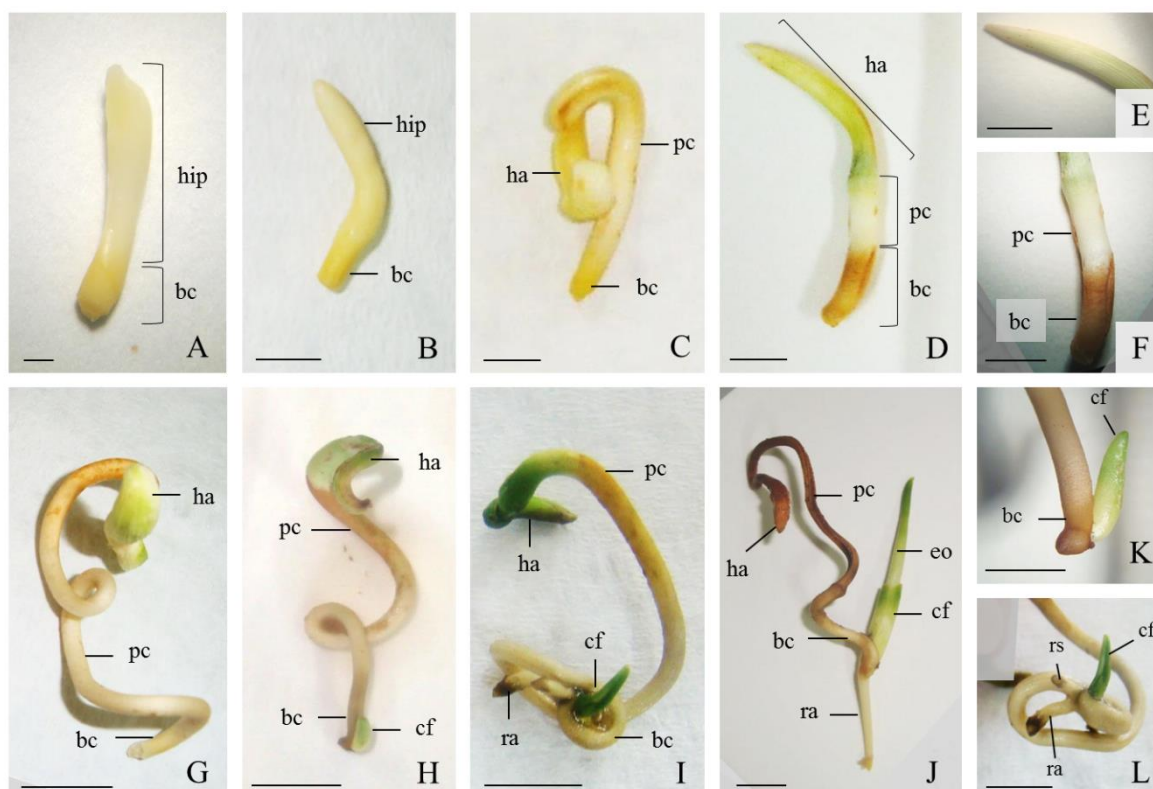
branca e possui invaginações apicais; a porção proximal (basal), chamada hipofilo ou bainha cotiledonar, envolve o eixo embrionário e possui cor amarelada (Figura 2A).

Após o início da germinação, começaram a se diferenciar as duas partes do hiperfilo: na porção distal encontrava-se o haustório e na porção mediana o pecíolo cotiledonar (Figura 2 B-F). O haustório tem a função de mobilizar as reservas da semente e transferir os compostos para o eixo embrionário em desenvolvimento e o mesmo já estava totalmente diferenciado por volta dos 14 dias. O haustório isolado, durante a germinação *in vitro*, ao ficar em contato com a luz, apresentou-se clorofilado (Figura 2 D, E, G, H, I), ao contrário do que acontece quando esta estrutura se encontra no interior da semente.

O alongamento do cotilédone continuou com o alongamento do pecíolo cotiledonar ou acopole (Tillich, 2007) de forma exponencial até os 45 dias quando este atingiu seu maior comprimento, de cerca de 10 cm (Figura 3). O crescimento do pecíolo cotiledonar é importante para a germinação por empurrar o eixo embrionário em direção ao solo, garantindo a sobrevivência da plântula diante de fatores adversos, como o fogo (Salm, 2004), além de ser um parâmetro taxonômico.

A partir dos 45 cessou crescimento do cotilédone e o mesmo entrou em senescência, período que coincidiu com a expansão das bainhas foliares (catafilos) e o surgimento da radícula. A germinação do babaçu foi bastante lenta, com as primeiras partes aéreas surgindo apenas aos 45 dias (Figura 2 H) e as primeiras radículas surgindo apenas aos 90 dias (Figuras 2 H e 3). Aos 45 dias verificaram-se os maiores valores de massa fresca, quando o cotilédone atingiu seu crescimento máximo e as estruturas da plântula ainda não tinham emergido (Figura 3).

Dados semelhantes foram verificados por Neves et al. (2013) durante a germinação da semente de *A. vitrivir*, *in vivo*, quando houve um crescimento pronunciado do pecíolo cotiledonar ao longo de 45 dias e a bainha foliar emergiu concomitantemente com o crescimento da raiz principal e a emissão de raízes laterais. Estes mesmos autores verificaram o surgimento da radícula na extremidade do pecíolo aos 27 dias de germinação, antes da parte aérea, porém o mesmo não ocorreu neste estudo, no qual a emergência da radícula ocorreu somente após a emergência dos catafilos (Figuras 2K e 3).

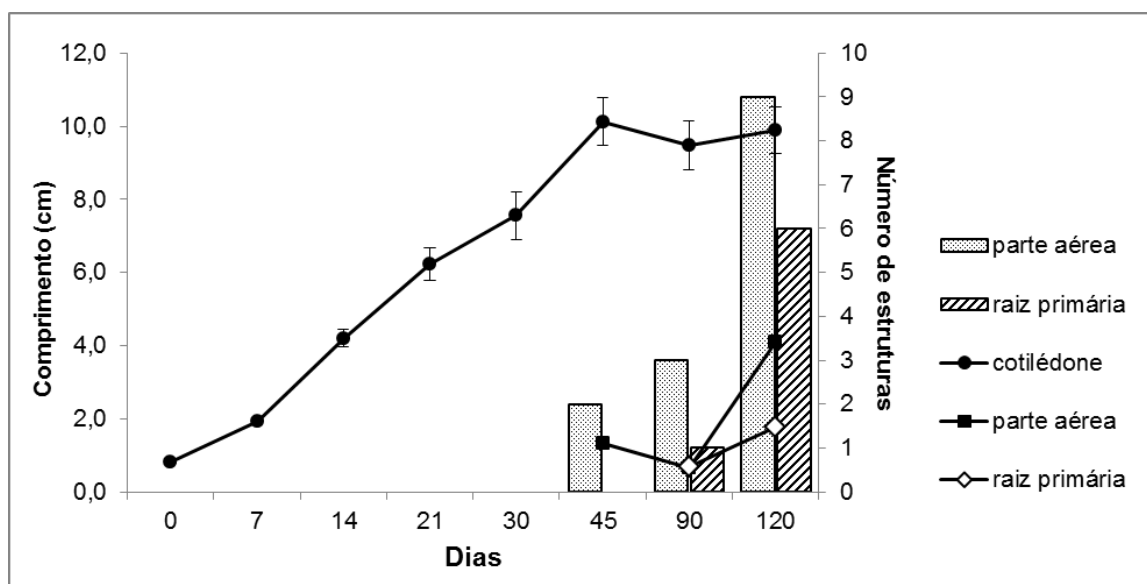


**Figura 2:** Etapas da germinação e estabelecimento da plântula de babaçu *in vitro*. A) embrião zigótico antes da germinação (tempo 0); Desenvolvimento do cotilédone e da plântula: B) após 7 dias; C) após 14 dias; D) após 21 dias; E) detalhe do haustório, após 21 dias; F) detalhe do pecíolo cotilédonar e da bainha cotilédonar, após 21 dias; G) após 30 dias; H) após 45 dias; I) após 90 dias; J) após 120 dias; K) detalhe da protrusão da parte aérea, mostrada em H; L) detalhe da plântula normal mostrada em I. Legendas: hip - hiperfilo; bc - bainha cotilédonar; ha - haustório; pc - pecíolo cotilédonar; cf - catafilo; eo – eófilo; ra - raiz primária; rs - raiz secundária. Escalas: A: 1 mm; B-F: 5 mm; G-L: 10 mm.

Neste estudo, embora uma pequena estrutura de formato acuminado (ca. 0,5 mm) pudesse emergir de alguns embriões logo no início da germinação, considerou-se como protrusão da radícula apenas os eventos que levaram à diferenciação dos tecidos e crescimento da raiz, de forma que esta pudesse ser observada de forma inequívoca (sem o uso de lupa) do cotilédone em crescimento. Somente as radículas que preencheram este critério foram avaliadas. Oliveira et al. (2013) acreditam que esta primeira estrutura cuja expansão é visível em algumas palmeiras, incluindo *Butia capitata*, se deva ao crescimento da “zona M” (meristemática) do cotilédone, que se localiza entre o eixo embrionário e a protoderme na porção proximal do embrião e a mesma seria responsável pelo crescimento inicial do cotilédone e sua função seria empurrar o opérculo e permitir a protrusão do embrião no início da germinação.

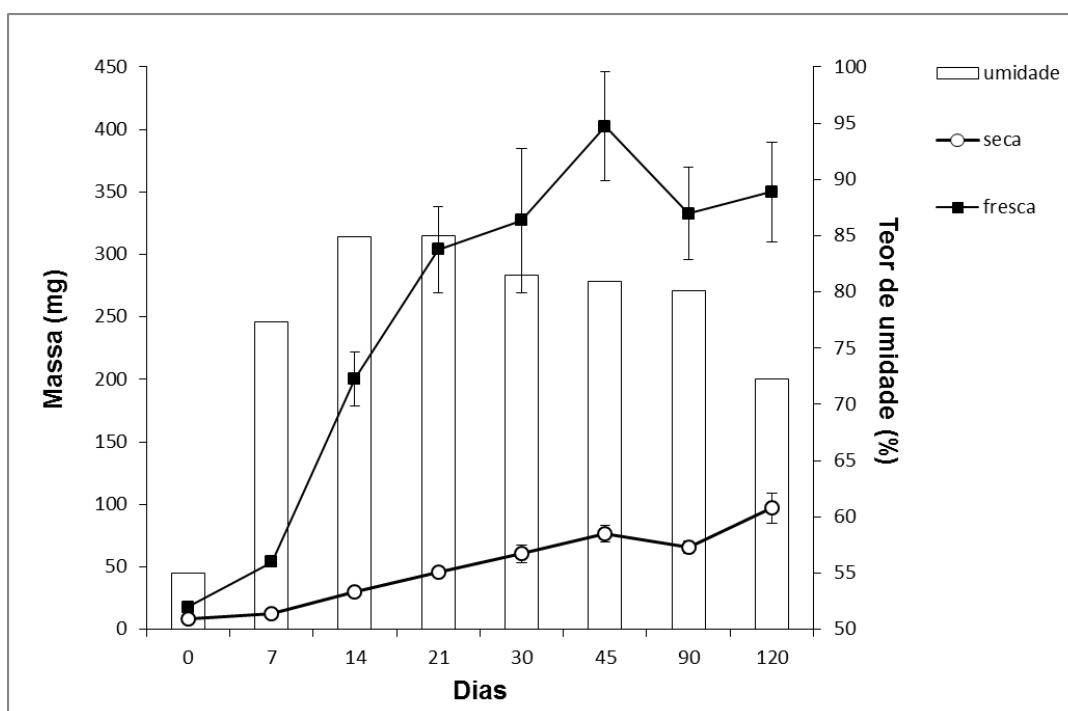
Segundo Orozco-Segovia et al. (2003), a emergência da plântula pode ocorrer tanto como o resultado do desenvolvimento da radícula quanto da plúmula. Serão necessários

estudos complementares para determinar se esta diferença entre *A. speciosa* e *A. vitrivir* tem caráter taxonômico ou se a mesma se deve simplesmente à diferença de protocolos, quando *A. speciosa* foi germinada a partir dos embriões isolados *in vitro*, enquanto *A. vitrivir* foi germinada com a semente intacta no substrato, em casa de vegetação.



**Figura 3:** Comprimento médio do cotilédone (●), da parte aérea (■) e da raiz primária (◇) até 120 dias, após o início da germinação do babaçu (valores no eixo principal) e valores acumulados do número de plântulas (colunas) que apresentaram emergência da parte aérea e da raiz primária (número acumulado, valores no eixo secundário). As barras indicam o erro padrão da média, com n=20 para o cotilédone.

Antes do início da germinação, o embrião do babaçu apresentou alto conteúdo de água, correspondendo a 55% da massa fresca. Este valor aumentou após sete dias de germinação, alcançando valores de 77,3% e continuou a subir até os 45 dias, o que explica a diferença entre as curvas de massa seca e fresca (Figura 4). O teor de umidade caiu aos 120 dias para 72,2%, quando o pecíolo cotiledonar e o haustório estavam senescentes. O teor de umidade do embrião e do cotilédone durante a germinação se aproximaram dos valores verificados para outras palmeiras durante a germinação, como no caso de *Butia capitata* (Oliveira et al., 2013).



**Figura 4:** Massa fresca e seca (em mg, linhas com valores no eixo principal) e teor de umidade (em %, barras com valores no eixo secundário) ao longo de 120 dias após o início da germinação de embriões zigóticos de babaçu *in vitro*. As barras indicam o erro padrão da média, com n=20.

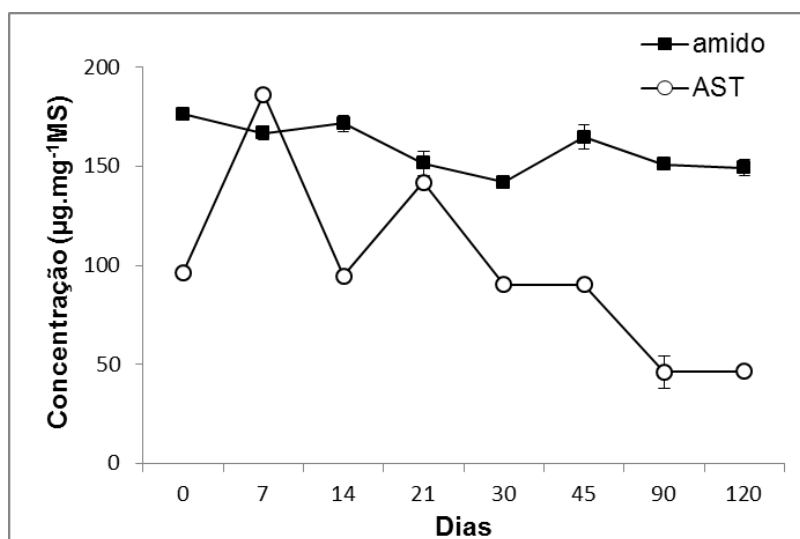
#### *Avaliação bioquímica da germinação*

A concentração de amido encontrada no embrião de *A. speciosa* apresentou uma leve tendência de queda ao longo de 120 dias de avaliação (Figura 5). Porém, como ocorreu acréscimo da biomassa, pôde-se deduzir que certa quantidade de amido foi sintetizada ao longo do período pelo embrião de *A. speciosa*, provavelmente a taxas levemente menores do que a taxa de degradação. O substrato, rico em sacarose, possivelmente foi a fonte de carbono que proporcionou a síntese de amido.

A concentração de açúcares solúveis totais aumentou significativamente aos 7 dias, praticamente dobrando sua concentração inicial de 96,0 para 186,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de massa seca e diminuindo em seguida (Figura 5). É provável que o pico de AST observado aos sete dias tenha ocorrido devido ao fornecimento de sacarose no meio de cultura.

Outro aumento na concentração de AST ocorreu no 21º dia, quando o cotilédone se encontrava totalmente expandido e clorofilado; este pico coincide com o aumento nas quantidades de glicose e de frutose que apresentaram, respectivamente, de 14,74 e 37,15 vezes a abundância relativa destes compostos no tempo zero (Figura 6). A partir de 21

dias, os valores de AST tenderam a diminuir até 120 dias, atingindo aproximadamente metade dos valores iniciais.



**Figura 5:** Teores de amido (■) e açúcares solúveis totais (AST) (○) durante a germinação de babaçu *in vitro*. (MS: massa seca). Os valores representam a média de 8 repetições  $\pm$  o erro padrão da média.

A análise do perfil metabólico permitiu identificar diversos compostos, entre eles carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos e uma poliamina. As alterações metabólicas foram avaliadas ao longo do tempo, tomando-se a altura do pico de cada metabólito no tempo zero como padrão, sendo os demais valores calculados em função deste valor. Os ácidos graxos foram quantificados utilizando uma curva de calibração produzida a partir de padrões (FAMES). Estes são os primeiros dados de perfil metabólico relatados para um embrião de palmeira.

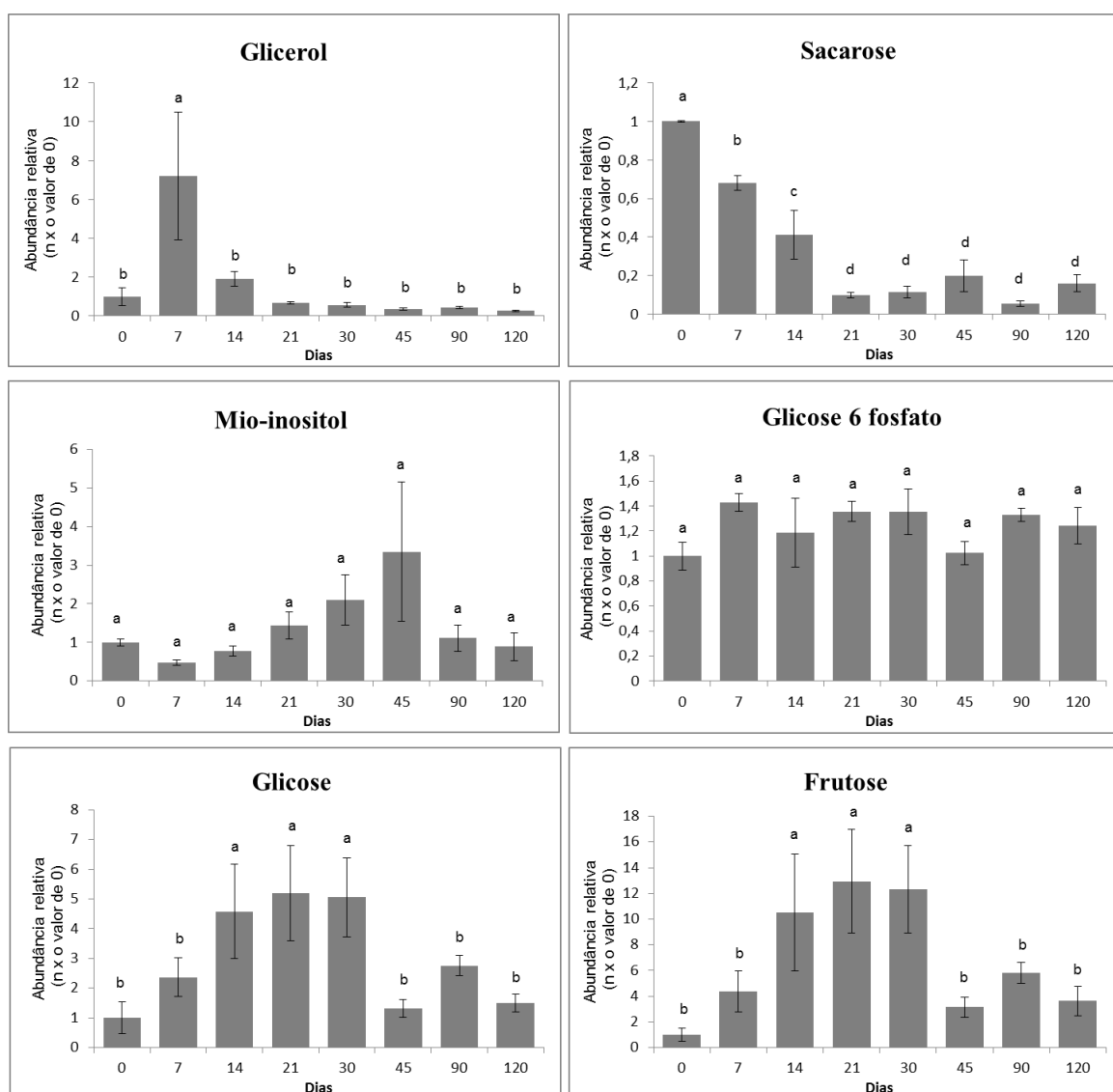
Os açúcares solúveis totais efetivamente identificados pelo perfil metabólico foram sacarose, glicose, glicose-6-fosfato e frutose, o álcool açúcar mio-inositol e também o glicerol (Figura 6). Verificaram-se traços de outros açúcares, cuja identificação foi comprometida pela reduzida altura do pico.

O aumento nos valores da abundância relativa de glicerol no 7º dia verificado nos dados do perfil metabólico (Figura 6) pode ser explicado pela degradação dos triacilgliceróis de reserva do cotilédone, que resulta na liberação de glicerol e ácidos graxos livres.

É interessante observar que a diminuição do pico de sacarose ocorreu concomitantemente ao aumento nos picos de glicose e frutose, o que sugere que a sacarose foi degradada, dando origem àqueles dois açúcares. O padrão de sacarose e de mio-inositol



foi semelhante ao verificado em arroz (Shu et al., 2008), com a quebra da sacarose influenciando o aumento da glicose nos dias subsequentes (a partir do 14º dia).



**Figura 6:** Teor relativo de glicerol, mio-inositol e carboidratos a partir do perfil metabólico durante a germinação de embriões isolados de babaçu *in vitro*. Os valores de abundância relativa são obtidos em relação às amostras coletadas no tempo 0. As barras indicam o erro padrão da média, com n=3; médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

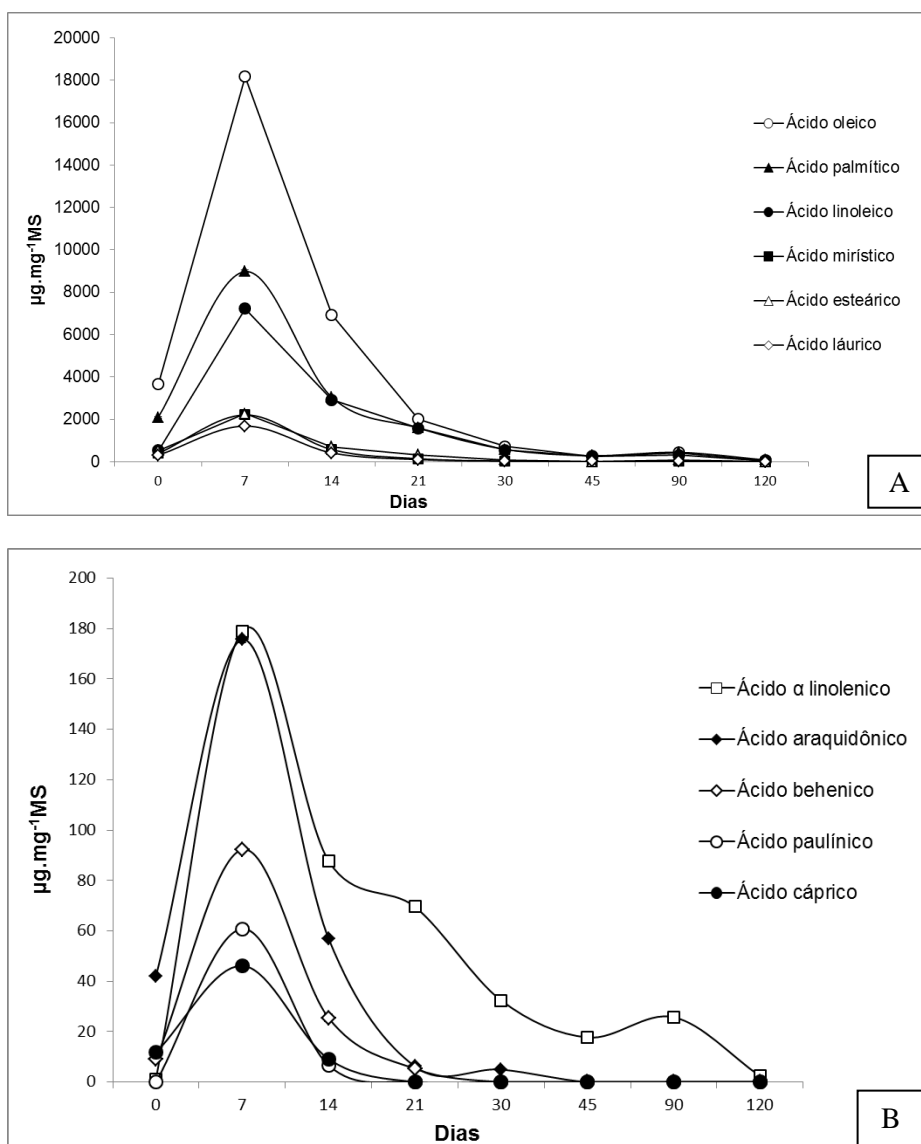
Os ácidos graxos encontrados nos tecidos cotiledonares e da plântula de babaçu durante a germinação foram: Ácido cáprico (C10:0), Ácido láurico (C12:0), Ácido mirístico (C14:0), Ácido palmítico (C16:0), Ácido esteárico (C18:0), Ácido oleico (C18:1<sup>Δ9</sup>), Ácido linolenico (C18:2<sup>Δ9,12</sup>), Ácido α-linolênico (C18:3<sup>Δ9,12,15</sup>), Ácido araquidônico (C20:0), Ácido paulínico (C20:1<sup>Δ9</sup>), Ácido behenico (C22:0). De forma semelhante ao que ocorreu com o glicerol, os ácidos graxos apresentaram um pico no 7º

dia da germinação, o que reforça a hipótese de que após esse tempo de germinação houve a maior taxa de degradação de triacilgliceróis (Figura 7), liberando os ácidos graxos, que provavelmente foram consumidos em etapas posteriores da germinação.

A degradação dos lipídios de reserva tem um importante papel no desenvolvimento vegetal ao fornecer os esqueletos de carbono que possibilitam o crescimento da plântula, imediatamente após a germinação. Este processo metabólico se inicia com lipases, que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis para liberar os ácidos graxos e o glicerol (Quettier; Eastmond, 2009). Os ácidos graxos são oxidados nos peroxissomos e metabolizados no ciclo do glioxalato, sendo convertidos em uma grande variedade de metabólitos essenciais (Nelson; Cox, 2002).

Os ácidos graxos encontrados em maior quantidade durante a germinação do babaçu foram o ácido oleico, o ácido palmítico, o ácido linoleico, o ácido esteárico, o ácido mirístico e o ácido láurico (Figura 7 A). As concentrações foram cerca de 100 vezes superiores às das demais ácidos graxos encontrados (Figura 7 B). Estes mesmos ácidos graxos foram encontrados no eixo embrionário durante a germinação de espécies de leguminosas (Gonçalves et al., 2002; Melo et al., 2009). Os ácidos oleico e palmítico são os mais abundantes no fruto de dendê (*Elaeis guineensis*) e os ácidos láurico e mirístico são os mais abundantes na amêndoa do dendê e do coco (*Cocos nucifera*) (Dyer et al., 2008).

Comparando-se a composição lipídica do embrião em germinação com os dados da amêndoa de babaçu (Ferrari; Soler, 2015) verificou-se que a composição lipídica difere qualitativamente e quantitativamente. Ácidos graxos de cadeia curta (C6 e C8) não foram encontrados no cotilédone, enquanto foram detectados na amêndoa, em pequenas quantidades. Por outro lado, os ácidos  $\alpha$ -linolênico, paulínico e behênico não são encontrados na amêndoa. A quantidade dos ácidos láurico e mirístico é superior nas amêndoas, sendo que o ácido láurico é o mais abundante, constituindo 42,79% dos lipídios da amêndoa. Os ácidos palmítico, oleico e linoleico são encontrados em percentagens maiores nos cotilédones, enquanto os ácidos esteárico e araquidônico apresentam baixas percentagens em ambos os tecidos.



**Figura 7:** Teor de ácidos graxos durante a germinação de embriões zigóticos de babaçu *in vitro*. A) ácidos graxos encontrados em maiores quantidades ( $>100 \mu\text{g}\cdot 100\text{mg}^{-1}$  de MS): ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido esteárico, ácido mirístico e ácido láurico. B) ácidos graxos encontrados em menores quantidades ( $<20 \mu\text{g}\cdot 100\text{mg}^{-1}$  de MS). Os valores representam a média para 4 repetições  $\pm$  o erro padrão da média; MS: massa seca.

Os picos relativos a cada um dos aminoácidos detectados sofreram mudanças consideráveis ao longo da germinação *in vitro* do embrião do babaçu (Tabela 2). De modo geral, observou-se que os aminoácidos com apenas um grupo amino apresentaram maiores picos no início da germinação, como a glicina e a serina, provavelmente como resultado da degradação das proteínas de reserva, fato confirmado pelas análises histoquímicas. Outro aminoácido abundante no início da germinação foi o triptofano, que possui um grupo amina no seu anel aromático. A altura dos picos destes aminoácidos diminuiu ao longo do período de germinação. Os aminoácidos livres são produtos da quebra das proteínas de reserva (Tan-Wilson; Wilson, 2012) e devem ser utilizados na síntese de novas proteínas ou ser catabolizados e entrar em outras vias biossintéticas (Hildebrandt et al., 2015).

A partir de 45 dias, quando começaram a se formar as estruturas da plântula, ocorreu um aumento acentuado nos teores de asparagina, considerada como forma de transporte de nitrogênio pelas plantas. Os picos de asparagina atingiram a altura máxima aos 120 dias, alcançando 2000 vezes o valor inicial (Tabela 2). O papel da asparagina no transporte de carbono e nitrogênio para as plântulas foi confirmado em diversas espécies (Stewart; Beevers, 1967; Lea et al., 2007; Lehmann; Ratajczak, 2008).

O ácido piroglutâmico apresentou um pico nos dias 7 e 14 e outro no 45º dia; estes picos provavelmente estejam relacionados à presença da sacarose no meio de cultivo. O ácido piro-glutâmico (ou  $\Delta^1$  pirrolina-5-carboxilato) é um precursor da prolina, aminoácido conhecido como osmorregulador que se acumula nas células vegetais em resposta ao estresse salino e de seca, provavelmente protegendo as estruturas celulares (Hong et al., 2000; Hmida-Sayari et al., 2005).

Outros três aminoácidos apresentaram um comportamento flutuante ao longo do tempo, com picos em dias diferentes, formando uma curva com padrão de U: aspartato, alanina e treonina. Destes, o que apresentou diferenças significativas foi a treonina, com pico aos 21 e 30 dias e pico principal aos 90 dias. O pico aos 90 dias coincide com o início da protrusão da raiz e da expansão da parte aérea, embora nem sempre ocorra a emergência da mesma. Curva semelhante para o aspartato foi verificada durante a germinação de arroz (Shu et al., 2008).

A O-acetil-serina teve um pico considerável a partir do 7º dia, quando chegou a 34 vezes a quantidade inicial no embrião, mantendo-se elevada até o 30º dia, após esta data, houve uma queda gradual na quantidade deste aminoácido, até os 120 dias, quando atingiu 13 vezes a quantidade inicial. A O-acetil-serina é o último composto na etapa da síntese da cisteína; em plantas, a biossíntese da cisteína tem um papel central na fixação de enxofre

inorgânico, pois este aminoácido é o único metabólito doador de sulfeto para outros compostos, como metionina, glutatona, entre outros (Bonner et al., 2005).

O pico do ácido glicérico manteve-se alto no início da germinação até 21 dias, enquanto o pico dos ácidos cítrico e málico aumentaram daí em diante.

A putrescina apresentou um pico no 7º dia com acúmulo de mais de 113 vezes os valores no tempo 0. A putrescina é uma poliamina relacionada a diversos processos biológicos, cujo acúmulo foi verificado no eixo embrionário de diversas plantas no início da germinação (Federico; Angelini, 1988; Torrigiani; Scoccianti, 1995; Matilla, 1996).

**Tabela 2:** Variação no teor relativo de compostos detectados pelo perfil metabólico: aminoácidos, ácidos orgânicos e amina ao longo da germinação de embriões zigóticos e estabelecimento da plântula de babaçu; o tempo 0 (1,0) foi utilizado como referência para o cálculo de abundância relativa.

Tempo (dias)	Variação no teor relativo (n x valor de 0)							
	0	7	14	21	30	45	90	120
<b>Aminoácidos</b>								
alanina	1,00 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,29 ± 2,77 <sup>a</sup>	5,69 ± 1,46 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,06 <sup>a</sup>	14,05 ± 7,27 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,36 <sup>a</sup>
asparagina	1,00 ± 0,02 <sup>b</sup>	24,20 ± 11,99 <sup>b</sup>	116,50 ± 4,61 <sup>b</sup>	530,71 ± 172,26 <sup>b</sup>	1039,19 ± 84,51 <sup>b</sup>	519,26 ± 304,00 <sup>b</sup>	1806,37 ± 732,35 <sup>a</sup>	2450,19 ± 1259,82 <sup>a</sup>
aspartato*	1,00 ± 0,28 <sup>a</sup>	6,36 ± 0,68 <sup>a</sup>	8,24 ± 2,46 <sup>a</sup>	4,48 ± 0,92 <sup>a</sup>	6,16 ± 0,84 <sup>a</sup>	6,30 ± 1,65 <sup>a</sup>	7,83 ± 2,03 <sup>a</sup>	5,76 ± 1,12 <sup>a</sup>
glicina	1,00 ± 0,15 <sup>b</sup>	5,70 ± 0,52 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,24 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,26 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,29 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,61 ± 0,11 <sup>b</sup>
O-acetil-serina	1,00 ± 0,07 <sup>d</sup>	32,34 ± 1,44 <sup>a</sup>	31,81 ± 1,12 <sup>a</sup>	22,72 ± 2,06 <sup>b</sup>	28,73 ± 0,84 <sup>a</sup>	20,06 ± 2,02 <sup>b</sup>	18,39 ± 1,24 <sup>b</sup>	13,13 ± 0,07 <sup>c</sup>
serina	1,00 ± 0,14 <sup>a</sup>	7,72 ± 1,05 <sup>a</sup>	4,19 ± 1,29 <sup>a</sup>	4,74 ± 0,64 <sup>a</sup>	4,58 ± 0,25 <sup>a</sup>	5,17 ± 1,47 <sup>a</sup>	5,05 ± 1,59 <sup>a</sup>	4,04 ± 0,83 <sup>a</sup>
treonina	1,00 ± 0,20 <sup>b</sup>	4,91 ± 0,85 <sup>a</sup>	3,36 ± 0,49 <sup>b</sup>	5,42 ± 0,78 <sup>a</sup>	5,30 ± 0,46 <sup>a</sup>	3,27 ± 0,70 <sup>b</sup>	6,61 ± 1,14 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,55 <sup>b</sup>
triptofano	1,00 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,68 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,64 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,68 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,71 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,65 ± 0,08 <sup>c</sup>
<b>Ácidos orgânicos</b>								
ácido cítrico	1,00 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,51 ± 1,19 <sup>a</sup>	1,24 ± 1,09 <sup>a</sup>	2,45 ± 1,80 <sup>a</sup>
ácido glicérico	1,00 ± 0,15 <sup>c</sup>	8,21 ± 0,46 <sup>a</sup>	4,90 ± 1,61 <sup>b</sup>	2,83 ± 0,48 <sup>c</sup>	1,98 ± 0,76 <sup>c</sup>	3,40 ± 0,54 <sup>c</sup>	2,43 ± 0,86 <sup>c</sup>	1,55 ± 0,66 <sup>c</sup>
ácido málico	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,58 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,83 ± 1,22 <sup>a</sup>	2,61 ± 0,83 <sup>a</sup>	3,12 ± 1,91 <sup>a</sup>
ácido piroglutâmico	1,00 ± 0,09 <sup>b</sup>	10,86 ± 1,42 <sup>a</sup>	9,83 ± 2,17 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,63 ± 0,30 <sup>b</sup>	13,79 ± 9,97 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,40 <sup>b</sup>	2,30 ± 1,37 <sup>b</sup>
<b>Amina</b>								
putrescina	1,00 ± 0,11 <sup>b</sup>	113,68 ± 33,88 <sup>a</sup>	26,00 ± 4,13 <sup>b</sup>	49,25 ± 8,03 <sup>b</sup>	6,63 ± 0,95 <sup>b</sup>	18,74 ± 3,46 <sup>b</sup>	11,20 ± 3,57 <sup>b</sup>	2,98 ± 0,11 <sup>b</sup>

\* encontrado na forma de ácido aspártico.

Os valores representam a média para 3 repetições ± o erro padrão da média; médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott, a 5%.

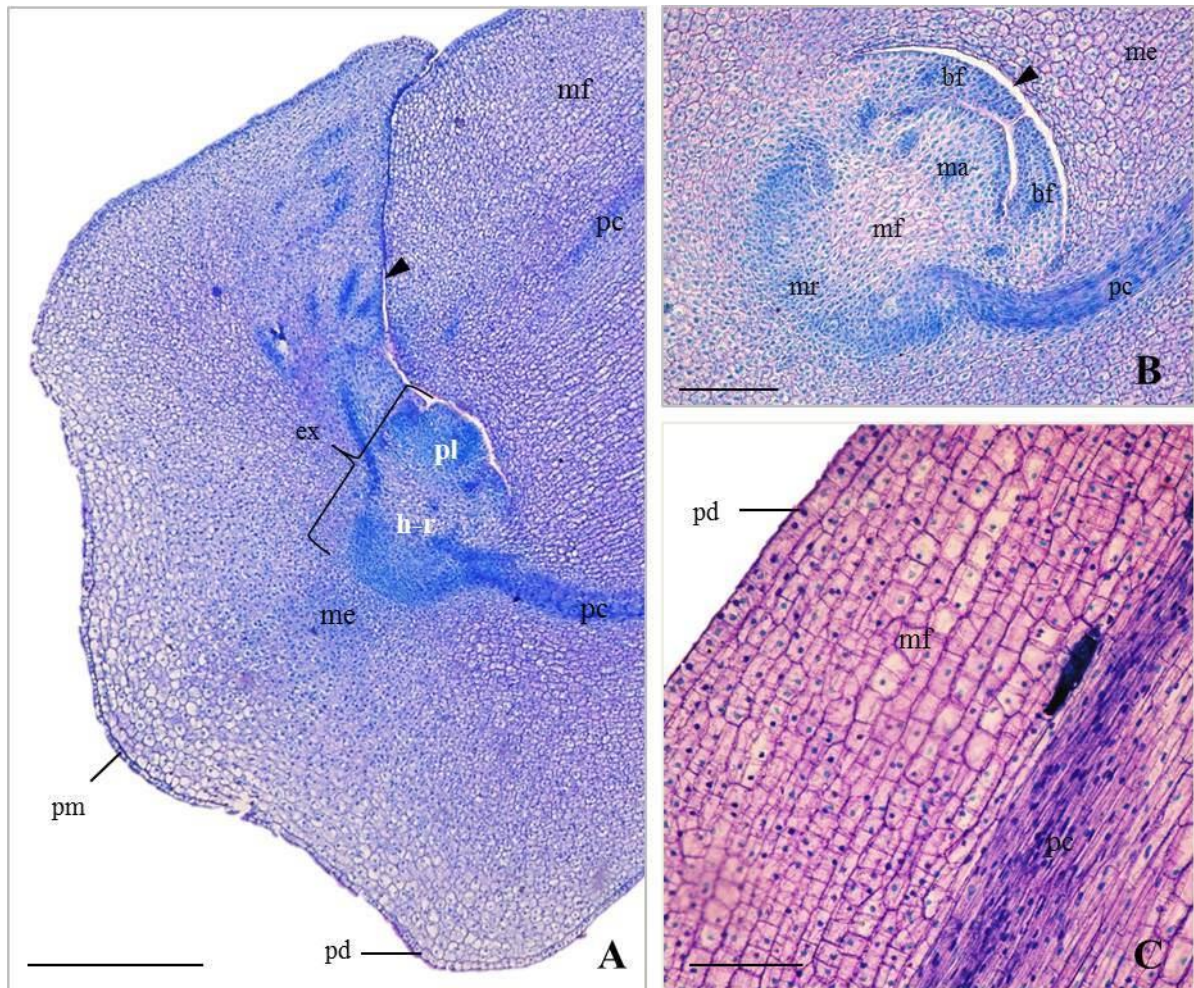
### *Anatomia e histoquímica da germinação*

O eixo embrionário localiza-se na região proximal do cotilédone (hipofilo), envolto pela bainha cotiledonar e imerso no meristema fundamental, em posição ligeiramente decumbente (cerca de 45°) em relação ao eixo do cotilédone (Figura 8 A). O eixo embrionário é composto por um curto eixo hipocótilo-radícula e a plúmula, que compreende o meristema apical e duas bainhas foliares (catafilos) (Figura 8 B). As estruturas do eixo embrionário são preenchidas por tecido meristemático caracterizado por células isodiamétricas pequenas, com pouco citoplasma, núcleo centralizado e bastante corado; a plúmula possui uma protoderme pouco desenvolvida. A radícula possui tecido meristemático pouco diferenciado, com células isodiamétricas organizadas em feixes (Figura 8 B).

A porção basal do cotilédone tem um formato acuminado no ponto de inserção próximo à micrópila ou protuberância micropilar (Figura 8 A). A protoderme é unisseriada na porção basal, com células tabulares de citoplasma pouco corado e espessamento na parede periclinal externa (Figura 8 C).

A porção mediana (hipocótilo) do embrião é formada por meristema fundamental, com células maiores, isodiamétricas, com citoplasma denso, contendo inclusões, núcleo corado e normalmente central, de paredes delgadas. Desta porção, saem os feixes de procâmbio, posicionados centralmente e que percorrem todo o embrião no sentido longitudinal e se ramificam na porção apical se aproximando da periferia à medida que se dirigem à porção distal do cotilédone (haustório) (Figura 8 C). As células do procâmbio são alongadas e com núcleos proeminentes. Os meristemas cotiledonares, chamados “zona M”, constituem as regiões responsáveis pelo crescimento do pecíolo cotiledonar durante as fases iniciais da germinação e se encontram abaixo do meristema radicular e acima da cavidade cotiledonar. Este é constituído de células globosas, ligeiramente irregulares, grandes e de citoplasma translúcido; estas células são maiores na região central e basal (Figura 8 A e B).

A porção apical do cotilédone é constituída pelo meristema fundamental, com células grandes, de formato irregular em corte transversal e de formato retangular em corte longitudinal, formando feixes, com citoplasma bastante corado. A protoderme no ápice é unisseriada, com células em paliçadas. A protoderme é em grande extensão tabular, mas engloba uma região de transição entre o formato tabular e o paliçádico, com células aparentemente isodiamétricas. O parênquima é formado por células poliédricas, geralmente maiores no eixo anticlinal, em corte longitudinal (Figura 8 C).



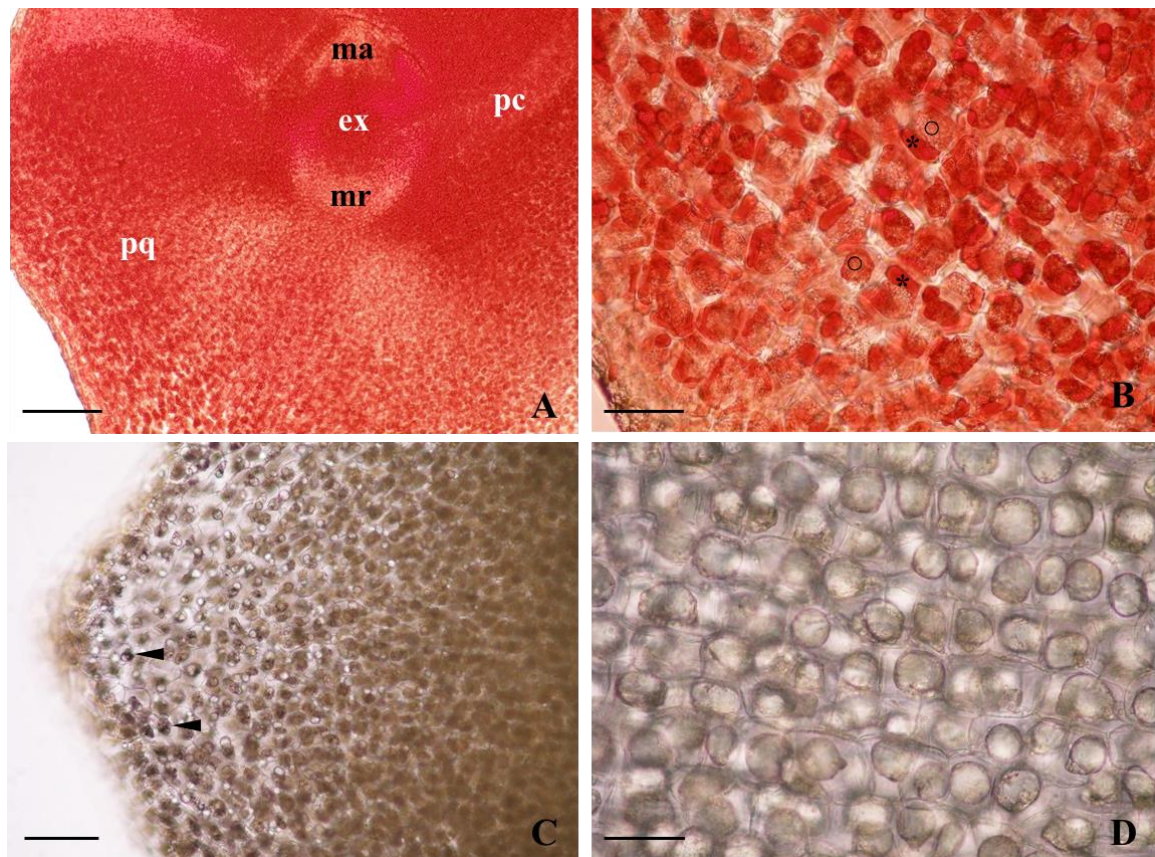
**Figura 8:** Cortes anatômicos do embrião de babaçu; cortes longitudinais. A) porção proximal do cotilédone (hipofilo) indicando o local de inserção na micrópila – protuberância micropilar (pm), o eixo embrionário (ex), com plúmula (pl) e hipocótilo-radícula (h-r), o procâmbio (pc), o meristema cotiledonar (me), que corresponde à “zona M”, o meristema fundamental (mf) na porção mediana e a fenda cotiledonar (ponta da seta); B) detalhe do eixo embrionário, indicando o meristema apical (ma) protegido pelas bainhas foliares (bf), que constituem a plúmula, delimitada pela cavidade cotiledonar (ponta de seta), o mesocótilo preenchido pelo meristema fundamental (mf), de onde saem os feixes do procâmbio (pc), o meristema radicular (mr) e o meristema cotiledonar (me). C) detalhe do cotilédone na porção mediana, indicando a protoderme (pd), o meristema fundamental (mf) e o procâmbio (pc). Escala: A: 80  $\mu\text{m}$ ; B e C: 20  $\mu\text{m}$ .

A partir das análises histoquímicas do embrião foi possível verificar que as células do parênquima de preenchimento possuem inclusões de dois tipos: corpos lipídicos e lipoproteicos (Figura 9 A e B). Os corpos lipídicos adquiriram uma coloração mais intensa, são translúcidos e se posicionam na periferia da célula, enquanto os corpos lipoproteicos ficaram menos corados, são opacos e ocupam grande parte do citoplasma da célula. Sekhar e DeMason (1988) verificaram que os corpos proteicos ocuparam mais da metade do volume das células parenquimáticas do embrião de *Phoenix dactylifera*. As células dos meristemas



apical, radicular, fundamental e cotiledonar, bem como as do procâmbio, apresentaram um contraste negativo para a coloração com o Sudam IV.

O embrião de babaçu apresentou pouco amido em suas células, concentrado principalmente nas células da região basal, próximas ao local de inserção da micrópila (Figura 9 C). As células do parênquima cotiledonar apresentaram resultado negativo para amido, mostrado no detalhe da Figura 9 D.



**Figura 9:** Fotomicrografias dos testes histoquímicos em cortes microsseriados de embrião zigóticos de babaçu (*Attalea speciosa*). Cortes longitudinais. A e B: teste de Sudam IV para lipídios; C e D: teste de Lugol para amido. A) porção basal do cotilédone, evidenciando o eixo embrionário (ex), feixes do procâmbio (pc) e o parênquima cotiledonar (pq); B) Detalhe do parênquima cotiledonar mostrando as inclusões lipídicas (\*) e lipoproteicas (o); C) porção proximal do cotilédone, onde se verificou a ocorrência de amido nas células basais (pontas de seta); D) Detalhe do parênquima cotiledonar na porção mediana, onde não foi possível detectar presença de amido. Escala: A – 40  $\mu\text{m}$ ; B e D – 10  $\mu\text{m}$ ; C – 20  $\mu\text{m}$ .

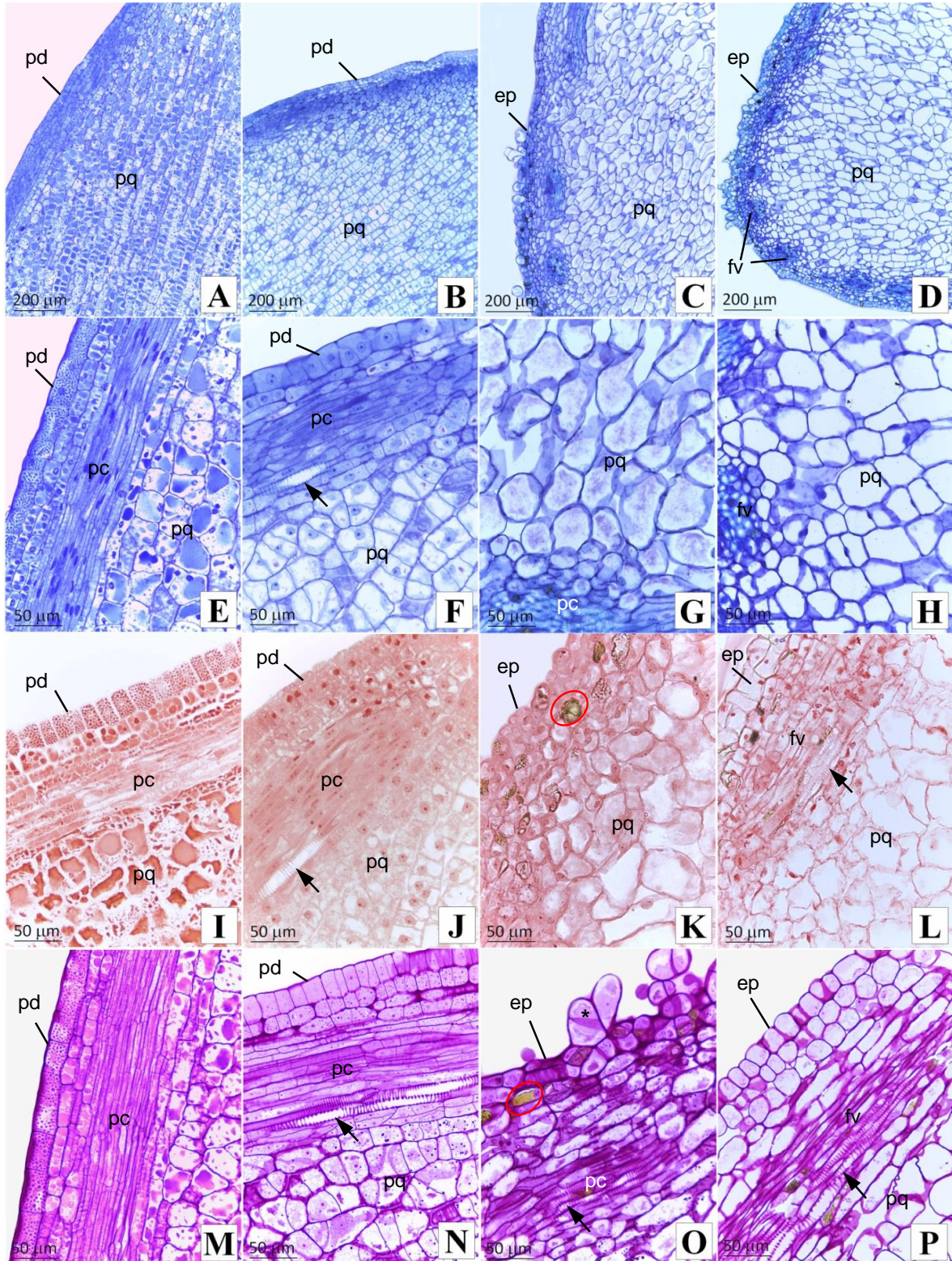
A porção apical do cotilédone, no tempo 0, apresentou um parênquima de preenchimento com células isodiamétricas e preenchidas com bastante material citoplasmático, que se coraram intensamente com Xilidine Ponceau (XP), o que confirmou

que este material é proteico (Figura 10 A, E, I). As células da protoderme possuem um núcleo central e grande quantidade de pequenos grânulos preenchendo todo o seu citoplasma. Estes grânulos se coraram com XP e com PAS, o que indica que seu conteúdo deve ser de natureza glicoproteica (Figura 10 M). As células da camada subepidérmica, localizadas entre o procambio e a protoderme, possuem grânulos bem maiores e de natureza proteica. As células do procâmbio são alongadas, com citoplasma denso, sem inclusões citoplasmáticas visíveis.

Após 7 dias do início da germinação, as células do ápice do cotilédone começaram a sofrer modificações compatíveis com a sua função de haustório. As células parenquimáticas começaram a perder conteúdo citoplasmático e o citoplasma se corou fracamente com os três corantes utilizados, restando apenas a parede celular, bastante corada com PAS, e o núcleo (Figura 10 B, F, J, N). Nas células da protoderme e da subepiderme, não foram detectados os grânulos que preenchiam o citoplasma, de natureza glicoproteica ou proteica, porém o citoplasma se corou para proteínas e carboidratos de forma difusa. As células do procambio iniciaram a diferenciação em feixes vasculares, confirmada pelo surgimento de traqueídes nos cortes histológicos.

Mesmo sem estar em contato com o endosperma da semente, o haustório passou por diversas transformações (Figura 10 C, G, K, O). Aos 14 dias a protoderme começou a se diferenciar em epiderme, com células proeminentes, adaptadas para desempenhar as funções de secreção de enzimas e absorção de nutrientes. As células do parênquima perderam o formato isodiamétrico, passando a apresentar formatos variados, sua estrutura citoplasmática se desorganizou e o núcleo ficou menos evidente. O conteúdo citoplasmático ainda se corou evidenciando a presença de proteínas. O procambio continuou a se diferenciar para formar os feixes vasculares.

Aos 21 dias, os feixes vasculares estavam totalmente diferenciados e em posição bastante periférica, logo abaixo da epiderme. Este posicionamento parece ter uma função estratégica, pois a epiderme se especializou para extrair as reservas do endosperma, com os feixes vasculares fazendo o transporte dos nutrientes do haustório para o eixo embrionário em desenvolvimento (Oliveira, 2013). As células do parênquima deram origem a um aerênquima, composto por espaços intercelulares, sem nenhum conteúdo celular (Figura 10 D, H, L, P).



**Figura 10:** Seções histológicas da porção apical do cotilédone (haustório) durante os eventos de germinação de embriões zigóticos *in vitro* de babaçu. Cortes longitudinais: A, E, I, M: tempo 0; B, F, J, N: 7 dias; C, G, K, O: 14 dias, D, H, L, P: 21 dias. A-H: coradas com Azul de Toluidina; I-L: coradas com Xilidine Ponceau; M-P: coradas com PAS. Legenda: pd: protoderme, pc: procambio, pq: parênquima, fv: feixes vasculares. As setas indicam os traqueídes, os círculos vermelhos evidenciam as células com conteúdo fenólico.

Células com conteúdo fenólico foram encontradas ao longo de todo o cotilédone, principalmente nos tecidos próximos à epiderme a partir dos 14 dias de germinação (Figura 10 K, O).

Os haustórios das palmeiras são os mais complexos e persistentes do reino vegetal, pois têm função de mobilização de reservas lipídicas do endosperma, utilizadas apenas após a utilização das reservas proteicas (DeMason, 1985). Embora crescendo sem o contato com o endosperma da semente, os haustórios de *Attalea speciosa* apresentaram um desenvolvimento semelhante ao descrito para *A. vitrivir* (Neves, 2013), como a formação de epiderme especializada, de feixes vasculares periféricos e de aerênquima.

DeMason (1985) verificou que em *Phoenix dactylifera*, após 6 dias de germinação, os corpos proteicos e lipídicos desaparecem das células da protoderme e do parênquima, sendo substituídos por uma massa citoplasmática densa e o mesmo foi verificado aos 7 dias da germinação de *A. speciosa*. As mesmas características foram descritas para *Butia capitata*, com apenas 2 dias de germinação (Oliveira, 2013).

Em *P. dactylifera*, a maturação dos feixes vasculares do haustório ocorre após a 4ª semana (DeMason, 1985), porém em babaçu, feixes vasculares maduros foram identificados no haustório após 21 dias.

As principais mudanças observadas ao longo da germinação do babaçu na porção basal (proximal) do cotilédone estão relacionadas com o desenvolvimento das estruturas do eixo embrionário.

Antes do início da germinação (tempo 0), o eixo embrionário era formado principalmente por células dos meristemas fundamental, apical caulinar e radicular. Os feixes do procambio estavam pouco diferenciados, bem como os tecidos das bainhas foliares primária e secundária, também chamados de catafilos, que têm a função de proteger a emissão do primeiro eófilo (Figura 11 A, E). Todas as células meristemáticas do procambio e da protoderme apresentaram citoplasma rico em inclusões proteicas (Figura 11 I). Os grãos de amido foram observados nas células do parênquima cotiledonar próximas à fenda cotiledonar (Figura 11 M).

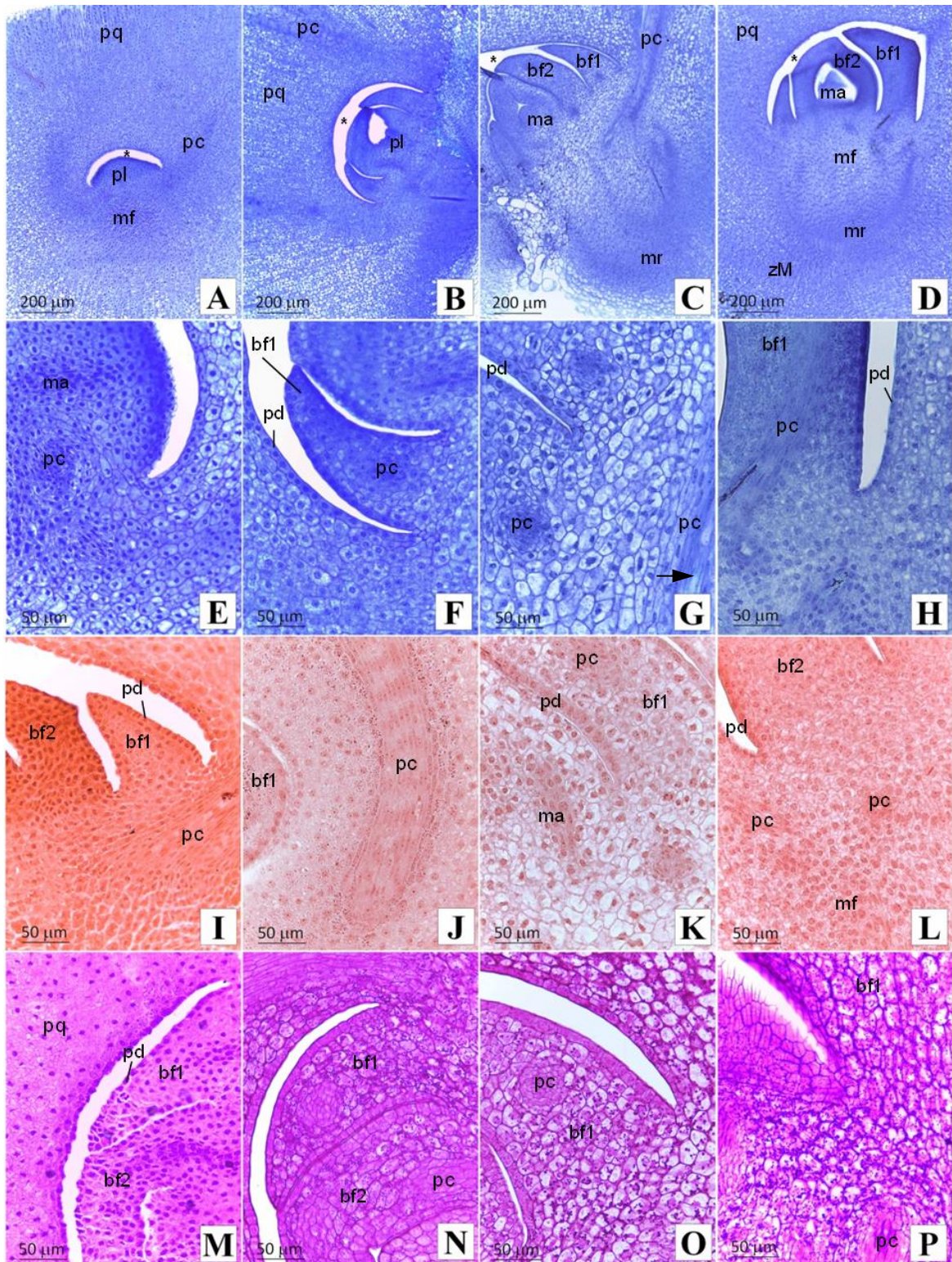
Após 7 dias de germinação, o conteúdo proteico visualizado anteriormente no parênquima se concentrou em células que circundam o procambio, cujas células se alongaram, e nas estruturas da plúmula (Figura 11 B, F, J). Nesta fase, teve início o acúmulo de amido nos tecidos parenquimáticos do eixo embrionário, porém este composto não foi encontrado nas células da protoderme ou do procambio (Figura 11 N).

Aos 14 dias, no eixo embrionário pôde-se constatar o início do crescimento da plúmula e o início do desenvolvimento radicular (Figura 11 C). Nos feixes do procambio pôde-se constatar o aparecimento de traqueídes (Figura 11 G), ocorrendo uma redução do conteúdo citoplasmático das células do parênquima e um aumento no número de grânulos de amido neste tecido (Figura 11 K, O).

Aos 21 dias, constataram-se poucas mudanças no eixo embrionário com relação ao período anterior (Figura 11 D, H, L). A principal mudança verificada foi um aumento da quantidade de grânulos de amido nas células do parênquima (Figura 11 P).

A presença de amido no embrião de palmeiras não é comum, tendo sido anteriormente relatada para *Euterpe edulis* e *Butia capitata* (Oliveira, 2013).

A mobilização de proteínas de reserva ocorreu de forma precoce e este fato foi descrito anteriormente para outras espécies (DeMason, 1985, 1988; Oliveira, 2013). As proteínas de reserva encontradas nas sementes não são apenas importantes como fonte de aminoácidos durante o início da germinação, mas são também importantes para a produção de energia, como os aminoácidos aspartato e glutamato, bastante abundantes na fase de embebição e que são mobilizados para a cadeia respiratória (Weitbrecht, 2011).



**Figura 11:** Seções histológicas da porção basal do cotilédone durante os eventos de germinação de embriões zigóticos *in vitro* de babaçu. Cortes longitudinais: A, E, I, M: tempo 0; B, F, J, N: 7 dias; C, G, K, O: 14 dias; D, H, L, P: 21 dias. A-H: coradas com Azul de Toluidina; I-L: coradas com Xilidine Ponceau; M-P: coradas com PAS. Legenda: pd: protoderme, pc: procâmbio, pq: parênquima, fv: feixes vasculares, bf1: primeira bainha foliar, bf2: segunda bainha foliar, pl: plúmula, mf: meristema fundamental, ma: meristema apical, mr: meristema radicular, zM: zona meristemática M do cotilédone. O asterisco (\*) indica a fenda cotiledonar e a seta indica o traqueíde.

## Conclusão

A germinação de embriões de *A. speciosa* é lenta quando comparada com outras espécies de palmeiras e se caracteriza pelo crescimento do hiperfilo, que compreende o pecíolo cotiledonar e o haustório, o que caracteriza a germinação do tipo remota tubular.

O desenvolvimento da plântula ocorre somente depois que o crescimento e o desenvolvimento do cotilédone está completo, com a total expansão do haustório, formação dos feixes vasculares e de uma epiderme especializada, eventos estes que ocorreram apenas após 21 dias do início da germinação e estão relacionados à função de mobilização de reserva desta estrutura. Somente após o desenvolvimento completo do haustório e do pecíolo tem início o desenvolvimento do eixo embrionário. Após 45 dias do início da germinação, tem início o surgimento dos catafilos, seguido do crescimento da raiz primária.

As principais reservas do embrião zigótico do babaçu são constituídas por proteínas e lípidios, os quais são degradados logo no início da germinação. Os aminoácidos liberados com a quebra das proteínas são principalmente neutros, como glicina, serina e triptofano. Outros aminoácidos apresentam pico ao final da germinação, como asparagina, fundamental para o transporte de carbono e nitrogênio para a plântula em crescimento. A O-acetil-serina, tem um pico no sétimo dia e se mantém alta até o final, este aminoácido é essencial para a síntese de cisteína, e fornecimento de enxofre para plântula em crescimento. A quebra dos triacilgliceróis libera ácidos graxos, fontes de carbono e energia essenciais para os diversos processos metabólicos que possibilitam o crescimento do cotilédone e da plântula.

A germinação *in vitro* de embriões zigóticos permite o desenvolvimento da plântula de *Attalea speciosa*, que apresenta características morfológicas e anatômicas semelhantes às descritas por outros autores para plântulas germinadas em casa de vegetação. Os resultados obtidos neste trabalho são os primeiros que descrevem eventos bioquímicos e histoquímicos durante a germinação de *Attalea speciosa*. Estes conhecimentos podem embasar futuros estudos para o esclarecimento de aspectos fisiológicos e metabólicos da germinação das palmeiras.

## Referências Bibliográficas

- AMARAL, L. I. V.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea** 34: 425-431, 2007.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. What kind of seed dormancy might palms have? **Seed Science Research**, 24(1): 17-22, 2014.
- BONNER, E. R.; CAHOON, R. E.; KNAPKE, S. M.; JEZ, J. M. Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants structural and functional analysis of O-acetylserine sulfhydrylase from *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, 280(46): 38803-38813, 2005.
- DRANSFIELD, J.; UHL, N. W.; ASMUSSEN, C. B.; BAKER, W. J.; HARLEY, M. M.; LEWIS, C. E. **Genera Palmarum: the evolution and classification of palms**. Richmond: Kew Publishing, 2008.
- DEMASON, D.A. Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera* L.). **Protoplasma** 126: 168–177, 1985.
- DEMASON, D.A. Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. **American Journal of Botany** 75: 330–337, 1988.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K ; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28: 350-356, 1956.
- DYER, J. M.; STYMNE, S.; GREEN, A. G.; CARLSSON, A. S. High-value oils from plants. **The Plant Journal** 54, 640–655, 2008.
- EISERHARDT, W. L., SVENNING, J. C., KISSLING, W. D.; BALSLEV, H. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scales. **Annals of Botany** 108: 1391–1416, 2011.
- FEDERICO, R.; ANGELINI, R. Distribution of polyamines and their related catabolic enzyme in etiolated and light-grown leguminosae seedlings. **Planta**, 173(3): 317-321, 1988.
- FERRARI, R. A.; SOLER, M. P. Obtention and characterization of coconut babassu derivatives. **Scientia Agricola**, 72(4): 291-296, 2015.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), 35: 1039-1042, 2011.
- FIGHN, O.; KOPKA, J.; DÖRMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotech** 18: 1157 – 1161 doi:10.1038/81137, 2000.
- GERLACH, D. 1984 In: KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.



GONÇALVES, J. F. D. C.; FERNANDES, A. V.; OLIVEIRA, A. F. M.; RODRIGUES, L. F.; MARENCO, R. A. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 14(2): 139-142, 2002.

GREEN, M.; LIMA, W. A. A.; FIGUEIREDO, A. F. D.; ATROCH, A. L.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V. D.; TEIXEIRA, P. C. Heat-treatment and germination of oil palm seeds (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Seed Science**, 35(3): 296-301, 2013.

HENDERSON, F. M. Morphology and Anatomy of Palm Seedlings. The New York Botanical Garden (Pbs.) **The Botanical Review**, 72(4):273-329. 2006.

HILDEBRANDT, T. M.; NUNES-NESE, A.; ARAÚJO, W. L.; BRAUN, H. P. Amino acid catabolism in plants. **Molecular Plant**, 8: 1563-1579, 2015.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDANI, A.; JAOUA, L.; SAVOURÉ, A.; JAOUA, S. Overexpression of  $\Delta$  1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, 169(4), 746-752, 2005.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, 122(4): 1129-1136, 2000.

IOSSI, E.; MORO, F. V.; SADER, R. Seed anatomy and germination of *Phoenix roebelenii* O'Brien (Arecaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, 28(3): 121-128, 2006.

JENSEN, W. A. 1962 In: KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137-138, 1965.

KOFFI, Y.; N'NAN-ALLA, O.; KONAN, J. L. K.; MALAURIE, B.; ENGELMANN, F. Morphological and agronomical characteristics of coconut (*Cocos nucifera* L.) palms produced from in vitro cultured zygotic embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 49(5): 599-604, 2013.

LAURENS, L. M.; QUINN, M.; VAN WYCHEN, S.; TEMPLETON, D. W.; WOLFRUM, E. J. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by *in situ* transesterification. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 403(1):167-178, 2012.

LEA, P. J.; SODEK, L.; PARRY, M. A.; SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, 150(1): 1-26, 2007.

LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42(2): 147-154, 2007.

- LEHMANN, T.; RATAJCZAK, L. The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating seeds of yellow lupine. **Journal of plant physiology**, 165(2): 149-158, 2008.
- LEITE, M. S.; SILVA, F. G.; PEREIRA, F. D.; ALBERTO, P. S.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. DE A. In vitro germination of babassu: influence of growth regulators in zygotic embryos **Acta Scientiarum Agronomy** Maringá, 36(4): 449-456, 2014.
- LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature protocols**, 1(1): 387-396, 2006.
- LOMMEN, A. MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. **Analytical Chemistry**, 15: 3079-3086, 2009.
- LORENZI, H. KAHN, F.; NOBLICK, L. R.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira: Arecaceae**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010.
- LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 22(3): 209-215, 2010.
- MACIEL, S. A.; FERMINO JR., P. C. P.; SILVA, R. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, 32(2): 263-267, 2010.
- MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA, D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees** 27: 273-283, 2013.
- MARTINS-CORDER, M. P.; SALDANHA, C. W. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de diferentes progênies de *Euterpe edulis* Mart. **Revista Árvore**, 30(5): 693-699, 2006.
- MATILLA, A. J. Polyamines and seed germination. **Seed Science Research**, 6(3): 81-93, 1996.
- MEEROW, A. W.; KRUEGER, R. R.; SINGH, R.; LOW, E-T. L.; ITHNIN, M.; OOIIN, L.C-L. Coconut, Date, and Oil Palm Genomics In: SCHNELL, R.J.; P.M. PRIYADARSHAN (eds.), **Genomics of Tree Crops**, Springer Science+Business Media, 2012, p. 299-351.
- MELO, Z. L. DE O; GONÇALVES, J.F. DE C., MAZZAFERA, P.; DOS SANTOS, D.Y.A.C. Mobilization of seed reserves during germination of four tropical species of the Amazon Rainforest **Seed Science & Technology**, 37: 597-607, 2009.
- MENDONÇA-QUEIROZ, M. S.; BIANCO, R. Morfologia e desenvolvimento germinativo de *Oenocarpus bacaba* MART. (Arecaceae) da Amazônia Ocidental. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, 33(6): 1037-1042, 2009.

- MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Frutos de Palmeiras da Amazônia**. Manaus: MCT/INPA, 2001. 120p.
- MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, 67(4): 399-407, 2010
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473– 497, 1962.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehinger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002, 975 p.
- NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; CUNHA, I. R. G.; PIMENTA, M. A. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N. Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*). **Flora** 208: 68-78, 2013.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59, 368–373, 1964.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013, 40 p., 1981.
- OLIVEIRA, A. B. de; MENDONÇA, M. S. de; ARAÚJO, M. G. P. de. Aspectos anatômicos do embrião e desenvolvimento inicial de *Oenocarpus minor* Mart: uma palmeira da Amazônia. **Acta Botânica Brasilica**, 24(1): 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062010000100003>
- OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F. O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, 27(6): 1633-1645, 2013.
- OROZCO-SEGOVIA, A.; BATIS, A.I.; ROJAS-ARÉCHIGA, M., MENDOZA, A. Seed biology of palms: a review. **Palms** 47: 79–94, 2003.
- PÁDUA, M. S., PAIVA, L. V., PIRES, M. F., DA SILVA, L. G. T., DE CASTRO, E. M., & STEIN, V. C. Influence of culture medium and age of zygotic embryos on in vitro germination of *Elaeis guineensis* Jacq. **African Journal of Biotechnology**, 13(14): 1515, 2014.
- PECH Y AKÉ, A.; MAUST, B.; OROZCO-SEGOVIA, A.; OROPEZA, C. The effect of gibberellic acid on the in vitro germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 43(3): 247-253, 2007.
- PINHEIRO, C.U.B. Germination strategies of palms: the case of *Schippia concolor* Burret in Belize. **Brittonia** 53: 519–527, 2002.
- QUETTIER, A-L.; EASTMOND, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry** 47: 485–490, 2009.

- RIBEIRO, L. M., NEVES, S. D. C., SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, 58: 133-139, 2011.
- RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. DE S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination **Trees** 26: 851–863, 2012.
- ROBERTO, G. G.; COAN, A. I.; HABERMANN, G. Water content and GA3 induced embryonic cell expansion explain *Euterpe edulis* seed germination, rather than seed reserve mobilization. **Seed Science and Technology** 39: 559–571, 2011.
- ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHERWEY, R.N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. **Plant Journal**, 23: 131–142, 2000.
- SALM, R. Tree species diversity in a seasonally-dry forest: the case of the Pinkaití site, in the Kayapó Indigenous Area, southeastern limits of the Amazon. **Acta Amazonica**, 34(3): 435 – 443, 2004.
- SANTELLI, P.; CALBO, M. E. R.; CALBO, A. G. Fisiologia pós-colheita de frutos da palmeira *Mauritia vinifera* Mart. (Arecaceae) **Acta botanica brasílica** 23(3): 697-702. 2009.
- SEKHAR, K. N. C.; DEMASON, D. A. Quantitative Ultrastructure and Protein Composition of Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Seeds: A Comparative Study of Endosperm vs. Embryo. **American Journal of Botany**, 75(3): 323-329, 1988.
- SGHAIER-HAMMAMI, B.; VALLEDOR, L.; DRIRA, N.; JORRIN-NOVO, J. V. Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. **Proteomics**, 9(9): 2543-2554, 2009.
- SHU, X.-L.; FRANK, T.; SHU, Q.-Y.; ENGEL, K.-H. Metabolite Profiling of Germinating Rice Seeds **J. Agric. Food Chem.**, 56, 11612–11620, 2008.
- SILVA, M. V. V. DA; SALES, J. DE F.; SILVA, F. G.; RUBIO NETO, A.; ALBERTO, P. S.; PEREIRA, F. D. The influence of moisture on the *in vitro* embryo germination and morphogenesis of babassu (*Orbignya phalerata* Mart.) **Acta Scientiarum Agronomy Maringá**, 34(4): 453-458, 2012.
- SOUZA, M. H.; MONTEIRO, C. A.; FIGUEREDO, P. M.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 133: 1-5, 2011.
- STEWART, C. R.; BEEVERS, H. Gluconeogenesis from amino acids in germinating castor bean endosperm and its role in transport to the embryo. **Plant physiology**, 42(11): 1587-1595, 1967.
- TAN-WILSON, A.L.; WILSON, K.A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, 145(1), 140-153, 2012.

THAWARO S.; TE-CHATO, S. Effect of culture medium and genotype on germination of hybrid oil palm zygotic embryos **Science Asia**, 36: 26–32, 2010.

TILLICH, H. J. Seedling diversity and the homologies of seedling organs in the order Poales (Monocotyledons). **Annals of Botany**, 100(7): 1413-1429, 2007.

TORRIGIANI, P.; SCOCCIANI, V. Regulation of cadaverine and putrescine levels in different organs of chick-pea seed and seedlings during germination. **Physiologia Plantarum**, 93(3): 512-518, 1995.

UHL, N. W.; DRANSFIELD, J. **Genera Palmarum: A Classification of Palms Based on the Work of Harold E. Moore Jr.** Lawrence, Kansas: L. H. Bailey Hortorium and International Palm Society, 1987.

VIDAL, 1970 In: VENTRELLA, M. C; ALMEIDA, A. L.; NERY, L. A.; COELHO, V. P. M. **Métodos histoquímicos aplicados às sementes.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013, 40 p.

WALDOW, D.; GAKLIK, A.; REINIGER, L. R. S.; GOLLE, D. P.; CURTI, A. R. In vitro culture of zygotic embryos of *Butia eriospatha* **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, 34(5): 2179-2188, 2013.

WEITBRECHT, K.; MÜLLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. **Journal of experimental botany**, 62(10): 3289-3309, 2011.

## Capítulo II

### Embriogênese somática e regeneração de plantas de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) a partir de embriões zigóticos

#### Resumo

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) é uma palmeira oleaginosa nativa do Brasil e de importância socioeconômica para as regiões Norte e Nordeste, onde é fonte de renda para comunidades extrativistas. Como outras palmeiras, o babaçu possui um único ápice crescente e não forma perfilhos, impedindo que a propagação vegetativa seja feita por métodos convencionais, o que torna a micropropagação, em especial, a embriogênese somática, a única alternativa para a propagação vegetativa da espécie. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de embriogênese somática e regenerar plantas de babaçu utilizando embriões zigóticos maduros. No trabalho foram testadas duas auxinas para indução: 2,4-D e Picloram. O meio de MS com sais e vitaminas foi utilizado como meio básico, acrescido de L-glutamina (0,5 g.L<sup>-1</sup>), L-cisteína (0,1 g.L<sup>-1</sup>) e sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>). Para indução de calos primários e embriogênicos, as auxinas foram testadas em altas (0, 225, 450 e 675 µM) e baixas (0, 13,4 e 26,8 µM) concentrações, sem uso de carvão ativado, sendo os embriões zigóticos testados inteiros ou seccionados. O tempo de indução foi de 6 meses e, após este período, os calos embriogênicos foram transferidos para o meio básico acrescido de ácido pantotênico (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) e biotina (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) para diferenciação dos embriões somáticos. Embriões somáticos diferenciados foram mantidos nesse meio durante as etapas de maturação e conversão. Os calos primários e embriogênicos e as estruturas embriogênicas foram contabilizados e caracterizados anatomicamente e morfológicamente. A concentração de 13,4 µM de 2,4-D, em meio básico, permitiu a formação de embriões somáticos em 80% dos calos embriogênicos e levou à obtenção do maior número de embriões formados por calo. Os embriões somáticos formados foram similares morfo-anatomicamente aos embriões zigóticos. Verificou-se que a resposta da ES em babaçu é lenta, com tempo de indução de calos embriogênicos de 6 meses, diferenciação e maturação de embriões somáticos de 6 a 8 meses e a conversão à plântula em cerca de 6 meses. Este é o primeiro relato de embriogênese somática para o gênero *Attalea*.

**Palavras-chave:** Arecaceae, morfogênese, auxina, calo, Picloram, 2,4-D, embriões somáticos

## Introdução

O babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) é uma palmeira perene oleaginosa nativa (Miranda et al., 2001), encontrada nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do Brasil (Lorenzi et al., 2010). Essa palmeira é utilizada como fonte de alimentos e matéria-prima para inúmeras finalidades, incluindo a construção de barcos, pontes e casas, além da ornamentação de jardins e praças (Santelli et al., 2009). O aproveitamento do babaçu, além da folha e do caule, inclui principalmente a coleta e beneficiamento dos frutos e é uma atividade extrativista tradicional, realizada normalmente por mulheres, conhecidas como quebradeiras de coco, juntamente com seus núcleos familiares (Souza et al., 2011).

Especialmente no Maranhão, a exploração do babaçu se caracteriza como uma atividade complementar e alternativa à agricultura de subsistência para mais de 300.000 pessoas (Souza et al., 2011). Além disso, estudos preliminares comprovam a qualidade do óleo extraído do babaçu para fins industriais, tanto na produção de biodiesel quanto para produção de produtos de higiene pessoal (Lima et al., 2007). A produção de amêndoas de babaçu no Brasil atingiu aproximadamente 89.000 toneladas no ano de 2013, colhidas principalmente nos Estados do Piauí e Maranhão, com valor de comercialização estimado em R\$ 121 milhões (IBGE, 2013).

Em função da elevada importância socioeconômica do babaçu, inúmeras publicações ressaltam que é necessária a realização de um programa emergencial para aprofundar conhecimentos sobre essa espécie visando o melhor aproveitamento em toda a cadeia produtiva e seleção de variedades para a produção de biodiesel (Costa; Marchi, 2008).

Assim como diversas outras palmeiras, o babaçu possui características que dificultam a sua propagação vegetativa, como a presença de um único meristema por caule e a ausência de crescimento secundário. Adicionalmente, a propagação vegetativa de babaçu é dificultada porque esta espécie não produz perfilhos naturalmente (Tomlinson, 2006; Broschat et al., 2014) e, por ser alógama, apresenta grande heterogeneidade se plantada por via seminal (Rajanaidu; Ainul, 2013). Estas características, aliadas à sua perenidade, à dormência de sementes e à necessidade de um longo período para que se possa conhecer o valor de uma progênie, tornam o melhoramento genético do babaçu limitado, se realizado por métodos convencionais (Pérez-Núñez et al., 2006). Portanto, metodologias que resultem em economia de tempo e avanço de etapas e conhecimentos mais aprofundados da biologia da espécie podem trazer benefícios para programas de melhoramento genético, como a partir da seleção

e propagação de indivíduos provenientes de populações naturais (Scherwinski-Pereira et al., 2012).

A propagação *in vitro* é uma ferramenta importante para obtenção de clones e que pode ser particularmente importante quando utilizada para a clonagem de plantas que não apresentam formas alternativas de reprodução vegetativa, como no caso do babaçu (Costa; Aloufa, 2007; Rajanaidu; Ainul, 2013). Sistemas *in vitro* têm permitido a regeneração de mais de 1000 espécies diferentes de plantas, a partir de duas vias morfogênicas distintas: organogênese - diferenciação direta em novos tecidos - ou embriogênese somática (ES) - pela formação de embriões somáticos (Gaj, 2004).

No caso das Palmeiras, a técnica mais promissora e eficiente para fins de micropropagação é a embriogênese somática, já aplicada com sucesso em pelo menos 18 espécies de palmeiras (Low et al., 2008; Konan et al., 2010; Luis et al., 2010; Beulé et al., 2011; Ree; Guerra, 2015; Saleh; Scherwinski-Pereira, 2016). A Embriogênese somática (ES) é um processo indutivo no qual uma célula, ou um grupo de células competentes, sofre uma série de mudanças bioquímicas e moleculares que resultam, em último caso, na formação de um embrião somático (Rai et al., 2011) sem que tenha ocorrido a fusão de gametas (Jiménez, 2005). De fato, os embriões somáticos mostram muitas características e similaridades com estádios de desenvolvimento do embrião zigótico: apresentam estrutura bipolar, além de serem formados por um sistema traqueal fechado que permite que essas estruturas sejam isoladas e independentes do tecido materno (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014).

Normalmente, faz-se a distinção entre a ES direta e a indireta. No primeiro caso, o embrião somático é induzido diretamente a partir das células do explante original (sem uma etapa de desdiferenciação), enquanto no segundo caso o embrião somático é induzido indiretamente (passando por desdiferenciação), a partir de uma etapa intermediária de formação de calo. Este último caso é a forma mais frequente de embriogênese em plantas (Gaj, 2004; Fehér, 2008; Zavattieri et al., 2010). Assim, em espécies de palmeiras, acredita-se que a calogênese seja um pré-requisito para a formação de embriões somáticos (Sané et al., 2006).

Quanto aos propágulos utilizados para a indução, tecidos de origem embrionária foram testados para obter embriões somáticos com sucesso para diversas espécies. Embriões somáticos foram obtidos a partir do embrião zigótico (EZ) maduro de *Bactris gasipaes*, *Acrocomia aculeata* e *Elaeis guineensis* (Steinmacher et al., 2007; Moura et al., 2009; Thawaro; Te-Chato, 2009; Balzon et al., 2013; Luis; Scherwinski, 2014), do EZ imaturo de *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis* e *Euterpe edulis* (Karunaratne; Periyapperuma, 1989;



Teixeira et al., 1993; Fernando; Gamage, 2000; Saldanha; Martins-Coder, 2012; Scherwinski-Pereira et al., 2012) e da plúmula isolada de *Cocos nucifera* (Fernando et al., 2003; Pérez-Núñez et al., 2006; Sáenz et al., 2006).

Na ES, as auxinas influenciam fortemente a atividade das células interagindo com hormônios endógenos e modificando a expressão dos genes, fato que promove a desdiferenciação de células e rediferenciação para um estado embriogênico característico (Jiménez, 2005). Auxinas foram utilizadas para a indução de embriões somáticos em mais de 80% dos protocolos analisados por Gaj (2004), sendo que o Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi a auxina utilizada em pelo menos 65% dos protocolos. Considerando-se protocolos de ES verificou-se que, de 20 protocolos publicados após o ano 2000, 70% deles utilizaram o 2,4-D na formação de calos e/ou na indução da embriogênese e os demais utilizaram o Picloram (4 amino-3,4,6-ácido tricloro picolínico) (Saleh; Scherwinski-Pereira, 2016).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de embriogênese somática e regenerar plantas de babaçu (*Attalea speciosa*), a partir de embriões zigóticos. De acordo com o que sabemos, este é o primeiro relato de embriogênese somática e obtenção de plantas de babaçu por embriogênese somática.

## **1. Material e métodos**

### **2.1 Material vegetal**

Para o estudo, sementes de frutos maduros, coletados a partir de três matrizes adultas de babaçu foram extraídas 24 h depois da coleta dos frutos, ocorrido em 22 de Agosto de 2013. As matrizes fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Babaçu mantido pela Embrapa Meio-Norte, Teresina - PI. As sementes foram armazenadas em caixas de papelão, ao abrigo da luz, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, por um mês.

### **2.2 Meio de cultura básico**

Em todas as etapas e experimentos realizados, o meio de cultura básico utilizado foi o de MS (Murashige e Skoog, 1962) com 100% dos sais e vitaminas, acrescido de L-glutamina ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), L-cisteína ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e sacarose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ). O pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes de se adicionar *Phytigel*<sup>TM</sup> (Sigma) a  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ . O meio preparado foi esterilizado por autoclavagem a 121° C e pressão de 1.3 atm por 20 min.

### 2.3 Indução da embriogênese somática a partir de embriões zigóticos

Antes da retirada dos embriões zigóticos foi realizada a desinfestação das sementes em câmara de fluxo laminar. Para tanto, as sementes foram inicialmente imersas em álcool 70% por 3 min e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 30 min. Ao final, as sementes foram enxaguadas por três vezes com água destilada e esterilizada. Ainda em condições assépticas, as sementes foram colocadas sobre placas de Petri (15 x 90 mm), e os embriões zigóticos removidos com o auxílio de pinças e bisturis, antes de serem inoculados em meio de cultura para indução da embriogênese.

#### 2.3.1 Auxinas em altas concentrações

Neste experimento, foi testado o efeito de duas auxinas na calogênese e na embriogênese somática de babaçu. As auxinas testadas foram: Picloram (4 amino-3,4,6-ácido triclora picolínico) e 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético), acrescentadas ao meio básico em quatro concentrações: 0, 225, 450 e 675  $\mu\text{M}$ . Cada tratamento foi composto por quatro repetições, sendo cada repetição composta por pelo menos três embriões zigóticos.

Durante o experimento, o material foi subcultivado para o mesmo meio a cada 2 meses. Para indução da calogênese e indução da diferenciação, os explantes foram mantidos no escuro, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Após 6 meses de cultivo, duas repetições de cada tratamento foram transferidas para o meio de diferenciação, que consistia no meio básico acrescido do mesmo fitorregulador utilizado na indução à concentração de  $0,41 \mu\text{M}$  e de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado, e permaneceram neste meio por três meses. Outras duas repetições de cada tratamento foram mantidas em meio de indução por mais 3 meses. Nesta etapa, o cultivo ocorreu em condições de luz, sob irradiância de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  com fotoperíodo de 16h de luz e à temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Ao final de três meses, os explantes foram transferidos para o meio de maturação (descrito no item 2.4). A resposta dos explantes foi avaliada a cada 2 meses, considerando a sua viabilidade e formação de calos ou embriões somáticos. Os calos formados foram avaliados quanto à sua morfologia e à região de ocorrência no explante e foram quantificados em relação ao controle.

#### 2.3.2 Auxinas em baixas concentrações

Explantes inteiros ou seccionados

Como a resposta de formação de calos e embriões somáticos do experimento anterior indicava que poderia haver uma relação com a região do explante, no segundo experimento, os explantes foram seccionados de forma a separar a porção cotiledonar (distal) da porção basal (proximal), onde se encontram os tecidos meristemáticos do eixo embrionário.

Neste experimento, foram testadas duas auxinas em concentrações mais baixas, e o tipo de explante: inteiro e seccionado nas porções cotiledonar e basal. Para a obtenção dos explantes, o embrião zigótico foi seccionado em duas porções distintas, separando a parte apical (cotiledonar) da parte basal (contendo o eixo embrionário) com auxílio de bisturi e pinça. O Picloram e o 2,4-D foram testados em três concentrações (0,0; 2,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup>, equivalentes a 0,0; 10,35 e 20,70 µM para o Picloram e 0,0; 13,43 e 26,85 µM para o 2,4-D) para a formação de calos primários e embriogênicos. Esse estudo foi formado por 7 repetições, sendo cada uma constituída por pelo menos 3 explantes cada.

O material foi mantido no escuro à temperatura de  $25 \pm 2$  °C e subcultivado a cada 2 meses para o mesmo meio. Após 5 meses de cultivo, os calos foram transferidos para o meio de diferenciação e maturação (item 2.4), desprovido de reguladores de crescimento, mas mantidos na luz, em câmara de germinação (B.O.D.), sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

### 2.3.3 Avaliação final de protocolo

Em razão dos resultados apresentados no experimento anterior, nos quais a concentração de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D se mostrou eficiente na calogênese e embriogênese, optou-se por testar Picloram e 2,4-D na concentração de 13,4 µM, ajustando-se a concentração de Picloram para equivaler, em valores molares, à concentração do 2,4-D. No experimento anterior, não houve diferença nos resultados entre explantes inteiros ou seccionados, por isso definiu-se o protocolo com o uso de embriões inteiros. Neste experimento foi avaliado o protocolo final e obtido material para análises morfológicas e anatômicas. Os embriões zigóticos inteiros foram induzidos por 6 meses para a formação de calos primários e embriogênicos. Esse estudo foi formado por 5 repetições, cada uma delas constituída por 4 explantes.

O material foi mantido no escuro à temperatura de  $25 \pm 2$  °C e subcultivado a cada 2 meses para o mesmo meio. Após o tempo 6 meses de indução, os calos foram transferidos para o meio de diferenciação e maturação (item 2.4), sem reguladores de crescimento, e

mantidos na luz, em câmara de germinação (B.O.D.), sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de  $25\pm 2$  °C.

A resposta dos explantes foi avaliada a cada 2 meses, considerando a sua sobrevivência e formação de calos ou embriões somáticos. Os calos, estruturas embriogênicas e raízes formadas foram quantificados em relação ao tratamento controle.

#### 2.4 Diferenciação, maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas

Após o período de indução, os calos formados em todos os experimentos foram transferidos para meio básico sem adição de fitorreguladores e acrescido de carvão ativado ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) para diferenciação e maturação. Após a transferência, foram mantidos em condições de luz sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de  $25\pm 2$  °C, em câmara de germinação (B.O.D.). Nestas condições, os calos e estruturas embriogênicas foram subcultivados a cada 2 meses por até 20 meses.

Os embriões somáticos nos estádios inicial, intermediário e final (torpedo) de diferenciação foram gradualmente isolados de acordo com a sua diferenciação e transferidos individualmente para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de regeneração para a conversão a plântulas. Este consistiu em meio de MS com 50% da concentração de sais, 100% das vitaminas, com acréscimo de ácido pantotênico ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e biotina ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Luis et al., 2010), além de L-glutamina ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e L-cisteína ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e carvão ativado ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Os tubos de ensaio (25 x 150 mm), vedados com filme plástico de PVC, foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $25\pm 2$  °C e fotoperíodo de 16h. O material vegetal foi subcultivado para o mesmo meio a cada 2 meses.

O desenvolvimento normal dos embriões somáticos formados foi avaliado.

#### 2.5 Análises histológicas

Amostras dos tipos de calos de estruturas embriogênicas, em diferentes estádios de desenvolvimento, formados nos experimentos com auxinas em altas (item 2.3.1) e baixas (item 2.3.2) concentrações foram fixadas em fixador (Karnovsky, 1965) modificado com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4%, por 24 h sob vácuo. Posteriormente, as amostras fixadas foram lavadas por três vezes com tampão cacodilato a 0,05M e armazenadas no mesmo tampão sob refrigeração. Após uma série de desidratação alcoólica, as amostras foram emblocadas em historresina Leica (Heidelberg, Alemanha), de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram cortadas em micrótomo rotativo manual

(Leica RM2125RT) e coradas com azul de toluidina a 5%. Após a coloração, as lâminas foram preservadas com Entellan (Merck) e fotografadas com microscópio Leica (DM750) com sistema de captura de imagem, utilizando-se o software Leica Application Suite (LAS EZ).

## 2.6 Análises estatísticas

Em todas as etapas, o desenho experimental foi inteiramente casualizado. Para se determinar as percentagens das estruturas formadas, o número de explantes contendo a estrutura avaliada foi dividido pelo número total de explantes e multiplicado por 100.

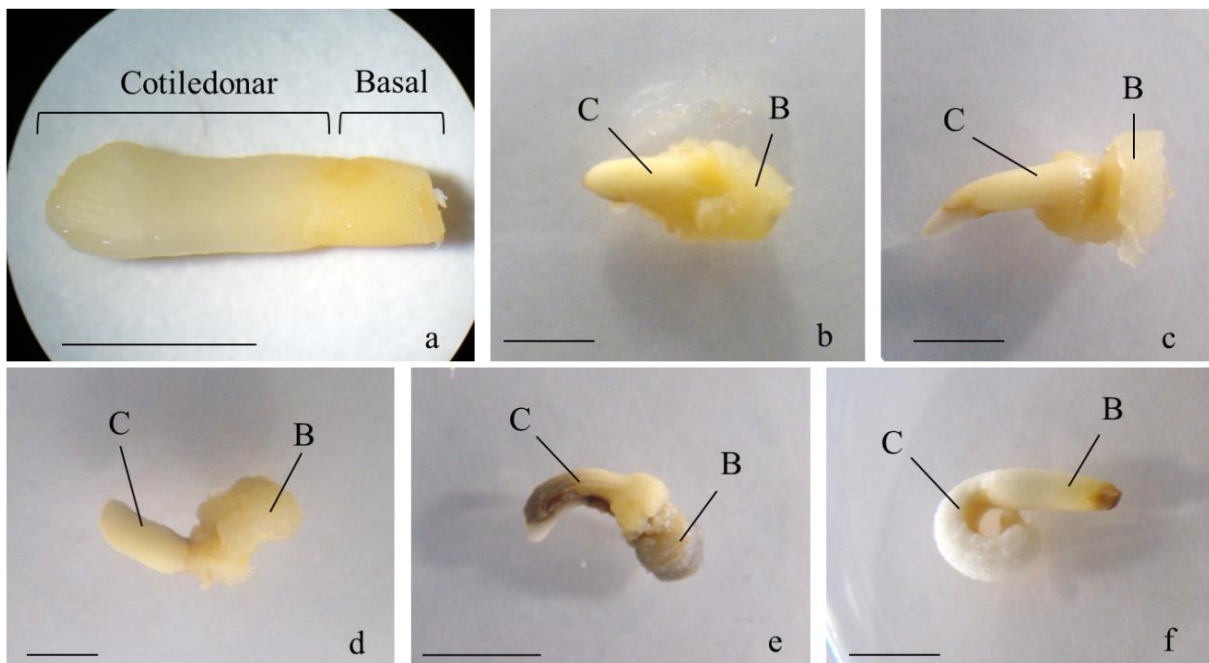
Os dados foram submetidos a análise de variância (ANAVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa de análise estatística SISVAR (DEX/UFLA v.5.3)(Ferreira, 2011). Quando necessário, os dados em percentagem foram transformados pelo valor de arco seno.

### 3 Resultados

#### 3.1 Indução de embriogênese somática em altas concentrações de auxinas

O embrião zigótico do babaçu utilizado como explante inicial se caracteriza por apresentar duas regiões distintas: a porção cotiledonar ou distal, que abrange aproximadamente 2/3 do embrião, e a porção basal ou proximal, onde se encontram os tecidos meristemáticos do eixo embrionário (Figura 1a).

Aos 2 meses de indução, nos tratamentos com Picloram, 100% dos calos formados foram observados na porção basal do explante (Figura 1 b, c, d). Já os calos formados nos tratamentos com o 2,4-D caracterizavam-se por serem bastante oxidados, em praticamente todos os explantes cultivados (Figura 1e). Por outro lado, os explantes mantidos em meio sem auxina (tratamento controle) germinaram e, como era de se esperar, não formaram calos (Figura 1f).



**Figura 1:** Explante inicial e resultado da formação de calos primários a partir de embriões zigóticos maduros de babaçu, com altas concentrações de auxinas (a – inicial; b a f - após 2 meses de cultivo). a) Embrião zigótico antes da inoculação, com distinção das regiões cotiledonar e basal; b) Calo inicial formado na região basal com 225  $\mu\text{M}$  de Picloram; c) Calo formado na região basal com 450  $\mu\text{M}$  de Picloram; d) Calo formado na região basal com 675  $\mu\text{M}$  de Picloram; e) Calo formado na região basal e início de morte do explante mantido em meio com 225  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; f) embrião zigótico germinando com modificação da porção cotiledonar, sem auxina. C- cotilédone; B- base. Escala: 5 mm.

As percentagens de explantes que responderam à indução, com intumescimento ou surgimento de calo, foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos (Tabela 1). Assim, entre os explantes induzidos com 2,4-D, 41,7% dos explantes na concentração de 225  $\mu\text{M}$  foram responsivos, 16,7% na concentração de 450  $\mu\text{M}$  e nenhum explante na concentração de 675  $\mu\text{M}$ . Já nos tratamentos com Picloram, a menor percentagem de resposta ocorreu nas concentrações de 450 e 675  $\mu\text{M}$ , com 83,3% cada e foi de 100% na concentração de 225  $\mu\text{M}$  (Tabela 1). Os explantes do controle germinaram (75%) e não formaram calo.

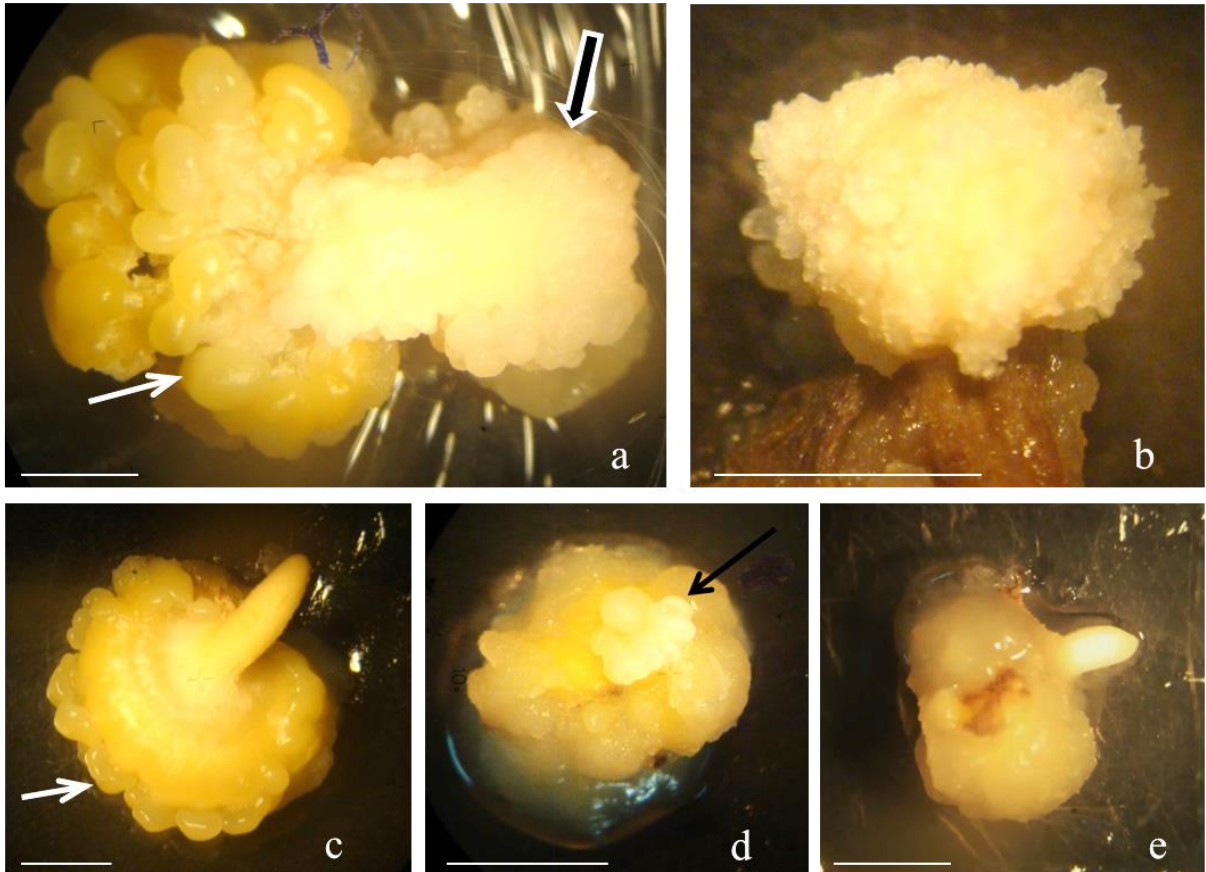
Embora a percentagem de explantes que responderam à indução tenha sido estatisticamente diferente, a percentagem de explantes que formaram calo foi alta, chegando a 100% nos tratamentos com 225  $\mu\text{M}$  e 450  $\mu\text{M}$  de auxina e a 90% com concentração de 675  $\mu\text{M}$  de Picloram (Tabela 1). No tratamento com 675  $\mu\text{M}$  de 2,4-D nenhum explante foi responsivo e, por isso, nenhum calo foi formado.

**Tabela 1:** Avaliação de resposta à indução e formação de calos a partir de embriões zigóticos de babaçu com diferentes concentrações de auxinas, Picloram e 2,4-D, avaliados após 4 meses de indução. Dados em percentagem.

Auxina ( $\mu\text{M}$ )	Explantes que responderam à indução (%)		
	225	450	675
<b>2,4-D</b>	41,7 bB	16,7 bB	0,0 bB
<b>Picloram</b>	100,0 aA	83,3 aA	83,3 aA
	Formação de calo (%)		
	225	450	675
<b>2,4-D</b>	100,0 aA	100,0 aA	0,0 bB
<b>Picloram</b>	100,0 aA	100,0 aA	90,0 aA

As letras comparam os tratamentos; letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo Teste de Scott-Knott a 5%. Letras maiúsculas comparam os valores nas linhas e letras minúsculas comparam os valores nas colunas.

Os calos formados apresentaram-se bastante distintos morfológicamente e ocorreram em diferentes regiões do explante. A região cotiledonar (distal) do embrião apresentou três tipos de resposta: a formação de calos esbranquiçados, com estruturas nodulares translúcidas (Figura 2 a), a formação de calos brancos esponjosos (Figura 2 b) ou a não formação de calo e aquisição de um aspecto liso e de cor amarelada (Figura 2 c). Além disso, na porção mediana do cotilédone formaram-se calos amarelados com estruturas nodulares amarelas (Figuras 2a, c), ou brancas translúcidas (Figura 2 d). Na porção basal (proximal), surgiram calos mucilaginosos transparentes ou esbranquiçados (Figura 2 e).



**Figura 2:** Aspecto dos tipos de calos formados a partir de embriões zigóticos de babaçu submetidos a tratamentos com 225  $\mu\text{M}$  de Picloram, após 6 meses de cultivo. a) Calo cotiledonar com estruturas nodulares translúcidas (seta preta com contorno branco) e estruturas nodulares amarelas na porção mediana (seta branca); b) calo branco esponjoso na porção cotiledonar; c) calo cuja porção cotiledonar não apresentou resposta e porção mediana com estruturas nodulares amarelas (seta branca); d) calo com estruturas nodulares translúcidas na porção mediana (seta preta); e) calo mucilaginoso formado na porção basal do explante, sem resposta na porção cotiledonar. Escala: a,c-e: 5 mm; b: 2 mm.

O calo mucilaginoso basal se formou em 75% dos explantes na concentração de 450  $\mu\text{M}$  de Picloram e em 100% dos explantes nas concentrações de 225 e 675  $\mu\text{M}$  de Picloram (Tabela 2). O calo da porção cotiledonar com estruturas nodulares amarelas foi o segundo calo mais formado, com 67,0% de ocorrência na concentração de 225  $\mu\text{M}$  de Picloram, diferença estatisticamente significativa quando comparada com a percentagem desse calo formado em outras concentrações dessa auxina. Em geral, os explantes possuíam mais de um tipo de calo, por isso os valores apresentados na Tabela 2, se somados, são maiores que 100%.

O calo primário do tipo mucilaginoso deu origem ao calo embriogênico e, 8,3% destes, após indução por 9 meses em meio contendo 225  $\mu\text{M}$  de Picloram e 11 meses no meio de diferenciação e maturação, formaram embriões somáticos (Figura 3 a). Ao longo de 10 meses, nessas mesmas condições, foram formados, em média, 14 embriões somáticos por calo



(Figura 3 b). Após 8 meses nessas mesmas condições, os calos embriogênicos deram origem a embriões somáticos via embriogênese secundária (Figura 3 c).

**Tabela 2:** Ocorrência (% de explantes) dos diferentes tipos de calos induzidos a partir do embrião zigótico de babaçu, após 6 meses de cultivo na presença de Picloram, em função da região do embrião e da concentração da auxina

Picloram ( $\mu\text{M}$ )	Região cotiledonar				Região basal	
	Distal		Mediana		Proximal	
	Branco com estruturas nodulares translúcidas	Amarelo liso	Branco esponjoso	Estruturas nodulares amarelas	Estruturas nodulares brancas translúcidas	Mucilaginoso
<b>225</b>	33,0 a	25,0 a	33,0 a	67,0 a	0,0 b	100,0 a
<b>450</b>	16,0 a	42,0 a	8,0 a	25,0 b	33,0 a	75,0 b
<b>675</b>	42,0 a	33,0 a	25,0 a	10,0 b	0,0 b	100,0 a

As letras comparam os tratamentos (colunas); letras diferentes indicam que houve diferença significativa pelo Teste de Scott-Knott a 5%.



**Figura 3:** Aspecto dos calos e embriões somáticos formados a partir de embriões zigóticos de babaçu induzidos em meio com 225  $\mu\text{M}$  de Picloram. a) após 8 meses em meio de maturação; b) após 10 meses em meio de maturação; c) após 18 meses em meio de maturação. Escala: a-b: 2 mm; c: 10 mm.

### 3.2. Indução de embriogênese somática em baixas concentrações de auxinas

#### 3.2.1. Explantes inteiros ou seccionados

A percentagem de explantes responsivos ao meio de cultura nos tratamentos com baixas concentrações de 2,4-D e Picloram foram superiores a 79,2%, sem diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos (Tabela 3). No meio de cultura sem auxinas (tratamento controle), a principal resposta observada foi a germinação dos embriões zigóticos, sem a formação de calos.

A maioria dos explantes de babaçu cultivados em meio de MS com 2,5 ou 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D ou Picloram formou calos primários (Tabela 3). Houve diferenças significativas para a formação de calos em função do tipo (porção) do explante, com percentagens menores de calos formados na porção cotiledonar, em todas as concentrações das auxinas, com exceção de Picloram na concentração de 5,0 mg.L<sup>-1</sup>.

Após 14 meses de cultivo, o calo mucilaginoso da região basal, formado na maioria dos explantes, perdeu o aspecto mucilaginoso e adquiriu um aspecto compacto. Este tipo de calo adquiriu características embriogênicas e deu origem a embriões somáticos. A maior percentagem de calos embriogênicos formados ocorreu nos explantes cotiledonares em meio suplementado com 2,4-D a 2,5 mg.L<sup>-1</sup> (33,3%). Nesta concentração de 2,4-D, 12,5% dos calos da porção basal e 5,2% dos calos de explante inteiro originaram embriões somáticos (Tabela 3).

Houve diferenças significativas na percentagem dos diferentes tipos de calo formados em função da concentração das auxinas e do tipo do explante (inteiro ou seccionado) (Tabela 4). A presença das auxinas no meio de cultura induziu a formação dos calos descritos anteriormente.

O calo mucilaginoso basal foi o calo que se formou na maior quantidade de explantes, com mínimo de 69,6% nos tratamentos com Picloram e máximo de 90,5 % no tratamento de 2,4-D na concentração de 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. No entanto, estes valores não foram significativamente diferentes quando se compararam as diferentes concentrações de auxina ou os tipos de explante (Tabela 4).

O Picloram na concentração de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> induziu a formação de calos com estruturas nodulares na porção cotiledonar (Figura 3a) e aumentou significativamente a percentagem de calos formados nos explantes inteiros e a formação de calos granulados transparentes em explantes seccionados (Tabela 4).

O 2,4-D na concentração de 5,0 mg.L<sup>-1</sup> aumentou significativamente a formação de estruturas nodulares translúcidas em explantes seccionados, na porção basal (Tabela 4). Já o calo branco esponjoso foi formado em menos de 40% dos explantes e não apresentou diferença significativa na percentagem de formação entre os tratamentos (Tabela 4).

**Tabela 3:** Efeito de baixas concentrações de 2,4-D e Picloram na percentagem de explantes que responderam à indução, nas percentagens de calos formados, de calos embriogênicos e na média de embriões somáticos formados por calo, após quatro meses em meio de indução e de cinco meses em meio de diferenciação e maturação, durante a embriogênese somática de babaçu, a partir de embriões zigóticos maduros.

<b>Explantes que responderam ao cultivo<sup>1</sup> (%)</b>		<b>Tipos de explante</b>		
<b>Auxina</b>	<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>inteiro</b>	<b>cotiledonar</b>	<b>basal</b>
-	0,0	95,2 aA	79,2 aA	83,3 aA
2,4-D	2,5	90,5 aA	85,7 aA	95,2 aA
	5,0	100,0 aA	91,7 aA	100,0 aA
Picloram	2,5	95,8 aA	87,5 aA	91,6 aA
	5,0	95,8 aA	79,2 aA	100,0 aA

<b>Formação de calo primário * (%)</b>		<b>Tipos de explante</b>		
<b>Auxina</b>	<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>inteiro</b>	<b>cotiledonar</b>	<b>basal</b>
-	0,0	0,0 bA	0,0 cA	0,0 bA
2,4-D	2,5	100,0 aA	28,5 bB	80,0 aA
	5,0	95,2 aA	58,3 aB	80,0 aA
Picloram	2,5	100,0 aA	54,5 bB	95,6 aA
	5,0	91,3 aA	77,3 aA	96,4 aA

<b>Formação de calo embriogênico * (%)</b>		<b>Tipos de explante</b>		
<b>Auxina</b>	<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>inteiro</b>	<b>cotiledonar</b>	<b>basal</b>
-	0,0	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA
2,4-D	2,5	5,2 aA	33,3 aA	12,5 aA
	5,0	0,0 bB	7,1 aA	0,0 bB
Picloram	2,5	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA
	5,0	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA

<b>Média de embriões somáticos formados por calo</b>		<b>Tipos de explante</b>		
<b>Auxina</b>	<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>inteiro</b>	<b>cotiledonar</b>	<b>basal</b>
-	0,0	-	-	-
2,4-D	2,5	1,0	16,0	10,5
	5,0	-	24,0	-
Picloram	2,5	-	-	-
	5,0	-	-	-

<sup>1</sup> Explantes vivos e que mostraram alguma resposta de alteração morfológica.

\* significativo pelo Teste de Scott-Knott a 5%. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa; letras maiúsculas comparam nas linhas, letras minúsculas comparam nas colunas.

**Tabela 4:** Ocorrência (% de explantes) de diferentes tipo de calos induzidos a partir do embrião zigótico de babaçu inteiro ou seccionado, após 6 meses de indução na presença de Picloram e 2,4-D, em função da região do embrião zigótico e da concentração das auxinas testadas

		Região cotiledonar			
Auxina	mg.L <sup>-1</sup>	Branco esponjoso		Calo com estruturas nodulares translúcidas	
		Inteiro	Seccionado	Inteiro	Seccionado
<b>2,4-D</b>	<b>2,5</b>	26,3 ± 10,1 aA	15,0 ± 7,8 aA	26,3 ± 10,1 cA	20,0 ± 8,7 cA
	<b>5,0</b>	28,6 ± 9,5 aA	25,0 ± 9,0 aA	38,1 ± 11,0 bA	45,8 ± 9,4 bA
<b>Picloram</b>	<b>2,5</b>	26,1 ± 10,0 aA	36,4 ± 9,8 aA	86,9 ± 6,8 aA	45,4 ± 10,3 bB
	<b>5,0</b>	17,4 ± 10,3 aA	37,5 ± 10,0 aA	52,2 ± 10,0 aA	58,3 ± 10,3 aA

		Região basal			
Auxina	mg.L <sup>-1</sup>	Calo com estruturas nodulares translúcidas		Calo mucilaginoso	
		Inteiro	Seccionado	Inteiro	Seccionado
<b>2,4-D</b>	<b>2,5</b>	0,0 aA	0,0 cA	89,5 ± 8,7 aA	80,0 ± 8,7 aA
	<b>5,0</b>	4,7 ± 4,7 aB	54,2 ± 10,3 aA	90,5 ± 6,5 aA	83,3 ± 7,7 aA
<b>Picloram</b>	<b>2,5</b>	13,0 ± 6,8 aA	27,3 ± 9,0 bA	69,6 ± 9,8 aA	77,3 ± 9,0 aA
	<b>5,0</b>	13,0 ± 6,8 aA	12,5 ± 6,8 cA	69,6 ± 9,8 aA	75,0 ± 9,0 aA

Letras minúsculas comparam o mesmo tipo de explante para diferentes tratamentos (coluna). Letras maiúsculas comparam explantes diferentes para um mesmo tratamento (linha). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5%. Os resultados representam a média por tratamento ± o erro padrão.

### 3.2.2 Avaliação do protocolo final

Os resultados deste experimento, que comparou o 2,4-D e Picloram na concentração de 13,4 µM, mostraram que houve maior indução da formação de calos primários pelo 2,4-D do que pelo Picloram (Tabela 5). Embora seja alta a percentagem de explantes que germinaram *in vitro* na presença de 2,4-D, estes valores não causaram a redução na percentagem de explantes que responderam com formação de calos.

As maiores percentagens de calos embriogênicos, nos quais ocorreu a formação de embriões somáticos, foram verificadas após indução com o 2,4-D. Porém, quando se compara o número de embriões somáticos formados por calo, não houve diferença entre as duas auxinas (Tabela 5).

Os calos embriogênicos formaram três tipos de estruturas: o embrião somático, as estruturas embriogênicas isoladas, muito semelhantes ao embrião somático, e as estruturas embriogênicas conadas, de aparência foliar, de desenvolvimento anormal e bastante diferenciadas do embrião somático (o detalhamento dessas estruturas será feito adiante).

Com relação às outras estruturas embriogênicas formadas, não houve diferenças significativas entre os tratamentos, apenas uma redução no número de estruturas embriogênicas isoladas no tratamento com 2,4-D.

**Tabela 5:** Frequência (%) de explantes que responderam à indução ou à germinação, frequência de formação de estruturas embriogênicas e média dos números de estruturas embriogênicas formadas nos calos embriogênicos (embrião somático, estrutura embriogênica e estrutura embriogênica conada, explicação no texto), após 6 meses de indução na presença de 2,4-D ou Picloram, na concentração de 13,4  $\mu$ M e 6 meses de diferenciação/maturação.

<b>Auxina</b>	<b>Formação de calos primários (%)</b>	<b>Formação de calos embriogênicos (% dos calos primários)</b>	<b>Explantes que germinaram (%)</b>
<b>2,4-D</b>	33,3 $\pm$ 8,0 a	50,0 $\pm$ 8,0 a	33,3 $\pm$ 5,3 a
<b>Picloram</b>	18,8 $\pm$ 5,7 b	77,8 $\pm$ 1,3 a	0,0 $\pm$ 0,0 b
	<b>Formação de estruturas embriogênicas (% de calos embriogênicos)</b>		
	<b>Embriões somáticos</b>	<b>Estrutura embriogênica isolada</b>	<b>Estrutura embriogênica conada</b>
<b>2,4 -D</b>	80,0 $\pm$ 33,9 a	20,0 $\pm$ 4,8 a	40,0 $\pm$ 34,2 a
<b>Picloram</b>	28,6 $\pm$ 20,2 b	42,9 $\pm$ 33,3 a	57,1 $\pm$ 33,3 a
	<b>Número de estruturas formadas (Média por calo)</b>		
	<b>Embriões somáticos</b>	<b>Estrutura embriogênica isolada</b>	<b>Estrutura embriogênica conada</b>
<b>2,4 -D</b>	3,2 $\pm$ 1,1 a	1,0 $\pm$ 0,4 b	5,0 $\pm$ 0,8 a
<b>Picloram</b>	2,5 $\pm$ 1,5 a	6,0 $\pm$ 2,0 a	3,0 $\pm$ 0,5 a

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5%. Os resultados representam as taxas, em porcentagem, por tratamento  $\pm$  o erro padrão.

Os dados confirmaram que o 2,4-D é a melhor auxina para a indução de calos embriogênicos de babaçu e o tempo de indução de 6 meses é o mais eficiente para a formação de calos embriogênicos e para aumentar o número de embriões formados por calo.

### 3.3. Caracterização anatômica dos calos e das estruturas embriogênicas formadas

Os calos nodulares (Figura 4 a) foram abundantes tanto na porção cotiledonar quanto na basal. A caracterização anatômica dessas estruturas permitiu identificar regiões com grande atividade de divisão celular e origem de regiões meristemáticas (Figura 4 a, b, c); as estruturas nodulares possuem protoderme e feixes procambiais, e não apresentam meristemas caulinares ou radiculares organizados (Figura 4 c).

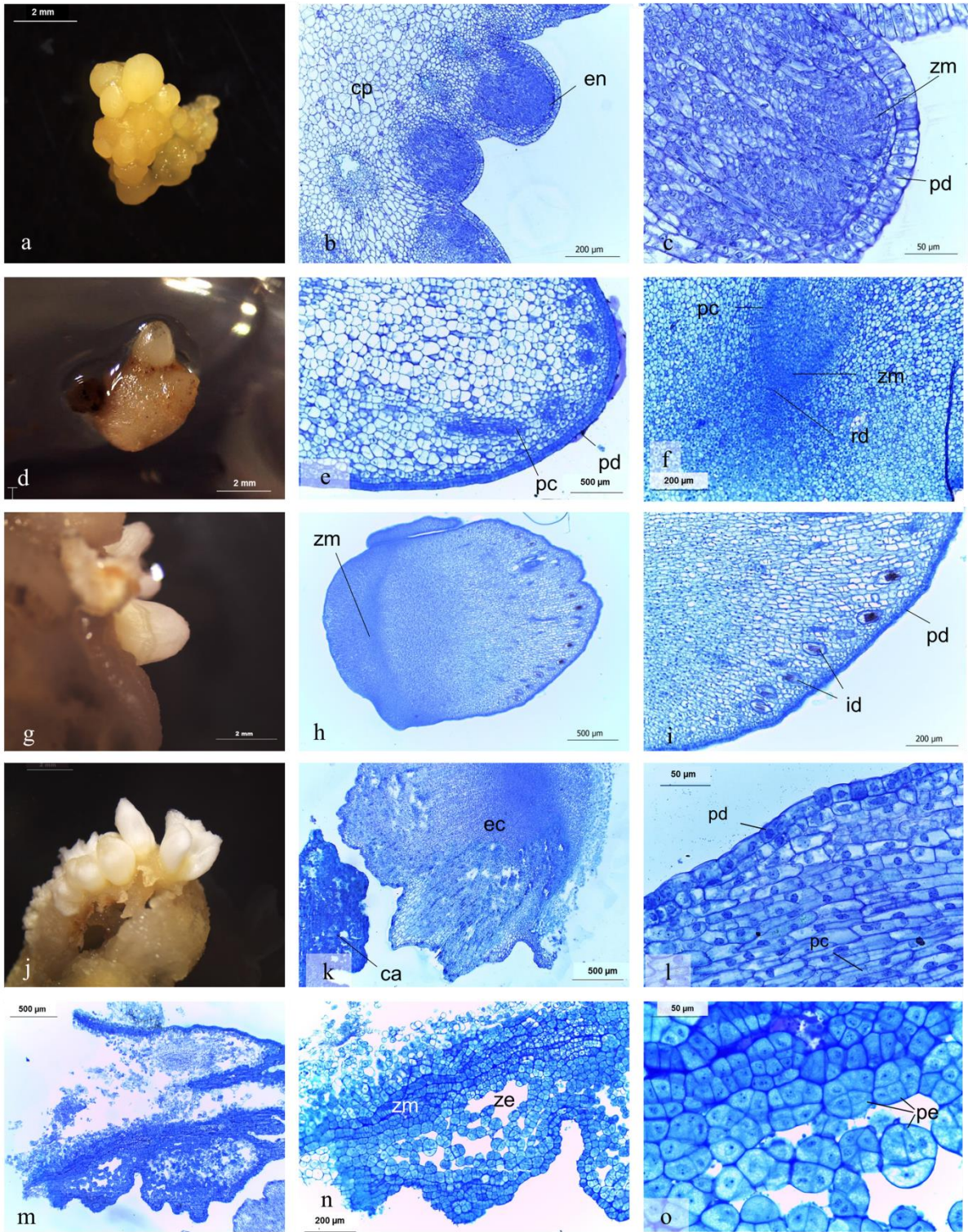
Os calos compactos da porção basal apresentaram-se amorfos e bastante oxidados e nestes calos se formaram embriões somáticos completos, com protoderme, feixes de procâmbio, zona meristemática e organização radicular (Figura 4 d, e, f).

As estruturas embriogênicas isoladas apresentaram protoderme, procâmbio e inclusões de cristais (idioblastos) (Figura 4 g, h, i) e, embora todas essas sejam reconhecidamente características da formação de embriões somáticos, estas estruturas não apresentavam plúmula e não puderam se converter em plântulas em etapas posteriores.

Além de características morfológicas, as estruturas embriogênicas puderam ser diferenciadas pela região do explante onde se formaram. As estruturas embriogênicas (isoladas ou conadas) ocorreram principalmente na porção mediana e apical do cotilédone, tendo sido originadas dos calos nodulares. Por outro lado, os embriões somáticos se formaram somente na região basal do explante original, a partir de calos compactos.

As estruturas embriogênicas conadas possuem características embriogênicas, como feixes do procâmbio e protoderme, porém, o seu padrão de crescimento e de desenvolvimento foi anormal mostrando, muitas vezes, aspecto foliar e clorofilado (Figura 4 j, k, l).

A anatomia dos calos nodulares embriogênicos, de onde se originaram estas estruturas, permitiu diferenciar duas regiões: uma interna, ordenada, que constitui a zona meristemática e outra, a zona embriogênica, externa, com estrutura descontínua e desorganizada, onde foi possível identificar a formação de estruturas proembriogênicas, logo abaixo da epiderme (Figura 4 m, n). As estruturas proembriogênicas globulares possuem características de células tipicamente embriogênicas: células com bastante citoplasma e vários vacúolos pequenos, núcleo grande e centralizado, com um nucléolo bastante corado e um espessamento da parede celular que permite o isolamento da estrutura embriogênica dos tecidos ao redor (Figura 4 o).

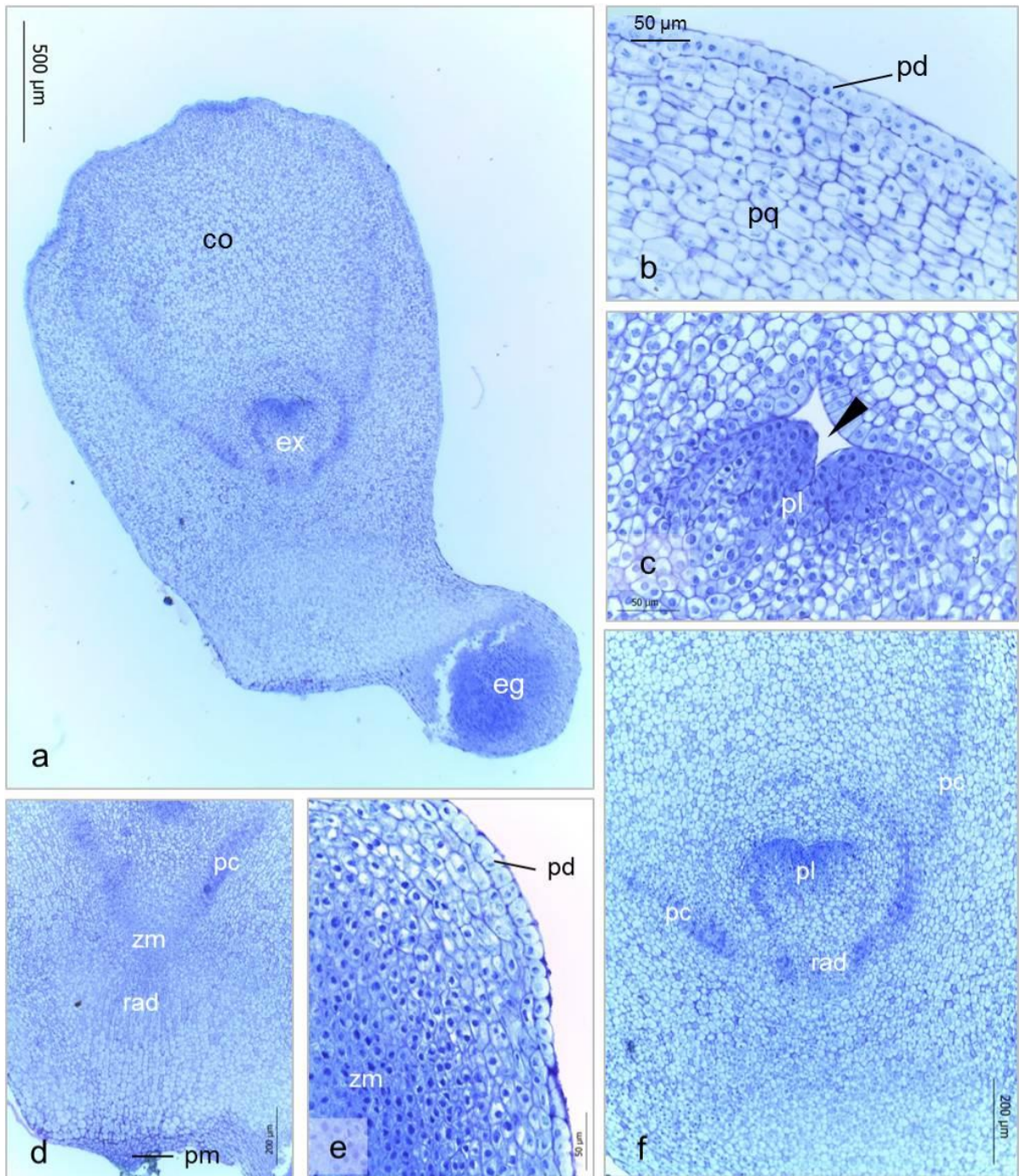


**Figura 4:** Caracterização anatômica dos calos e estruturas embriogênicas de babaçu durante a embriogênese somática, em cortes longitudinais. a) Calo nodular após 4 meses de cultivo; b) Anatomia do calo nodular mostrado em a, evidenciando o calo primário (cp) e as estruturas nodulares (en); c) Detalhe da estrutura nodular evidenciando a protoderme (pd) e a zona meristemática (zm); d) Porção de calo embriogênico e embrião somático em estágio inicial de desenvolvimento; e) Anatomia do embrião somático mostrado em g evidenciando os feixes do procambio (pc) e a protoderme (pd); f) Detalhe anatômico do embrião somático mostrado em g, evidenciando a zona meristemática (zm) e o início da radícula (rd), que darão origem ao eixo embrionário, e os feixes do procambio (pc); g) Estrutura embriogênica isolada formada sobre calo embriogênico; h) Anatomia da estrutura embriogênica mostrada em d evidenciando a zona meristemática (zm); i) Detalhe do ápice da estrutura embriogênica evidenciando a protoderme e os idioblastos na porção distal; j) Calo embriogênico e estruturas embriogênicas conadas; k) Anatomia da estrutura embriogênica (ec) mostrada em j e calo embriogênico (ca); l) Detalhe anatômico de k, evidenciando o procambio (pc) e a protoderme (pd) da estrutura embriogênica conada; m) Anatomia do calo embriogênico (mostrado em j); n) Detalhe da anatomia do calo embriogênico, mostrando a zona meristemática (zm) e a zona embriogênica (ze); o) detalhe da zona embriogênica, evidenciando as estruturas proembriogênicas globulares (pe).

Os embriões somáticos no estágio de torpedo, formados no calo da porção basal, possuem anatomia muito semelhante à anatomia de embriões zigóticos (Capítulo I, Figura 8), apresentando um cotilédone bastante desenvolvido e revestido por protoderme, feixes do procambio bem definidos e um eixo embrionário completo, com plúmula (inclusa na fenda cotiledonar) e meristema radicular (Figura 5 a, b, c, d, f). Os embriões somáticos apresentam também uma protuberância basal, semelhante à protuberância micropilar do embrião zigótico, ponto de inserção do embrião ao opérculo, estrutura onde têm início os eventos da germinação *in vivo*.

Na Figura 5 é possível ver ainda um embrião somático no estágio inicial do desenvolvimento, o estágio globular, definido pela presença de uma protoderme e de uma zona meristemática preenchendo grande parte da estrutura (Figura 5 e).





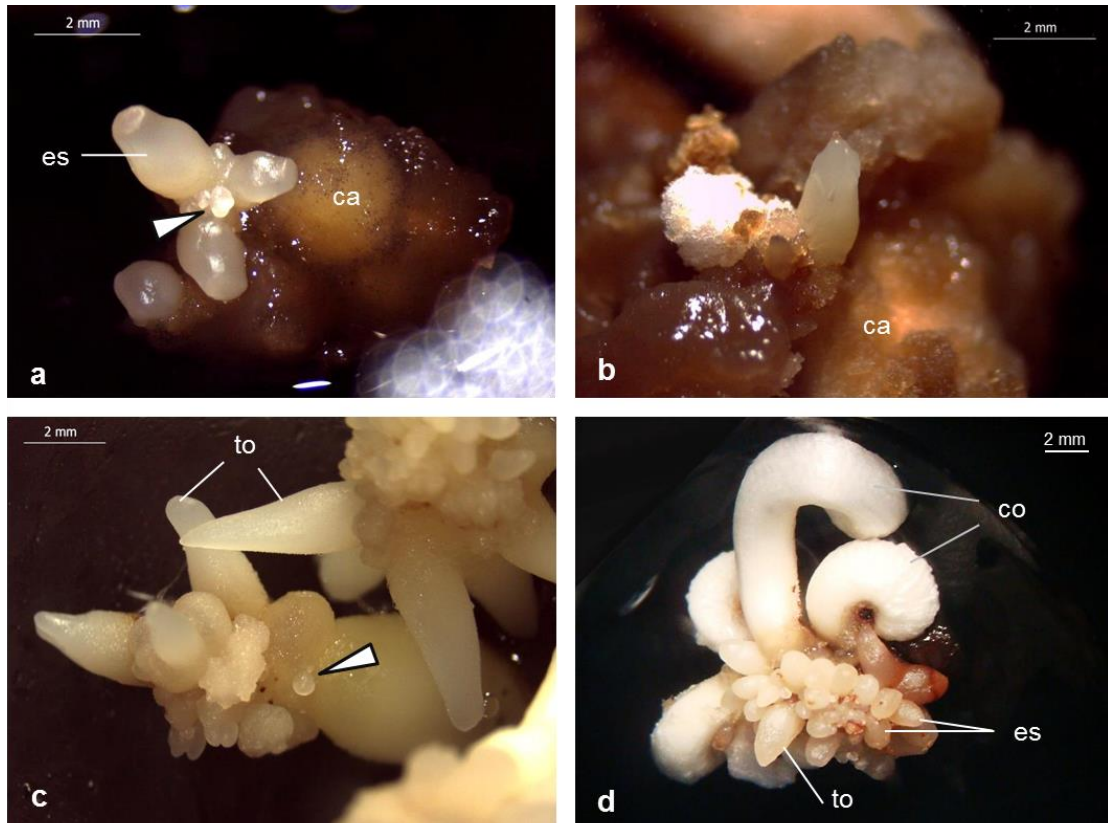
**Figura 5:** Cortes histológicas do embrião somático de babaçu (estádio de torpedo) e de estrutura embriogênica em estágio inicial de formação, após 6 meses de indução em meio com  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D. Todos em sentido longitudinal. a) Embrião somático evidenciando o eixo embrionário (ex) e o cotilédone (co) e, conectado ao embrião, uma estrutura embriogênica no estágio globular (eg); b) Detalhe da região apical do cotilédone, evidenciando a protoderme (pd) e o parênquima cotiledonar (pq); c) Detalhe da plúmula (pl) e da fenda cotiledonar (ponta de seta); d) Detalhe da região basal do cotilédone, evidenciando o procâmbio (pc), a zona meristemática (zm), a radícula (rad) e a protuberância micropilar (pm); e) Detalhe da estrutura embriogênica globular, evidenciando a protoderme (pd) e a zona meristemática (zm); f) Região mediana do cotilédone, que envolve o eixo embrionário, formado pela plúmula (pl) e radícula (rad) e feixes do procâmbio (pc).

### 3.5. Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas

O tempo necessário para o início da formação de embriões somáticos variou de 10 a 22 meses, dependendo do explante utilizado e da auxina, período este necessário para que fosse possível visualizar estruturas globulares translúcidas caracterizando embriões somáticos em fase semelhante à globular (Figura 6 a).

Aglomerados de embriões somáticos em diferentes fases do desenvolvimento embrionário, incluindo o estágio inicial (globular), intermediário (cotiledonar) e final (torpedo) de maturação foram observados nos calos embriogênicos (Figuras 6 a, b), o que caracteriza um processo de embriogênese não sincronizado. Após a individualização dos embriões somáticos na fase inicial de desenvolvimento, o calo induzido continuou a formar novos embriões, o que sugere a futura aplicação desse protocolo para clonagem dessa espécie em larga escala.

De maneira geral, os embriões somáticos formados se desenvolveram normalmente, passando pelos diferentes estádios embrionários, e se converteram em plântulas morfológicamente semelhantes às obtidas com a germinação de embriões zigóticos (Figura 7 e Capítulo I, Figura 2 J). Durante a fase de regeneração, verificou-se o alongamento dos tecidos cotiledonares e formação do haustório, em seguida, o desenvolvimento da parte aérea para só então ser observada a formação da raiz (Figura 7 c, f). Essas etapas de diferenciação são semelhantes ao padrão de germinação dos embriões zigóticos (dados apresentados no Capítulo I).



**Figura 6:** Etapas na formação e maturação dos embriões somáticos de babaçu. a) calo embriogênico (ca) com embriões somáticos nos estádios inicial (seta) e intermediário (es), após indução com Picloram por 6 meses e maturação por 2 meses; b) calo embriogênico (ca) com embrião em final de estágio intermediário, após indução com 2,4-D por 6 meses e maturação por 2 meses; c) grupos de embriões somáticos em diversas fases de desenvolvimento, evidenciando as fases inicial (seta) e final (to), após indução com 2,4-D por 6 meses e maturação por 8 meses; d) grupos de embriões somáticos em diversas fases de desenvolvimento evidenciando a intermediária (es), a final (to) e embriões somáticos em estágio de conversão a plântulas, apresentando cotilédones (co) alongados, após indução com 2,4-D por 5 meses e maturação por 6 meses, todos em meio de maturação.



**Figura 7:** Desenvolvimento de embriões somáticos de babaçu e conversão à plântula em resposta de indução ao 2,4-D. a) Embrião somático (\*) após 5 meses em meio de diferenciação e maturação b) o mesmo embrião (\*) após 6 meses em meio de diferenciação e maturação; c) planta regenerada do embrião (\*) após 18 meses do início da indução (6 meses de indução + 12 meses de diferenciação, maturação e conversão); d) embrião somático (\*) após 7 meses em meio de diferenciação e maturação; e) o mesmo embrião (\*) após 8 meses em meio de diferenciação e maturação; f) planta regenerada do embrião (\*) após 20 meses do início da indução (6 meses de indução + 14 meses de maturação e conversão) Escala: c: 10 mm; f: 5 mm.

## Discussão

A embriogênese somática de babaçu a partir de embriões zigóticos ocorre por via indireta, com a formação de calos, e este resultado está de acordo com dados de diversos autores para os quais esta é a forma mais frequente de embriogênese (Gaj, 2004; Fehér, 2008; Zavattieri et al., 2010; Ree; Guerra, 2015).

Em outras palmeiras, o uso de tecidos embrionários tem sido testado *in vitro* com sucesso (Karunaratne; Periyapperuma, 1989; Fernando; Gamage, 2000; Steinmacher et al.,

2007, Moura et al., 2009; Thawaro; Te-Chato, 2009; Saldanha; Martins-Coder, 2012; Scherwinski-Pereira et al., 2012; Balzon et al., 2013; Luis; Scherwinski-Pereira, 2014) e isto pode ser explicado porque os tecidos de embriões zigóticos são altamente responsivos à indução *in vitro* (Ree; Guerra 2015). Além disso, a obtenção deste explante causa o mínimo dano à planta e é um material naturalmente livre de patógenos (Ree; Guerra 2015).

O uso de 2,4-D em baixas concentrações, em meio sem adição de carvão ativado, é eficiente para a obtenção de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos de babaçu. A percentagem de formação de calos primários (33,3%) e, a partir destes, de calos embriogênicos (50%), foi maior após indução com 2,4-D. No entanto, tratamentos com Picloram e com concentrações maiores de 2,4-D também levaram à formação de calos embriogênicos, embora em percentagens menores (28,6% e 4,8% respectivamente).

O meio de MS com 2,5 mg.L<sup>-1</sup> (13,4 µM) de 2,4-D e indução por 6 meses permitiu a formação de embriões somáticos em 80% dos calos embriogênicos e levou à obtenção o maior número de embriões formados por calo. Estes dados estão de acordo com outros protocolos que utilizaram com sucesso o 2,4-D na embriogênese somática em palmeiras, como *Cocos nucifera* (Perera et al. 2007 e 2009) e *Acrocomia aculeata* (Luis; Scherwinski, 2014).

O Picloram, embora tenha permitido a formação de embriões somáticos, necessitou de um maior tempo para induzir a reposta embriogênica em babaçu. Esta auxina também foi eficiente na indução de ES em outras espécies de palmeiras, como *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007) e *A. aculeata* (Moura et al., 2009). O Picloram induziu uma maior formação de calos nodulares em *Attalea speciosa*, semelhante à resposta observada em *Acrocomia aculeata* (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014).

Nos protocolos de babaçu aqui apresentados, a indução da embriogênese a partir de embriões zigóticos ocorreu na ausência de carvão ativado (CA). Normalmente, acrescenta-se CA ao meio quando o 2,4-D é utilizado em concentrações superiores a 10 mg.L<sup>-1</sup> (Saleh; Scherwinski-Pereira, 2015), pois supostamente o CA tem capacidade de adsorver o 2,4-D acrescentado ao meio, alterando a concentração ideal dessa auxina, necessária para a resposta de formação de calo embriogênico (Ebert; Taylor 1990). No entanto, o CA foi utilizado nas etapas de diferenciação, maturação e conversão dos embriões somáticos, de acordo com diversos protocolos para estas etapas em palmeiras (Sáenz et al, 2006 ; Moura et al., 2009; Scherwinski-Pereira et al., 2012).

Não há um consenso quanto à utilização de carvão ativado (CA) na indução da embriogênese somática em palmeiras (Gueye, 2009). Na indução do calo primário, Sané et al.

(2006), Fki et al. (2003) e Kriaa et al. (2012) não utilizaram CA. Para *Phoenix canariensis* o uso de CA teve um efeito negativo sobre formação dos calos embriogênicos (Thomas, 2008).

O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos via ES depende de diferentes fatores, como genótipo e tipo da planta, idade e estados fisiológico e de desenvolvimento do explante e estado da planta doadora (Viñas; Jiménez, 2011). A possível diversidade genética presente nos embriões zigóticos de babaçu usados como explantes, por se tratar de uma espécie nativa e de fecundação cruzada, possivelmente tenham se refletido na heterogeneidade da resposta embriogênica, com baixa percentagem de calos embriogênicos e com padrões de reposta diversos (variando de 1 a 26 embriões somáticos formados por calo). O genótipo parece ser determinante para espécies de palmeira; Silva et al. (2012) testaram nove genótipos de *Elaeis guineensis* e concluíram que ocorre uma variação na resposta embriogênica em função do genótipo.

Os embriões somáticos completos capazes de se regenerar foram obtidos a partir de calos que se formaram na porção basal dos embriões zigóticos utilizados como explantes, provavelmente de tecidos meristemáticos do eixo embrionário. O babaçu não produziu embriões somáticos a partir de tecidos cotiledonares, apesar de produzir calos nodulares com estruturas embriogênicas bastante semelhantes a embriões, os quais têm sido relatados como tendo uma origem multicelular (Perera et al., 2007; Moura et al., 2009; Luis; Scherwinski-Pereira, 2014). As estruturas formadas na região cotiledonar apresentaram características embriogênicas como protoderme, feixes procambiais e idioblastos, porém não possuíam meristemas caulinares organizados. A presença de estruturas globulares aparentemente isoladas e constituídas por células meristemáticas observadas na região central do calo nodular caracteriza a formação de embriões de origem multicelular (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014). Moura et al. (2008) relataram que os embriões de origem multicelular se formam a partir de calos nodulares e embriões globulares de origem multicelular foram também observados por Balzon et al. (2013) a partir de calos embriogênicos de *E. guineensis*.

Os embriões somáticos formados nos calos compactos basais possuem características anatômicas e morfológicas semelhantes aos embriões zigóticos e passam pelos estádios típicos de embriogênese zigótica, isto é, estádios globular, intermediário e final (torpedo) (Jiménez, 2005), durante o seu desenvolvimento. As semelhanças verificadas entre a conversão do embrião somático a plântula e a germinação confirmam o sucesso do protocolo de embriogênese somático aqui descrito.

## **Conclusão**

A embriogênese somática (ES) de babaçu é possível de ser induzida em meio de MS com concentração de 13,4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, em meio sem adição de carvão ativado, via embriogênese indireta. A resposta de ES é lenta e relativamente baixa. No entanto, os explantes com formação de calo embriogênico geram embriões somáticos que são formados continuamente, num padrão não sincronizado, isto é, são encontrados em diversos estádios de desenvolvimento.

Os embriões somáticos de babaçu formados nos calos basais são similares morfolologicamente e anatomicamente aos embriões zigóticos e se desenvolvem de forma semelhante a estes durante a fase de conversão. O tempo de indução do calo embriogênico é de 6 meses, o período de diferenciação e maturação varia de 6 a 10 meses e a conversão à plântula se completa em cerca de 6 meses.

## Referências Bibliográficas

- BALZON, T. A.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 49(1): 41-50, 2013.
- BEULÉ, T. et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with the mantled homeotic flowering abnormally in oil palm (*Elaeis guineensis*). **Tree Genet Genomes** 7: 169-182, 2011.
- BROSCHAT, T. K.; ELLIOTT, M. L.; HODEL, D. R. Ornamental palms: Biology and horticulture. In: JANICK, J. (ed.) **Horticultural Reviews** 42: 1-120, 2014.
- COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. **Germinação de Sementes de Palmeiras com Potencial para Produção de Agroenergia**. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 35 p., 2008.
- COSTA, N. M. de S.; ALOUFA, M. A. I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciência Agronômica Fortaleza** 38(3): 276-279, 2007.
- EBERT, A.; TAYLOR, H. F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 20: 165-172, 1990.
- FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis** 52(1):53-56, 2008.
- FERNANDO, S. C.; GAMAGE, C. K. A. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Science** 151:193–198, 2000.
- FERNANDO, S. C.; VERDEIL, J. L., HOCHER, V., WEERAKOON, L. K., Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera* L. **Plant Cell Tissue Organ Culture** 72: 281– 284, 2003.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA) 35: 1039-1042, 2011.
- FKI, L.; Masmoudi, R.; Drira, N.; Rival, A. An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour **Plant Cell Reports** 21: 517–524, 2003.
- IBGE **Produção da Extração Vegetal e Silvicultura**, v.28, 2013, 69p. Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2013/default\\_xls\\_gr\\_e\\_uf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2013/default_xls_gr_e_uf.shtm)> Acesso em 18 ago 2015.
- GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation** (43): 27-47, 2004.



- GUEYE, B. et al. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 99: 35–45, 2009.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation** 47:91–110, 2005.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27:137-138, 1965.
- KARUNARATNE, S.; PERIYAPPERUMA, K. Culture of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.): callus proliferation and somatic embryogenesis. **Plant Science** 62:247–253, 1989.
- KONAN, E. E.; et al. In vitro conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports** 29: 1-13. 2010.
- KRIAA W. et al. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropropagation using completely mature female flowers **Comptes Rendues Biologies** 335: 194–204, 2012.
- LIMA, J. R. de O. et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova** 30(3): 600-603, 2007.
- LORENZI, H. KAHN, F.; NOBLICK, L. R.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira: Arecaceae**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010.
- LOW, E. T.; ALIAS, H.; BOON, S. H.; SHARIFF, E.; TAN, C. Y.; OOI, L.; SINGH, R.. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. **BMC Plant Biology** 8(1): 62, 2008.
- LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 22(3): 209-215, 2010.
- LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 118:485–496, 2014.
- MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Frutos de Palmeiras da Amazônia**. Manaus: MCT/INPA, 2001. 120p.
- MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; DE SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic Embryos. **Scientia Horticulturae** 119: 447–454, 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473– 497, 1962.

OTHMANI, A.; BAYOUDH, C.; DRIRA, N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 97: 71–79, 2009.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V., VERDEIL, J. L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D. M. D., WEERAKOON, L. K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports** 26: 21–28, 2007. Disponível em DOI 10.1007/s00299-006-0216-4

PERERA, P. I. P.; VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; GUNATHILAKE, T. R.; YAKANDAWALA, D. M. D.; HOCHER V. ; VERDEIL, J. L.; WEERAKOON, L. K. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 99: 73–81, 2009.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SÁENZ, L.; GONZÁLEZ, T.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* L. plumule explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant** 42(1): 37-43, 2006.

RAI M. K.; SHEKHAWAT, N. S.; HARISH; GUPTA, A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 106:179–190, 2011.

RAJANAIDU N.; AINUL, M. M. Conservation of Oil Palm and Coconut Genetic Resources IN: NORMAH, M.N. et al. (eds.) **Conservation of Tropical Plant Species** Springer: New York, 2013.

REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 2015. DOI 10.1007/s11627-015-9722-9.

SÁENZ, L.; HERRERA-HERRERA, G.; UICAB-BALLOTE, F.; CHAN, J. L.; OROPEZA, C. Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera*) **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 100: 301–308, 2010.

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** 12: 171-178, 2012.

SALEH, E. O. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA. Advances in Somatic Embryogenesis of Palm Trees (Arecaceae): Fundamentals and Review of Protocols. In: A. Mujib (ed.), **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications** Springer India, 2016. DOI 10.1007/978-81-322-2683-3\_15

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological Analysis of Callogenesis and Somatic Embryogenesis from Cell Suspensions of Date Palm (*Phoenix dactylifera*) **Annals of Botany** 98: 301–308, 2006.

SANTELLI, P.; CALBO, M. E. R.; CALBO, A. G. Fisiologia pós-colheita de frutos da palmeira *Mauritia vinifera* Mart. (Arecaceae) **Acta botanica brasílica** 23(3): 697-702. 2009.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; GUEDES, R. S.; SILVA, R. A.; FERMINO JR., P. C. P.; LUIS, Z. G; FREITAS, E. de O. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*) **Plant cell, tissue and organ culture** 109: 501–508, 2012.

SILVA, R. C.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) **Plant cell, tissue and organ culture**, 2012. DOI 10.1007/s11240-012-0170-5

SOUZA, M. H. S. L. et al. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 133, p.1–5, 2011.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. **Annals of Botany** 100: 699–709, 2007.

TEIXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 34: 227-233, 1993.

THAWARO, S.; TE-CHATO, S. Effect of genotypes and auxins on callus formation from mature zygotic embryos of hybrid oil palms. **Journal of Agricultural Technology** 5(1): 167-177, 2009.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances** 26: 618–631, 2008.

TOMLINSON, P. B. The uniqueness of palms. **Botanical Journal of the Linnean Society** n. 151: 5–14, 2006.

VIÑAS, M.; JIMÉNEZ, V. M. Factores que influyen em la embriogénesis somática in vitro in palmas (Arecaceae) **Revista Colombiana de Biotecnología** v. XIII(2): 229-242, 2011.

ZAVATTIERI, M.A.; FREDERICO, A. M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology** ISSN: 0717-3458 v.13(1), 15, 2010.

### Capítulo III

## Conservação *ex situ* de sementes de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng): determinação do comportamento e das condições fisiológicas e ambientais mínimas de armazenamento

### Resumo

A conservação *ex situ* se caracteriza por proporcionar a manutenção de recursos genéticos de uma determinada espécie fora do seu habitat natural, a exemplo dos bancos de germoplasma em campo e de sementes. Quando se pretende conservar o germoplasma de determinada espécie por meio de sementes, é essencial que se conheça o comportamento de armazenamento (ortodoxo, intermediário ou recalcitrante) da espécie em questão. O babaçu (*Attalea speciosa*) é uma palmeira nativa importante para as populações das regiões Norte e Nordeste do Brasil, de cujas amêndoas é extraído um óleo com amplas aplicações, inclusive para a produção de biodiesel, mas que até o momento não tem caracterizado seu comportamento, nem as condições mínimas para armazenamento. Neste trabalho, a conservação de sementes de *Attalea speciosa* foi testada em diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. O primeiro passo foi a determinação da umidade inicial da semente e do embrião e as taxas de germinação em função da redução dos teores de umidade ao longo de até oito dias. Em seguida, as sementes contendo por volta de 5% de umidade foram conservadas em quatro temperaturas (-196 °C, -20 °C, 6 °C e 25 °C) e por quatro períodos de tempo (0, 90, 180 e 360 dias). Os testes de germinação foram realizados a partir do resgate e cultivo dos embriões zigóticos *in vitro*. Verificou-se uma queda significativa nas taxas de germinação nos materiais mantidos na temperatura de 25 °C após 360 dias. A formação de parte aérea, de raízes e plantas normais foi favorecida nos tratamentos onde as sementes foram mantidas nas temperaturas de -20 °C e -196 °C. Os resultados obtidos com esse trabalho sugerem que, por tolerar dessecação abaixo de 5% e a conservação a baixas temperaturas (-196 °C, -20 °C), situações nas quais não houve redução nas taxas de germinação, as sementes de *Attalea speciosa* apresentem um comportamento de armazenamento ortodoxo.

**Palavras-chave:** Arecaceae, comportamento de armazenamento, nitrogênio líquido, ortodoxa

## Introdução

Os recursos fitogenéticos são a base para a segurança alimentar mundial e é de suma importância que a diversidade genética das variedades tradicionais, das cultivares melhoradas e das plantas silvestres seja preservada (Sánchez-Chiang, 2010). As causas da perda da diversidade genética são muitas: destruição ou fragmentação de ecossistemas naturais, exploração excessiva, introdução de espécies exóticas, mudanças de cunho socioeconômicas provocadas pelo homem, mudanças nas práticas agrícolas e no uso da terra, além de desastres naturais e os provocados pela ação humana (Hawkes et al., 2000; Rao, 2004).

Visando minimizar os efeitos da perda da biodiversidade, reconhecem-se hoje basicamente duas estratégias de conservação: *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* se refere à conservação dos ecossistemas e habitats naturais e a manutenção de espécies e populações viáveis no seu território natural. A conservação *ex situ* se refere à conservação dos componentes da diversidade biológica fora do seu habitat natural (Hawkes et al., 2000). Os bancos de germoplasma e de sementes são exemplos de estratégias que se propõem a conservar *ex situ* espécies silvestres e domesticadas de interesse, permitindo a conservação dos recursos genéticos em longo prazo (Wang et al., 2005; Berjak; Pammenter, 2008). Outros métodos de conservação *ex situ* são a conservação *in vitro* e a criopreservação e estes se destacam porque necessitam geralmente de pouco material da população original, manutenção mínima, além de poderem garantir a estabilidade genética do material estocado (Reed et al., 2013).

No entanto, quando se pretende a conservação de determinada espécie por sementes, é essencial que se conheça o comportamento de armazenamento para que se possa determinar, as estratégias e condições de armazenamento (Hong; Ellis, 1996).

As sementes que são tolerantes a uma dessecação extrema são chamadas ortodoxas. Estas podem ser estocadas por longos períodos de tempo com baixos conteúdos de água (abaixo de 7%) e a baixas temperaturas (Engelmann et al., 2013). A maioria das angiospermas possui sementes ortodoxas (91,7%) e, dentre estas, muitas são plantas de interesse agrícola (Tweddle, et al., 2003; Engelmann, 2004). As condições mais utilizadas para o armazenamento de sementes com comportamento ortodoxo é de 18 °C ou menos, com  $5 \pm 1\%$  de conteúdo de umidade (Cromarty et al., 1982).

Sementes recalcitrantes são sensíveis à dessecação e perdem rapidamente a viabilidade quando secas. Estas sementes não podem ser facilmente armazenadas em bancos de sementes (Roberts, 1973; Tweddle et al., 2003). Diferentemente das espécies ortodoxas, as sementes

recalcitrantes normalmente não sofrem dessecação durante o amadurecimento e consequentemente apresentam altos conteúdos de água e são metabolicamente ativas durante a dispersão (Kermode; Finch-Savage, 2002). O teor de umidade a partir do qual há perda de viabilidade difere significativamente entre espécies, mas é normalmente superior a 20% (Hong; Ellis, 1996) e em muitas espécies uma pequena alteração no conteúdo de água já é suficiente para causar grandes danos (Bewley; Black, 1994).

Como o próprio nome sugere, as sementes intermediárias têm características de armazenamento que se encontram entre as ortodoxas e as recalcitrantes (Ellis et al., 1990). Em geral, as sementes intermediárias toleram uma dessecação a níveis baixos, mas perdem a viabilidade abaixo de 10-12% de teor de umidade (Walters, 2015). E, diferentemente das sementes ortodoxas, elas normalmente perdem a viabilidade mais rapidamente a temperaturas baixas (p. ex. - 20°C) do que elevadas (p. ex. 15°C) (Hong; Ellis, 1996). Do ponto de vista ecológico, as sementes classificadas como intermediárias são essencialmente tolerantes à dessecação (Tweddle, et al. 2003).

Assim, a classificação das sementes quanto à capacidade de armazenamento depende de estudos de tolerância à dessecação e do armazenamento sob temperaturas baixas. Determinar o comportamento de armazenamento das sementes de diversas espécies deve ser um trabalho contínuo e o acúmulo destes dados deve tornar mais confiáveis os modelos capazes de prever o comportamento de armazenamento de qualquer espécie baseado no conhecimento sobre sua filogenia e/ou ecologia (Hay; Probert, 2013).

A partir de dados obtidos do Seed Information Database (SID) (Royal Botanic Gardens Kew, 2015) sobre os dados de tolerância à dessecação de espécies de palmeiras, foi possível concluir que, embora a maioria delas seja ortodoxa, ocorrem também espécies intermediárias e recalcitrantes. Do total de 72 espécies (pertencentes a 48 gêneros) de *Arecaceae* que fazem parte do banco de dados SID, 31 espécies (43%) são ortodoxas, 12 (17%) são intermediárias e 29 (40%) são recalcitrantes. Neste levantamento, foram consideradas todas as espécies citadas no SID, inclusive aquelas cuja classificação do comportamento de armazenamento está posto em dúvida no site. Considerando que a família *Arecaceae* possui cerca de 2.400 espécies, o número de espécies investigadas quanto ao comportamento das sementes é, portanto, ainda bastante baixo (3,0%).

O babaçu é uma palmeira importante socioeconomicamente para as populações das regiões Norte e Nordeste do Brasil, onde é fonte de renda para comunidades extrativistas (Souza et al., 2011), que extraem das amêndoas o óleo que pode ser destinado tanto para

produção de biodiesel (Lima et al., 2007; Ferrari; Soler, 2015), como para a indústria alimentícia e de cosméticos (FAPEPI, 2010).

O gênero *Attalea* (Kunth) é um dos mais importantes da subfamília Arecoideae, com ocorrência em toda a região neotropical, desde o México ao Paraguai, passando por Bolívia, Brasil e o Caribe (Fava et al., 2011). Após ampla revisão, na qual foram renomeadas espécies incluídas entre os gêneros *Scheelea* e *Orbignya*, contam-se 72 espécies de *Attalea* nas Américas (Govaerts et al., 2011; Tropicos, 2012; WCSP, 2011), das quais, 41 espécies são encontradas no Brasil, sendo que, destas, 19 espécies são endêmicas (Leitman et al., 2013).

No Brasil, as espécies de *Attalea* são encontradas desde as regiões Centro-Oeste até o Norte e Nordeste (Lorenzi et al., 2010). O babaçu está associado principalmente às fitofisionomias da floresta amazônica, mata atlântica, cerrado e, algumas espécies, caatinga (Leitman et al., 2013). *Attalea speciosa* Mart. ex Spreng (sinonímia *Orbignya phalerata*, WCSP, 2011), objeto desse estudo, ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Pará, Piauí e Tocantins (Tropicos, 2012).

Os trabalhos caracterizando as respostas de sementes de babaçu ao armazenamento foram realizados em *Orbignya speciosa* (sin. *Attalea speciosa*) (Gehlsen, 1937), *Attalea cohune* Mart. e *Attalea crassispata* Mart. Burret (Dickie et al, 1992) [Royal Botanic Gardens Kew (SID), 2015]. Nesses estudos, *A. cohune* foi considerada recalcitrante e as demais espécies foram consideradas intermediárias.

Entretanto, estes estudos foram inconclusivos e são necessárias novas investigações que complementem os poucos dados encontrados, especialmente sobre a conservação de sementes em diferentes temperaturas e períodos de armazenamento. Este trabalho teve por objetivo determinar o comportamento e as condições fisiológicas e ambientais mínimas de armazenamento durante a conservação *ex situ* de sementes de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng). Em nosso conhecimento, até o momento, não existem dados na literatura abordando e indicando condições para a conservação *ex situ* de sementes de babaçu.

## Material e métodos

### *Material*

Frutos maduros de babaçu foram coletados de matrizes adultas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Babaçu da Embrapa Meio Norte, em Teresina, PI. As coletas foram realizadas entre os meses de novembro e dezembro de 2013. Os frutos foram processados no próprio local de coleta, tendo sido despulpados e o endocarpa quebrado manualmente, mantendo-se a semente (amêndoa) intacta.

### *Determinação do teor de umidade*

Para determinar o teor de umidade, foi obtido o valor da massa fresca das sementes e em seguida, estas foram seccionadas em pedaços menores com auxílio de bisturi, sendo os embriões também isolados e pesados (Brasil, 2009). Em razão da dureza, optou-se por quebrar a semente em tamanhos maiores ( $1,0 \pm 0,2$  cm) e adequar o tempo de secagem. As sementes e os embriões foram colocados em placas de alumínio e mantidos em estufa de ventilação forçada a  $104^{\circ}\text{C}$ . O tempo adequado de secagem em estufa foi determinado com 2 lotes de 5 sementes que tiveram o seu peso determinado a cada 12h durante e verificou-se que o peso seco se estabilizou após 48h.

O teor de umidade foi calculado como a percentagem da diferença de massa fresca e seca das sementes, de acordo com a fórmula:

$$\frac{\text{massa fresca} - \text{massa seca}}{\text{massa fresca}} \times 100 = \text{teor de umidade}$$

### *Determinação da umidade e germinabilidade das sementes*

Sementes de três matrizes, coletadas na mesma data e mantidas em saco plástico por uma semana à temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , foram colocadas para secar em caixas plásticas de  $30 \times 30 \times 10$  cm, com tampa, contendo no fundo 500g de sílica gel (Qhemis) desidratada (azul escuro) e coberta por uma folha de papel de germinação (germitest).

Foram preparadas quatro caixas e em cada uma foram colocadas 120 sementes, preenchendo todo o espaço interno, formando uma única camada. Posteriormente, cada caixa foi lacrada e colocada em saco plástico para isolamento do meio externo. As caixas foram mantidas em sala climatizada a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura.



A cada 24h, cinco sementes foram retiradas de cada uma das quatro caixas para a determinação do teor de umidade (20 sementes) e 10 sementes foram retiradas de cada uma das quatro caixas para os testes de germinação *in vitro* (40 sementes), até completar oito dias.

Para determinar o teor de umidade, foi obtido o valor da massa fresca das 20 sementes de cada tempo. As sementes e os embriões foram colocados em placas de alumínio e mantidos em estufa de ventilação forçada a 104°C por 48h. Após esse período, as sementes foram rapidamente pesadas para determinar a massa seca, de acordo com os cálculos especificados acima.

Para determinar a taxa de germinação, as sementes passaram por assepsia e posteriormente os embriões foram isolados e inoculados em meio básico para germinarem *in vitro*, conforme metodologia descrita abaixo. As plantas foram subcultivadas para meio básico fresco a cada 30 dias.

A germinação foi avaliada a cada 30 dias por até 120 dias. A avaliação levou em consideração critérios morfológicos e medidas do comprimento do cotilédone, da formação de parte aérea e de raiz. O material foi fotografado com câmera digital Sony DSCH-9 e as mensurações morfométricas foram feitas utilizando-se o programa Image Pro Plus V. 4.5 (Media Cybernetica).

#### *Condições de cultivo e regeneração*

A desinfestação das sementes foi feita em câmara de fluxo laminar, com imersão em álcool 70% por 5 minutos, imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 30 minutos e enxágue por três vezes com água destilada e autoclavada. Em condições assépticas, os embriões zigóticos foram removidos sobre uma placa de petri com auxílio de pinça e bisturi e, em seguida, inoculados em meio de cultura.

O meio de cultura básico utilizado foi o de MS (Murashige; Skoog, 1962) modificado, com 50% da concentração dos sais (Maciel et al., 2010) e acréscimo de ácido pantotênico ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e biotina ( $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Luis et al., 2010). O pH foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes de se adicionar Phytigel (Sigma) ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e carvão ativado (Sigma) ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). O meio preparado foi esterilizado por autoclavagem a 121° C e pressão de 1.3 atm por 15 minutos. Cada embrião foi acondicionado em um tubo de ensaio de 25x150 mm contendo 10 mL do meio de cultura básico, sendo os tubos de ensaio vedados com filme plástico de PVC. Os embriões foram mantidos em sala de crescimento com condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ), luminosidade (irradiância de  $50 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo de 16h de luz (Saleh et al., 2013).

### *Conservação ex situ*

As sementes de três matrizes coletadas na mesma data foram mantidas em caixa de papelão por um mês à temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

A umidade inicial do lote de sementes foi determinada após secagem em estufa de ventilação forçada a 104°C por 48h em três repetições de 5 sementes cada. Pelos resultados obtidos, não foi necessário dessecar as amostras, que se encontravam com teor de umidade de  $5 \pm 0,4\%$  (dados não mostrados).

Uma vez determinada a umidade, as sementes foram colocadas em embalagens de envelope de alumínio trifoliado (polietileno-alumínio-polietileno), impermeável e lacrado com uso de seladora elétrica, para serem armazenados nas diferentes condições de temperatura, por diferentes períodos de tempo.

As temperaturas de armazenamento testadas foram: Nitrogênio líquido (-196 °C), -20 °C, 6 °C e 25 °C. As amostras conservadas na temperatura de -196 °C foram mantidas em botijão de nitrogênio líquido; as amostras de -20 °C e 6 °C foram mantidas em câmara fria, enquanto que as amostras de 25 °C foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD. Os períodos de conservação testados foram de: 0, 180 e 360 dias, perfazendo um total de 12 tratamentos. Para cada tratamento foram preparados 3 envelopes, cada um contendo lotes de 10 sementes.

Para testar a melhor forma de descongelamento, duas amostras extras, com 10 sementes cada, foram conservadas em -20 °C para se testar as estratégias de descongelamento: lento ou rápido. Estas sementes foram mantidas por 30 dias à temperatura de -20 °C. O descongelamento lento foi feito à temperatura ambiente, por 24h, dentro das embalagens ainda lacradas. O descongelamento rápido foi feito colocando-se as embalagens lacradas em banho-maria a 40°C por 30 minutos, em função do tamanho da semente. Após 30 dias, foi avaliada a germinação e, como não houve diferenças estatísticas entre os dois tratamentos (dados não mostrados), optou-se pelo descongelamento rápido das sementes mantidas a -20 °C e -196 °C.

Para determinar a taxa de germinação, após o período de conservação, os embriões zigóticos foram isolados das sementes e, após assepsia, inoculados no meio básico e germinados *in vitro*, de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Considerou-se germinação o crescimento do haustório (pecíolo cotiledonar).

Após 60 e 120 dias, as plântulas foram subcultivadas para as mesmas condições de cultivo, ocasião em que foram avaliadas e fotografadas. A avaliação levou em consideração critérios morfológicos (alongamento do cotilédone, formação de parte aérea e de raiz) e

critérios morfométricos. O material foi fotografado com câmera digital Sony DSCH-9 e as mensurações morfométricas foram feitas utilizando-se o programa Image Pro Plus V. 4.5 (Media Cybernetica).

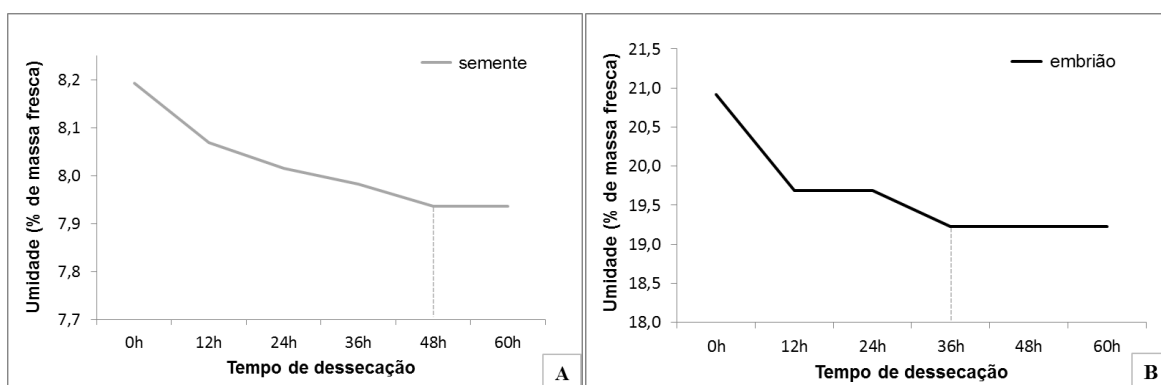
### *Desenho experimental e análise estatística*

O desenho experimental foi inteiramente casualizado e os resultados dos experimentos foram submetidos a teste de análise de variância utilizando o Programa SISVAR (DEX/UFLA v.5.3)(Ferreira, 2011). O teste utilizado foi o de Scott-Knott com 5% de significância. Dados expressos em porcentagem foram previamente transformados segundo a fórmula arco seno  $(x/100)^{0,5}$ .

## **Resultados**

### *Determinação da umidade e germinabilidade das sementes*

O resultado da determinação do tempo adequado para secagem das sementes de babaçu indicou que o conteúdo de água foi estabilizado após 48h em estufa a 104 °C (Figura 1 A) e o conteúdo de água do embrião foi estabilizado após 36h (Figura 1 B).



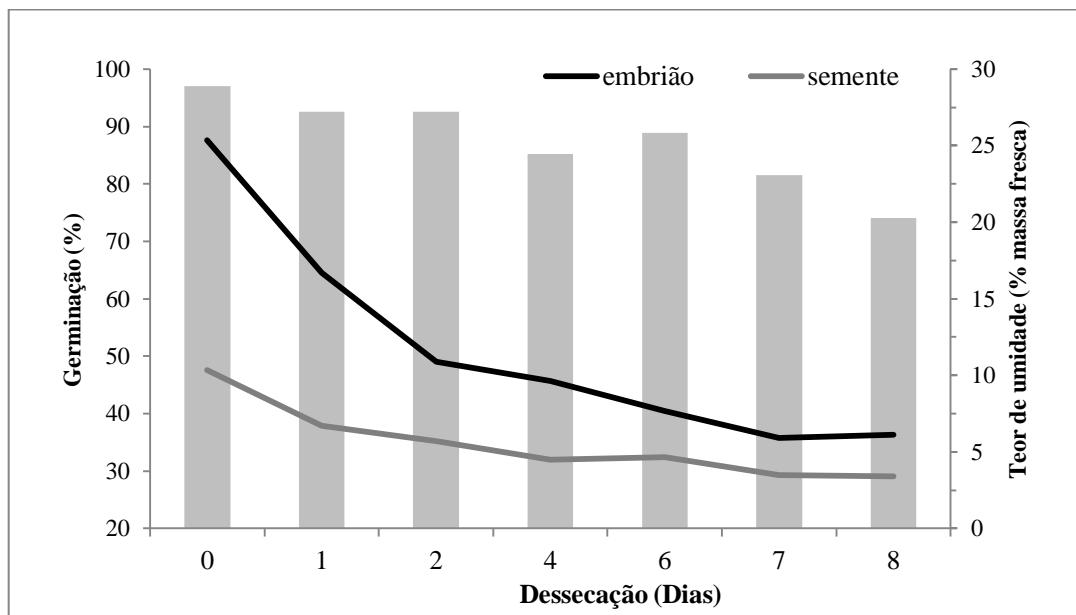
**Figura 1:** Avaliação do tempo de dessecação de sementes (A) e embriões zigóticos (B) de babaçu em estufa a 104 °C, com determinação da umidade (% de massa fresca) a cada 12h. A linha tracejada indica o tempo ideal para que a amostra atinja o valor de umidade mínimo ( $n = 10$ ).

Na análise da germinabilidade em função do teor de água, a umidade inicial verificada na semente foi de 10,3% e no embrião de 25,3%, quando a porcentagem de germinação alcançou 97%. Após oito dias de dessecação, o teor de umidade das sementes foi estabilizado em torno de 3,4%, com germinação de 74%. O embrião seguiu um comportamento semelhante, tolerando um teor de umidade de 5,9% (Figura 2).

O babaçu apresentou uma percentagem de germinação superior a 80% quando a umidade estava em torno de 5% e este dado é um indicativo de que esta planta tem um comportamento ortodoxo com relação à tolerância à dessecação das sementes (Hong; Ellis, 1996).

#### Conservação *ex situ*

Os parâmetros fisiológicos analisados, relacionados à germinação, incluem o alongamento do pecíolo cotiledonar e do haustório, a formação de partes aéreas, a formação de raiz, a formação de plantas normais e a formação de estruturas anormais (Figura 3 e Tabela 1).

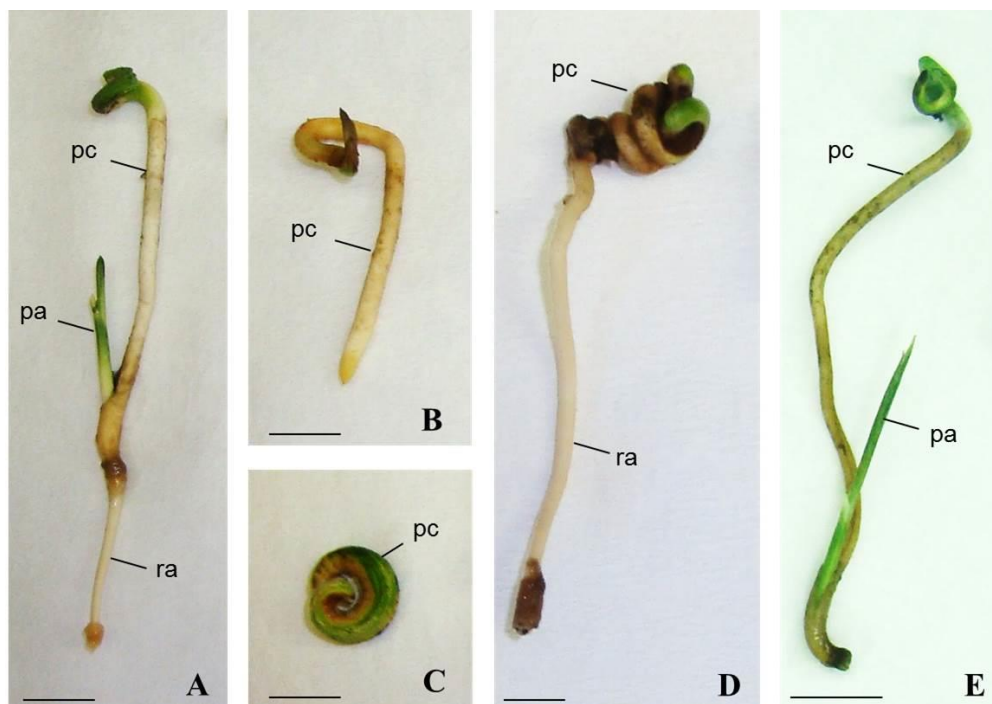


**Figura 2:** Germinação de embriões zigóticos de babaçu isolados e cultivados *in vitro* (barras, no eixo principal), até oito dias de dessecação em sílica gel, em função do teor de umidade das sementes (linha preta) e dos embriões (linha cinza). Médias de 30 amostras para germinação e de 20 amostras para teor de umidade.

A planta normal (Figura 3 A) apresenta pecíolo cotiledonar alongado com haustório na extremidade, a parte aérea ereta, emergindo da porção basal do pecíolo cotiledonar e raiz primária desenvolvida. Plântulas de crescimento anormal apresentam apenas crescimento do pecíolo normal (Figura 3 B) ou anormal (Figura 3 C), ou crescimento do pecíolo e da raiz apenas (Figura 3 D), ou crescimento do pecíolo e da parte aérea apenas (Figura 3 E).

Considerando-se o desenvolvimento do cotilédone como o principal evento relativo à germinação de babaçu (Neves et al., 2013, Leite et al., 2014), verificou-se que o material

conservado à temperatura de 25 °C apresentou taxas significativamente inferiores de germinação do que as demais temperaturas de conservação testadas, após 360 dias (Tabela 1). Em *Attalea speciosa*, a parte aérea se desenvolve antes da raiz e, nesse trabalho, pôde-se verificar diferenças entre as taxas de formação de parte aérea para os diferentes períodos de tempo de conservação, sendo que, de maneira geral, os maiores valores ocorreram nos materiais armazenados por 360 dias nas temperaturas de -20 °C e -196 °C (Tabela 1).



**Figura 3:** Plântulas de babaçu germinadas *in vitro* aos 2 meses, após 180 dias de conservação sob temperatura de 25 °C. A) planta normal, com parte aérea e raiz; B) apenas pecíolo do cotilédone germinado; C) desenvolvimento anormal do pecíolo do cotilédone, sem formação de parte aérea ou raiz; D) pecíolo do cotilédone germinado apenas com formação de raiz; E) pecíolo do cotilédone germinado apenas com formação de parte aérea. Notação: pa – parte aérea, pc – pecíolo cotiledonar, ra – raiz. Escala: 1 cm.

Comportamento semelhante à formação da parte aérea foi observado para formação de raiz, uma vez que as maiores taxas também foram observadas, de maneira geral, após 360 dias de conservação, independentemente da temperatura de conservação. Na comparação entre as temperaturas de armazenamento aos 360 dias verificou-se que as taxas de formação de raízes dos materiais mantidos a 6 °C, -20 °C e -196 °C foram significativamente superiores às de 25 °C. Nesta variável, a diferença entre 180 dias e 360 dias foi diferente apenas para o material conservado a -196 °C, não havendo, porém, diferenças significativas na formação de raízes entre os dois períodos para as demais temperaturas.

Do ponto de vista de germinação, a avaliação de plantas normais formadas (com parte aérea e raiz) é importante, pois apenas este tipo de planta pode ser aclimatizada. Neste sentido, verificou-se que foi nas temperaturas de -20°C e -196 °C que houve a maior formação de plantas normais após 360 dias de conservação (Tabela 1). A diferença entre 180 dias e 360 dias foi significativa apenas para o material conservado a -196 °C, embora, com exceção das sementes do tratamento controle (25 °C), todos os demais tratamentos tenham apresentado taxas significativamente superiores de formação de plantas normais quando comparados ao tempo inicial (0 dias) de cultivo. Adicionalmente, após o material ser conservado por 360 dias, as taxas de formação de plantas normais foram significativamente superiores quando originadas das sementes mantidas a -20 °C e -196 °C, sendo a menor taxa de formação de plantas normais ocorrida nas plantas do tratamento controle.

Estes resultados são importantes, pois indicam que a conservação de sementes a baixas temperaturas por longos períodos de tempo (180 ou 360 dias) pode garantir a formação de plantas viáveis e normais, passíveis de serem aclimatizadas (Figura 4).

**Tabela 1.** Efeito de diferentes temperaturas e períodos de tempo de conservação de sementes de babaçu sobre a germinação do embrião zigótico *in vitro*, em percentagem (%)

Temperatura de Conservação	Período de conservação (dias)		
	0	180	360
	Germinação (desenvolvimento do cotilédone) (%)*		
- 196 °C	83,3 ± 6,9 aA	73,3 ± 6,3 aA	90,0 ± 5,6 aA
- 20 °C	83,3 ± 6,9 aA	86,7 ± 6,9 aA	88,9 ± 5,8 aA
+ 6 °C	83,3 ± 6,9 aA	83,3 ± 7,8 aA	96,4 ± 3,5 aA
+ 25 °C	83,3 ± 6,9 aA	76,7 ± 8,2 aA	63,3 ± 8,9 bA
	Formação de parte aérea (%)*		
- 196 °C	43,3 ± 8,5 aB	60,0 ± 9,1 aB	76,7 ± 7,9 aA
- 20 °C	43,3 ± 8,5 aB	63,3 ± 8,9 aA	81,4 ± 7,2 aA
+ 6 °C	43,3 ± 8,5 aA	60,0 ± 9,1 aA	71,4 ± 8,4 bA
+ 25 °C	43,3 ± 8,5 aA	53,3 ± 9,3 aA	46,7 ± 9,3 bA
	Formação de raiz (%)*		
- 196 °C	20,0 ± 7,4 aC	53,3 ± 9,3 aB	80,0 ± 7,4 aA
- 20 °C	20,0 ± 7,4 aB	63,3 ± 9,2 aA	77,8 ± 7,7 aA
+ 6 °C	20,0 ± 7,4 aB	56,7 ± 8,9 aA	71,4 ± 8,4 aA
+ 25 °C	20,0 ± 7,4 aB	56,7 ± 9,2 aA	40,0 ± 9,1 bA
	Formação de plantas normais (%)*		
- 196 °C	20,0 ± 7,4 aC	50,0 ± 9,3 aB	76,7 ± 7,9 aA
- 20 °C	20,0 ± 7,4 aB	60,0 ± 9,1 aA	74,1 ± 8,2 aA
+ 6 °C	20,0 ± 7,4 aB	50,0 ± 9,3 aA	57,1 ± 9,2 bA
+ 25 °C	20,0 ± 7,4 aA	46,7 ± 9,3 aA	36,7 ± 8,9 bA
	Anormalidade (%)		
- 196 °C	10,0 ± 5,6	3,3 ± 3,3	3,3 ± 3,3
- 20 °C	10,0 ± 5,6	3,3 ± 3,3	0,0 ± 0,0
+ 6 °C	10,0 ± 5,6	3,3 ± 3,3	7,1 ± 4,8
+ 25 °C	10,0 ± 5,6	6,7 ± 4,6	10,0 ± 5,6

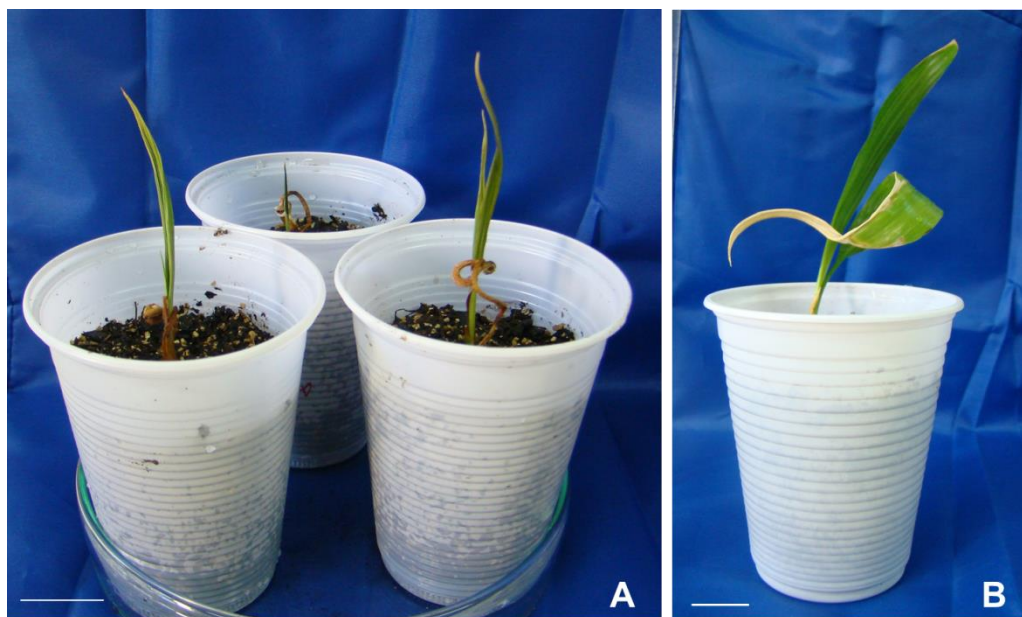
Os valores representam a média de 30 repetições ± o erro padrão da média. Diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott com  $P \leq 0,05$  são indicadas por \* e identificadas por letras. Letras maiúsculas comparam tempos dentro de uma mesma condição de temperatura e letras minúsculas comparam temperaturas dentro de um mesmo período de tempo.

As taxas de anormalidade (malformação) das plantas regeneradas não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 1), o que indica que os métodos de conservação testados não apresentaram efeito negativo sobre o desenvolvimento normal das plântulas durante a germinação.

Embora tenha havido poucas diferenças nas percentagens de germinação para os diferentes períodos de tempo e temperaturas, verificaram-se diferenças significativas nos parâmetros morfológicos avaliados, relacionados ao crescimento do cotilédone, da parte aérea e da raiz primária (Figura 5). Assim, diferenças significativas foram observadas no comprimento do cotilédone (haustório + pecíolo cotiledonar), que apresentou valores maiores para plântulas regeneradas de sementes conservadas nas temperaturas de -20 °C e 6 °C, após 180, sendo que aos 360 dias, somente as plantas do tratamento controle é que apresentaram valores significativamente inferiores aos demais tratamentos de conservação (Figura 5 A).

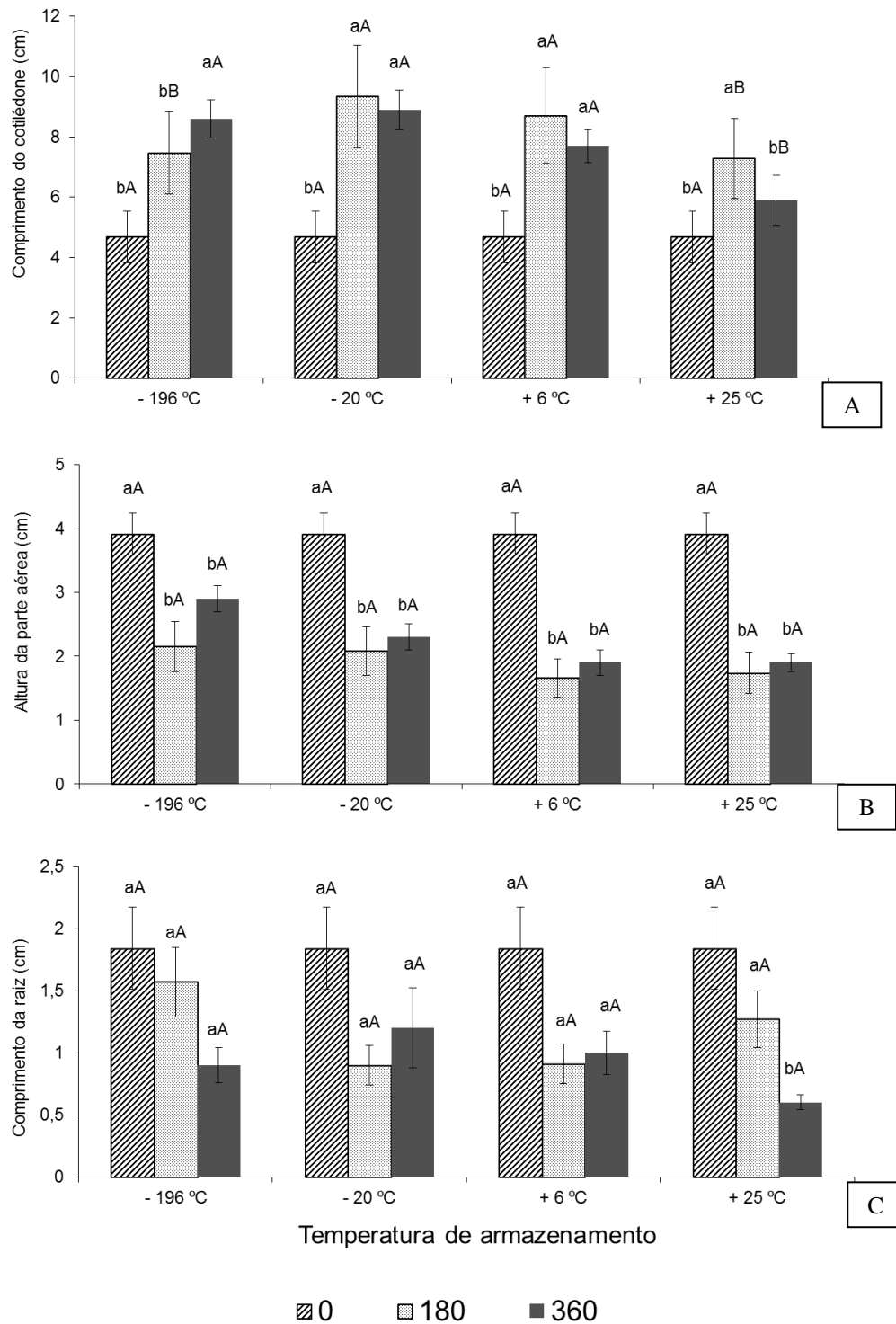
Quando foi avaliada a altura da parte aérea das plantas, de maneira geral, os valores foram significativamente maiores nas plantas originadas de sementes do tratamento controle, não sendo observado diferenças significativas para esta variável nas plantas dos demais tratamentos (Figura 5 B).

Quanto ao comprimento das raízes formadas nas plantas regeneradas, com exceção das plantas do tratamento controle aos 360 dias, embora as médias para os tempos iniciais tenham apresentado valores ligeiramente superiores (Figura 5 C). Esses resultados corroboram com a hipótese de que a temperatura de 25 °C não é adequada para a conservação de sementes de babaçu.



**Figura 4:** Plantas de babaçu aclimatizadas após a conservação e germinação *in vitro*. A) plantas obtida de sementes conservadas por 360 dias, a 6 °C, com 7 meses de idade, transplantadas há um mês. B) planta obtida de semente conservada por 180 dias a -196 °C, com 9 meses de idade, transplantada há 3 meses. Escala: 2 cm.





**Figura 5:** Medidas das estruturas formadas durante a germinação in vitro de embriões zigóticos de babaçu: cotilédone, parte aérea e raiz, após a conservação das sementes em diferentes períodos de tempo (0, 180 e 360 dias) e temperaturas (-196 °C, -20 °C, 6 °C e 25 °C), após 4 meses de cultivo. As letras minúsculas comparam os períodos de tempo para uma mesma temperatura, as letras maiúsculas comparam temperaturas para um mesmo período de tempo; médias seguidas por letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5%. Os valores representam a média de 30 repetições  $\pm$  o erro padrão da média (barras).

## Discussão

As espécies de palmeiras crescem em uma grande variedade de ambientes em regiões tropicais e semitropicais, o que resulta em variações significativas no comportamento de armazenamento de suas sementes (Ribeiro et al., 2012).

As sementes de *Attalea speciosa* não perdem a viabilidade após terem sua umidade reduzida para menos de 5%, dados confirmados também por Silva et al. (2012) e, além disso, podem ser conservadas a baixas temperaturas, 6 °C, -20 °C ou -196 °C por longos períodos de tempo (360 dias), o que caracteriza um comportamento de armazenamento ortodoxo.

*Attalea speciosa* está entre as mais de 92% de espécies vegetais que apresentam comportamento de armazenamento ortodoxo (Long et al., 2015), cujas sementes podem ser estocadas em bancos de sementes convencionais (Hay; Probert, 2013). Neves et al. (2013) haviam determinado que as sementes de *Attalea vitrivir* podem ser estocadas dentro do fruto em condições de baixa umidade, não perdendo a sua viabilidade. O comportamento ortodoxo de sementes destas duas espécies de babaçu garante a sua permanência no banco de sementes do solo e está relacionado à sua ecologia como espécie pioneira (Tweddle et al., 2003).

Os dados obtidos são consistentes quando se considera a distribuição biogeográfica de *Attalea speciosa*, associada a fitofisionomias tropicais, como floresta amazônica e cerrado e não associada a matas inundáveis (Marimon; Lima, 2001). De modo geral, os frutos e as sementes desta planta permanecem por um tempo prolongado no solo antes de germinarem, além disso, diversos autores incluem espécies de *Attalea* entre espécies pioneiras em áreas perturbadas (Tweddle et al., 2003; Salm, 2004). O seu padrão de germinação peculiar, no qual ocorre o desenvolvimento de uma plântula remota-tubular, com o crescimento de um caule subterrâneo geotrópico positivo, antes da emergência do caule superficial, garante que o eixo vegetativo fique protegido ao ser mantido profundamente enterrado no solo (Neves et al., 2013). A resistência dos caules subterrâneos, que não são facilmente destruídos pelo fogo (Salm, 2004) e a abundância de reservas do endosperma permitem que as plantas jovens sobrevivam durante um longo período de tempo abaixo do nível do solo, apesar dos diversos distúrbios, como as queimadas (Neves et al., 2013).

Outras espécies do mesmo gênero, *Attala cohune* (sin. *Orbygnia cohune*) e *A. crassipatha*, que ocorrem em florestas tropicais úmidas da América Central, apresentaram comportamentos recalcitrante e intermediário, respectivamente, embora os resultados para *A. crassipatha* não tenham sido conclusivos (Dickie et al., 1992).

Este comportamento do babaçu difere de outras palmeiras de interesse comercial, como *Cocos nucifera*, que apresenta comportamento recalcitrante (N'nan et al., 2012), *Elaeis guineensis*, (Engelmann et al., 1995) e *Phoenix dactylifera*, de comportamento intermediário (Ngobese et al., 2010). Para estas espécies, a alternativa de conservação de genótipos, em longo prazo, tem sido a criopreservação de embriões zigóticos (Engelmann, 2004; Engelmann; Dussert, 2013).

Estes dados confirmam que, para as palmeiras, os fatores ecológicos têm maior importância na determinação do comportamento de armazenamento de sementes do que os fatores filogenéticos.

## **Conclusão**

O babaçu (*Attalea speciosa*) apresenta germinação de embriões zigóticos superior a 80% quando a umidade das sementes está em torno de 5% e esta taxa se mantém alta após conservação por até 360 dias nas temperaturas 6 °C, -20 °C ou -196 °C.

Os resultados da conservação variam em função do critério de germinação escolhido. Neste trabalho, quando a germinação é avaliada pelo critério do desenvolvimento do cotilédone, critério normalmente utilizado por outros autores, verifica-se uma queda significativa nas taxas de germinação dos materiais usados como tratamento controle, ou seja, aqueles mantidos na temperatura de 25 °C, após 360 dias.

Quanto à formação das demais estruturas, de modo geral, o desenvolvimento da parte aérea das plantas regeneradas é favorecido por temperaturas negativas (-20 °C e -196 °C), o mesmo acontecendo para as raízes, em detrimento daquelas plantas obtidas de sementes mantidas na temperatura de 25 °C. Assim, a formação de plantas normais é favorecida quando plantas são regeneradas de sementes conservadas a -20 °C e -196 °C. Estes resultados indicam que as sementes de babaçu não apenas toleram o armazenamento a temperaturas baixas, como em alguns casos, são beneficiadas por estes.

Os resultados desse trabalho sugerem que, por tolerar dessecação abaixo de 5% e por tolerar a conservação a baixas temperaturas (-20 °C e -196 °C), situações nas quais não há redução nas taxas de germinação, as sementes de *Attalea speciosa* apresentem um comportamento de armazenamento ortodoxo.

## Referências Bibliográficas

- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, 101(2): 213-228, 2008.
- BEWLEY, J. D., BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press; 1994.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regras para análise de sementes**. BRASÍLIA: MAPA/ACS, 2009, 399 p.
- CROMARTY, A.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **The Design of Seed Storage Facilities for Genetic Conservation**, International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 1982.
- DICKIE, J. B., BALICK, M. J.; LININGTON, I. M. Experimental investigations into the feasibility of ex situ preservation of palm seeds; an alternative strategy for biological conservation of this economically important plant family. **Biodiversity and Conservation**, 1:112-119, 1992.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, 41: 1167-1174, 1990.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 40: 427–433, 2004.
- ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUSSERT, S.; DUVAL, Y. Cryopreservation of zygotic embryos and kernels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) **Seed Science Research**, 5(02): 81-86, 1995.
- ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Cryopreservation. In: NORMAH, M.N. et al. (eds.), **Conservation of Tropical Plant Species**. Springer, New York, 2013, p. 107-119.
- FAPEPI - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí. O Potencial do babaçu. **Sapiência**, Teresina, 24 (ano VI): 4, 2010.
- FAVA, W; S; COVRE, W. S.; SIGRIST, M. R. *Attalea phalerata* and *Bactris glaucescens* (Arecaceae, Arecoideae): Phenology and pollination ecology in the Pantanal, Brazil. **Flora**, 206: 575–584, 2011.
- FERRARI, R. A.; SOLER, M. P. Obtention and characterization of coconut babassu derivatives. **Scientia Agricola**, 72(4): 291-296, 2015.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), 35: 1039-1042, 2011.
- GEHLSSEN, C.A. Observações sobre o babassu (*Orbignya speciosa*) e sua germinação - a germinação da oiticica. **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio de Pernambuco**. Recife, Brazil, 2:428-433, 1937.

GOVAERTS, R., DRANSFIELD, J., ZONA, S.F, HODEL, D.R.; HENDERSON, A. **World Checklist of Arecaceae**. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2011. Disponível em <http://apps.kew.org/wcsp/> Acesso em 22 mar 2012.

HAWKES, J. G.; MAXTED, N.; FORD-LLOYD, B.V. **The Ex Situ Conservation of Plant Genetic Resources** Springer, Dordrecht, 2000, 250 p.

HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, 1: 1-11, 2013.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behavior. In: ENGELS, M.M.; Toll, J. (eds) **IPGRI Technical Bulletin** N. 1. J. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 1996.

KERMODE, A. R.; FINCH-SAVAGE, B. E. Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (eds) Desiccation and survival in plants: Drying without dying. **CABI Publishing**, Oxon UK, p. 149-184, 2002.

LEITE, M. S.; SILVA, F. G.; PEREIRA, F. D.; ALBERTO, P. S.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. D. In vitro germination of babassu: influence of growth regulators in zygotic embryos. **Acta Scientiarum**. Agronomy, 36(4): 449-456, 2014.

LEITMAN, P.; SOARES, K.; HENDERSON, A.; NOBLICK, L.; MARTINS, R.C. *Arecaceae* In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Ed. 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15686>>. Acesso em 01 Dez. 2015 .

LIMA, J. R. DE O. et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, 30(3): 600-603, 2007.

LONG, R. L.; GORECKI, M. J.; RENTON, M. et al. The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. **Biological Reviews**, 90: 31–59, 2015.

LORENZI, H. KAHN, F.; NOBLICK, L. R.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira: Arecaceae**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010.

LUIS, Z. G.; BEZERRA, K. M. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Adaptability and leaf anatomical features in oil palm seedlings produced by embryo rescue and pre-germinated seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 22(3): 209-215, 2010.

MACIEL, S. A.; FERMINO JR., P. C. P.; SILVA, R. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, 32(2): 263-267, 2010.

MARIMON, B. S.; LIMA, E. S. Caracterização fitofisionômica e levantamento florístico preliminar no Pantanal dos Rios Mortes-Araguaia, Cocalinho, Mato Grosso, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**. 15(2): 213-229, 2001.

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

N'NAN, O., BORGES, M., KONAN, J. L. K. et al. A simple protocol for cryopreservation of zygotic embryos of ten accessions of coconut (*Cocos nucifera* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 48(2): 160-166, 2012.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; CUNHA, I. R. G.; PIMENTA, M. A. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N. Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*). **Flora** 208: 68-78, 2013.

NGOBESE, N. Z., PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Cryopreservation of the embryonic axes of *Phoenix reclinata*, a representative of the intermediate seed category. **Seed Science and Technology**, 38(3): 704-716, 2010.

RAO, N. K. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology** 3(2): 136-145, 2004.

REED, B. M.; GUPTA, S.; UCHENDU, E. E. In Vitro Genebanks for Preserving Tropical Biodiversity in: NORMAH, M.N. et al. (eds.), **Conservation of Tropical Plant Species**. Springer, New York, p 77-106, 2013. DOI 10.1007/978-1-4614-3776-5\_5

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, D. M. T.; GARCIA, Q. S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. **Trees**, 26:851–863, 2012. DOI 10.1007/s00468-011-0659-2

ROBERTS, E.H. (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1:499-514.

ROYAL BOTANIC GARDENS KEW. **Seed Information Database (SID)**. Version 7.1., 2015. Disponível em: <http://data.kew.org/sid/> Acesso em 12 fev 2015.

SALEH, E. O. L.; SATHLER, F.; ARCHETI, R.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Protocolo para o resgate e germinação *in vitro* de embriões zigóticos de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng). **Livro de Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, UFLA, Poços de Caldas-MG, p. 297, 2013.

SALM, R. Tree species diversity in a seasonally-dry forest: the case of the Pinkaití site, in he Kayapó Indigenous Area, southeastern limits of the Amazon. **Acta Amazonica**, 34(3): 435 – 443, 2004.

SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ, V. M. Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. **Agronomía mesoamericana**, 21(1): 193-205, 2010.

SILVA, M. V. V. DA; SALES, J. DE F.; SILVA, F. G.; RUBIO NETO, A.; ALBERTO, P. S.; PEREIRA, F. D. The influence of moisture on the *in vitro* embryo germination and morphogenesis of babassu (*Orbignya phalerata* Mart.) **Acta Scientiarum Agronomy Maringá**, 34(4): 453-458, 2012.

SOUZA, M. H. S. L. et al. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 133: 1–5, 2011.

TROPICOS Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em <http://www.tropicos.org> Acesso em 13 Apr 2012.

TWEDDLE, J. C.; DICKIE, J. B.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. **Journal of Ecology**, 91(2): 294-304, 2003.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, 242: 397–406, 2015. DOI 10.1007/s00425-015-2312-6

WANG, Y. L.; FAN, M. J.; LIAW, S. L. Cryopreservation of *in vitro*–grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Botanical Bulletin of the Academia Sinica**, 46: 29-34, 2005.

WCSP - **World Checklist of Selected Plant Families**. Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-17840>> Acesso em 06 nov. 2011.