



**DIVERSIDADE GENÉTICA, GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO**  
*EX SITU DE *Euterpe precatoria* Mart. (ARECACEAE)*

**CHEILA DEISY FERREIRA**

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA**  
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO**  
***EX SITU DE *Euterpe precatoria* Mart. (ARECACEAE)***

**CHEILA DEISY FERREIRA**

**Orientador:** Prof. Dr. Anderson Marcos de Souza

**Coorientador:** Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade de Brasília - UnB, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Florestais.

**BRASÍLIA - DF**  
**FEVEREIRO DE 2019**

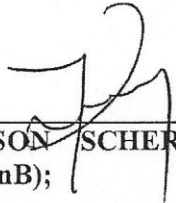
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

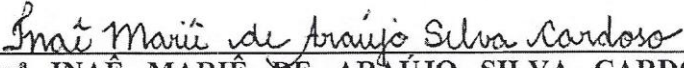
“DIVERSIDADE GENÉTICA, GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX-SITU*  
DE *Euterpe precatoria* MART. (ARECACEAE)”

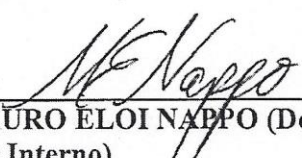
**CHEILA DEISY FERREIRA**

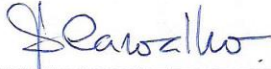
TESE DE DOUTORADO ACADÊMICO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, DO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL, DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

APROVADA POR:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. JONNY EVERSON SCHERWINSKI PEREIRA (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB);  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª INAÊ MARIÊ DE ARAÚJO SILVA CARDOSO (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB);  
(Examinadora Interna)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. MAURO ELOI NAPPO (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB);  
(Examinador Interno)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª DULCINEIA DE CARVALHO (Universidade Federal de Lavras – ULFA);  
(Examinadora Externa)

\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª ALBA VALÉRIA REZENDE (Departamento de Engenharia Florestal – EFL/UnB).  
(Examinadora Suplente)

Brasília-DF, 05 de fevereiro de 2019.

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

FF383d Ferreira, Cheila Deisy  
Diversidade genética, germinação e conservação ex-situ de  
Euterpe precatoria Mart. (Arecaceae) / Cheila Deisy  
Ferreira; orientador Anderson Marcos Souza; co-orientador  
Jonny Everson Sherwinski-Pereira. -- Brasília, 2019.  
165 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Florestais) --  
Universidade de Brasília, 2019.

1. conservação genética. 2. marcadores moleculares. 3.  
germinação de sementes. 4. espécies recalcitrantes. 5.  
conservação de sementes. I. Souza, Anderson Marcos, orient.  
II. Sherwinski-Pereira, Jonny Everson, co-orient. III.  
Título.

*Ofereço*

*Aos meus pais, Cherly e José Francisco, com todo meu amor*

*Aos meus irmãos, Júnior e Gabriel*

*Aos meus sobrinhos, Brayan, Miguel e João Eduardo*

*Ao meu amado marido, Chico, meu presente de Deus*

*Dedico*

*À minha filha, Sophia, meu milagre de Deus. Mesmo ainda tão pequena deu um novo sentido à minha vida. Com certeza, esse momento não seria tão especial sem você. Te amo!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus por ter me força e coragem para enfrentar essa etapa tão difícil em minha vida, e por ter me dado uma segunda chance de viver para ver minha filha crescer.

À toda minha família, meus pais Cherly e José Francisco, meus irmãos Júnior e Gariel, meus sobrinhos, avós, tios, primos, meu amado marido Chico e minha filha querida Sophia, vocês são tudo pra mim, é por vocês que luto a cada dia. A minha sogra Cileide, por ter cuidado tão bem da minha filha quando precisei me ausentar em busca desse sonho. Obrigada!

Ao meu orientador, Anderson Marcos de Souza, pelas palavras de incentivo e por não ter me deixado desistir diante das dificuldades. Ao meu coorientador Jonny Everson Scherwinski-Pereira, por ter aberto as portas do seu laboratório, me orientou, me ajudou, teve muita paciência, financiou essa pesquisa. Não tenho palavras pra agradecer, como já te falei, foi Deus que te colocou em meu caminho.

A todos os estudantes do Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT II), que me acolheram e ajudaram, e nos tornamos amigos. Mas tenho um agradecimento especial, a Jéssica, Inaê e Rennan, vocês foram muito importantes para que esse sonho se tornasse possível, eu espero ser para alguém um pouco do que foram e são pra mim. EU NÃO TERIA CONSEGUIDO SEM VOCÊS!!

Aos analistas, André Xavier de Souza e Ana Cristina Gomes, por sempre estarem dispostos a me ajudar e ensinar.

Ao professor da UFAC, Frederico Henrique da Silva Costa, por ter auxiliado toda parte de coleta de campo, e pela disponibilidade no fornecimento de material vegetal sempre que foi necessário.

À UnB (Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais) e EMBRAPA CENARGEN, instituições que forneceram todo suporte necessário para realização desta pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	5
2. REVISÃO BIBLOGRÁFICA .....	8
2.1 <i>Euterpe precatoria</i> Mart.....	8
2.2 Conservação dos recursos genéticos .....	12
2.2.1 Conservação <i>ex situ</i> .....	13
2.2.2 Conservação <i>in situ</i> .....	15
2.2.3 Conservação <i>on farm</i> .....	16
2.3 Marcadores Moleculares.....	17
2.3.1 <i>ISSR (Inter-simple Sequence Repeats)</i> .....	19
2.4. Conservação de sementes .....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
CAPÍTULO I .....	33
DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE <i>Euterpe precatoria</i> Mart. EM POPULAÇÕES NATURAIS NA AMAZÔNIA POR MARCADORES <i>ISSR</i> .....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Local de coleta de material vegetal .....	36
2.2 Extração do DNA .....	37
2.3 Amplificação do DNA extraído.....	38
2.4 Análise dos dados pelo marcador <i>ISSR</i> .....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
3.1 Avaliação do Marcador Molecular <i>ISSR</i> .....	41
3.2 Diversidade Genética Populacional.....	44
3.3 Estrutura Genética Espacial.....	48
4. CONCLUSÕES .....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
CAPITULO II.....	57
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOMÉTRICA DE ESTRUTURAS REPRODUTIVAS E MORFOANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DO PROCESSO GERMINATIVO DE <i>Euterpe precatoria</i> Mart. ....	57
1. INTRODUÇÃO.....	58
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
3.1 Caracterização morfológica e biométrica de estruturas reprodutivas de <i>Euterpe precatoria</i> Mart. ....	64
3.2 Caracterização anatômica e histoquímica de embriões zigóticos de <i>Euterpe precatoria</i> Mart. ....	68
3.3 Caracterização morfoanatômica e histoquímica do processo germinativo de <i>Euterpe precatoria</i> Mart. ....	73
4. CONCLUSÕES .....	96
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
CAPÍTULO III .....	104
DESSECAÇÃO E CONSERVAÇÃO <i>EX SITU</i> DE SEMENTES DE <i>Euterpe precatoria</i> Mart. - ARECACEAE.....	104
1. INTRODUÇÃO.....	105
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	108
2.1 Local de coleta e beneficiamentos dos frutos .....	108
2.2 Efeito da dessecação na germinação convencional e <i>in vitro</i> .....	108
2.3 Conservação de sementes e criopreservação de embriões zigóticos .....	110
2.4 Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões zigóticos .....	111
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	113
3.1 Tolerância à dessecação de sementes .....	113
3.2 Conservação de sementes e embriões zigóticos .....	120
3.3 Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos .....	124
4. CONCLUSÕES .....	139
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	140



## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Euterpe precatoria* Mart. EM POPULAÇÕES NATURAIS NA AMAZÔNIA POR MARCADORES ISSR**

**TABELA 1.** Caracterização de climática e revelo dos municípios nos quais estão localizadas as populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart. em estudo 37

**TABELA 2.** *Primers* ISSR, sequência de nucleotídeos, número de fragmentos amplificados (locos), PIC (conteúdo de informações polimórficas), porcentagem de fragmentos amplificados e amplitude dos fragmentos (pb = pares de base) 41

**TABELA 3.** Distribuição da diversidade genética de três populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart. no Estado do Acre, a partir de marcadores ISSR 44

**TABELA 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) para dois níveis hierárquicos de três populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart. no Estado do Acre, Brasil 46

### **CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOMÉTRICA DE ESTRUTURAS REPRODUTIVAS E MORFOANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DO PROCESSO GERMINATIVO DE *Euterpe precatoria* Mart.**

**TABELA 1.** Estatística descritiva da caracterização biométrica de frutos e sementes de *Euterpe precatoria* Mart., coletadas no Estado do Acre, Brasil 65

### **CAPÍTULO III: DESSECAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE SEMENTES DE *Euterpe precatoria* Mart. - ARECACEAE**

**TABELA 1.** Comportamento de sementes e embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. em virtude da dessecação artificial de sementes 114

**TABELA 2.** Valores médios de percentual de germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Euterpe precatoria* Mart. com diferentes teores de umidade submetidas a variadas condições de armazenamento 121

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**FIGURA 1.** Aspecto geral de *Euterpe precatoria* Mart.. A: Plantas em habitat natural. B: Planta com cacho de frutos maduros. C: Planta completa isolada. D: Frutos imaturos. E: Frutos maduros. F: Sementes com fibras mesocárpicas. G: Semente cortada longitudinalmente com endosperma e embrião zigótico. H: Embrião zigótico extraído da semente. I: Embrião zigótico com indícios de germinação (intumescimento das regiões proximal e distal). J: Germinação da semente, com emissão da raiz e lígula (parte aérea). K: Plântula completa germinada *in vitro*. 9

### CAPÍTULO I: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Euterpe precatoria* Mart. EM POPULAÇÕES NATURAIS NA AMAZÔNIA POR MARCADORES ISSR

**FIGURA 1.** Localização das populações estudadas, mapa do Brasil com ênfase no Estado do Acre e localização nos municípios. 36

**FIGURA 2.** Perfil de fragmentos ISSR provenientes das ampliações dos *primers* 9 ps e 35 zm de *Euterpe precatoria* Mart. em três populações naturais do Estado do Acre. A- Primer 9 ps para 32 indivíduos da população 1 (Plácido de Castro); B- Primer 9 ps para 32 indivíduos da população 2 (Xapuri); C- Primer 9 ps para 32 indivíduos da população 3 (Feijó); D- Primer 35 zm para 32 indivíduos da população 1 (Plácido de Castro); E- Primer 35 zm para 32 indivíduos da população 2 (Xapuri); F-Primer 35 zm para 32 indivíduos da população 3 (Feijó). M – Marcador 43

**FIGURA 3.** Padrões totais de bandas para as três populações de *Euterpe precatoria* Mart., considerando o número total de bandas polimórficas e índice de diversidade de Nei. 47

**FIGURA 4.** Análise de coordenadas principais dos 96 indivíduos de *Euterpe precatoria* Mart. de três populações naturais no Estado do Acre, por meio dos marcadores moleculares ISSR. 48

**FIGURA 5.** Correlograma para o coeficiente de coancestria para classes de distância entre os indivíduos de três populações de *Euterpe precatoria* Mart., com intervalo de confiança a 95% de probabilidade. A - população 1 (Plácido de Castro); B - população 2 (Xapuri); C - população 3 (Feijó). 49

### CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOMÉTRICA DE ESTRUTURAS REPRODUTIVAS E MORFOANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DO PROCESSO GERMINATIVO DE *Euterpe precatoria* Mart.

**FIGURA 1.** Caracterização morfológica de frutos e diásporos de *Euterpe precatoria* Mart. A: Frutos verdes. B: Fruto maduro; detalhe do estigma (lateral). 64

C: Corte longitudinal do fruto maduro com semente e embrião zigótico inserido perifericamente; observar fibras mesocárpicas, endocarpo e as regiões proximal e distal do embrião zigótico. D: Semente com fibras mesocárpicas. E: Semente mostrando o endocarpo. F: Corte longitudinal da semente. G: Tegumento com estrias endocárpicas (seta). H: Vista frontal da semente; notar hilo, hafe e poro germinativo. I: Detalhe do poro germinativo aberto. Abreviações: (ec) endocarpo, (end) endosperma, (et) estigma, (ex) exocarpo, (ez) embrião zigótico, (fm) fibras mesocárpicas, (h) hilo, (op) opérculo, (pg) poro germinativo, (pr) perianto, (rd) região distal, (rf) rafe, (rp) região proximal e (tg) tegumento. Barras: B-F = 2mm.

**FIGURA 2.** Frequências (%) em intervalos de classes do diâmetro de frutos (A), comprimento de frutos (B), diâmetro de sementes (C) e comprimento de sementes de *Euterpe precatoria* Mart., coletadas no Estado do Acre, Brasil.

66

**FIGURA 3.** Anatomia de embrião zigótico de açaí solteiro (*Euterpe precatoria*) A: Secção longitudinal do embrião zigótico (A1-A6: secções transversais); B: Plúmula. C: Detalhes da lígula, fenda cotiledonar e cavidade cotiledonar. D: Detalhe da protoderme e meristema fundamental. E: Detalhe do procâmbio (corte transversal); F: Idioblastos com ráfides. G: Compostos fenólicos. Abreviações: (cc) cavidade cotiledonar, (cf) composto fenólico, (ee) eixo embrionário, (fc) fenda cotiledonar, (id) idioblasto, (inv) invaginação, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar, (pmr) promeristema radicular e (pt) protoderme. Barras = A: 500 µm; B: 200 µm e C-G: 50 µm.

69

**FIGURA 4.** Histoquímica de embrião zigótico *Euterpe precatoria* Mart.. A: Corpos proteicos em células do cotilédone, conforme reação positiva com *Xylidine Ponceau*. B: Corpos proteicos em células adjacentes aos cordões procambiais (seta). C: Corpos proteicos visualizados nas proximidades da plúmula (detalhe em quadrado lateral). D: Grãos de amidos corados com Lugol em células da plúmula e em células próximas a plúmula (seta). E: Polissacarídeos corados com *Periodic Acid Schiff* em células próximas a plúmula (seta); prováveis grãos de amido. F: Prováveis grãos de amido em células do cotilédone – extremidade distal (seta). G: Corpos lipídicos em células do cotilédone coradas com Sudan III. Abreviações: (cf) composto fenólico (cp) corpo proteico, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio e (pl) plúmula. Barras = A, C: 200 µm; B-F: 50 µm e G: 20 µm.

72

**FIGURA 5.** Prancha da evolução morfológica do processo germinativo de *Euterpe precatoria* Mart. por 80 dias em vermiculita. A: Embrião zigótico inserido perifericamente dentro do endosperma. B: Levantamento do opérculo e exposição da região proximal aos 10 dias. C: Formação do botão germinativo aos 15 dias; observar no embrião lateral o arroxamento do ponto de saída da raiz (retângulo) e linha limítrofe entre a região proximal e o pecíolo cotiledonar (seta). D, E: Protusão da raiz e lígula aos 20 dias. F: Emissão do primeiro catafilo aos 30 dias. G: Emissão do segundo catafilo e surgimento da raiz adventícia aos 40 dias. H: Desenvolvimento do segundo catafilo, do haustório e das raízes aos 60 dias. I: Heterogeneidade do processo germinativo aos 60 dias. J: Eófilo esverdeado aos 80 dias. Abreviações: (bg) botão germinativo, (ct) catafilo, (e) eófilo, (end) endosperma, (ez) embrião zigótico, (ha) haustório, (op) opérculo, (li) lígula, (pct) pecíolo cotiledonar, (ra) raiz adventícia, (rp) raiz primária e (rs) raiz secundária.

75

Barras: H, I = 10 mm, A-G, J = 2mm e B-D (embriões laterais) = 1mm.

**FIGURA 6.** Comprimento (A) e diâmetro (B) médio (mm) de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. no período de 2 a 15 dias após semeadura. 76

**FIGURA 7.** Comprimento (A) e diâmetro (B) médio (mm) de diferentes estruturas de plântulas de *Euterpe precatoria* Mart. no período de 20 a 60 dias após semeadura. 78

**FIGURA 8.** Percentual de germinação de sementes em função dos dias após semeadura de *Euterpe precatoria* Mart. em vermiculita. Critério de germinação: emissão de raiz e lígula. 79

**FIGURA 9.** Aspectos anatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. observados aos 4 (A-D) e 8 dias (E-K) de cultivo em vermiculita. A: Embrião zigótico. B: Secção longitudinal de embrião zigótico. C: Plúmula com dois catafilos em desenvolvimento e surgimento do eófilo. D: Detalhe do eófilo e promeristema caulinar. E: Eixo hipocótilo-radícula com princípio de diferenciação de parênquima. F: Células da região haustorial em divisão celular; notar matriz polissacarídica (quadrado lateral – reação com *Periodic Acid Schiff*, PAS). G: Células parenquimáticas haustorias em divisão celular; observar espaços intercelulares (quadrado). H: Início de consumo de reservas proteicas nas proximidades da plúmula, conforme corante *Xylidine Ponceau*. I: Grãos de amido na plúmula e suas vizinhanças corados com Lugol e PAS (retângulo lateral). J: Grãos de amido corados com PAS em células parenquimáticas do haustório próximas a cordões procambiais. Abreviações: (ct) catafilo, (e) eófilo, (ha) haustório, (hr) eixo hipocótilo-radícula, (id) idioblasto, (li) lígula, (pa) parênquima, (pc) procâmbio, (pl) plúmula e (pmc) promeristema caulinar. Barras: A, B = 500 µm; I: 200 µm; C, F, H: 100 µm e D, G, J: 50 µm. 81

**FIGURA 10.** Aspectos anatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart. observados aos 15 dias de cultivo em vermiculita. A: Embrião zigótico com região proximal intumescida e haustorial alongada; observar marcação entre região proximal e início do pecíolo cotiledonar. B: Secção longitudinal do embrião zigótico especificado na letra A; observar marcação anteriormente mencionada. C, D: Lígula, catafilos e eófilo em expansão; secção longitudinal e transversal, respectivamente. E: Detalhe do primeiro eófilo. F: Emissão de raiz; notar a capa radicular rica em compostos fenólicos e idioblastos alongados. G: Raiz secundária em formação. H: Diferenciação vascular na região haustorial. I: Detalhe de células parenquimáticas na região proximal. J: Células do haustório desprovidas de conteúdo proteico, de acordo com corante *Xylidine Ponceau*. K: Haustório com inúmeros grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff*, PAS (detalhe lateral). L: Grãos de amido corados com Lugol na raiz. M: Grãos de amido corados com PAS nos catafilos. Abreviações: (cr) capa da raiz, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ha) haustório, (ev) elemento de vaso, (id) idioblasto, (li) lígula, (pa) parênquima, (pc) procâmbio, (pmc) promeristema caulinar, (r) raiz primária e (rs) raiz secundária. Barras: A, B, K = 500 µm; C, D, F, G, I = 200 µm e E, H, J, L, M = 50 µm. 83

**FIGURA 11.** Aspectos anatômicos e histoquímicos de plântulas de *Euterpe precatoria* Mart. observados aos 20 dias de cultivo em vermiculita. A: Plântula; notar raiz e lígula. B: Secção longitudinal da plântula da letra A; observar expansão da lígula, catafilos e eófilo e emissão da raiz primária com idioblastos (cabeça de seta). C: Detalhe do meristema apical com eófilo em crescimento. D: Raiz secundária em formação. E: Plântula com lígula e raiz desenvolvidos. F: Secção longitudinal da plântula da letra D; notar expansão da lígula com feixes vasculares em diferenciação (seta), raiz primária (detalhe na lateral), raiz secundária, início de raiz adventícia, diferenciação vascular no pecíolo cotiledonar (retângulos), idioblastos (cabeças de setas) e compostos fenólicos. G: Pecíolo cotiledonar com conspícuos grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff*. H: Grãos de amido corados com Lugol nos primórdios foliares e suas proximidades. I: Grãos de amido na plúmula e suas vizinhanças corados com Lugol. Abreviações: (cr) capa da raiz, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ha) haustório, (li) lígula, (pc) procâmbio, (pct) pecíolo cotiledonar, (pmc) promeristema caulinar, (ra) raiz adventícia, (rp) raiz primária e (rs) raiz secundária. Barras: A = 2 mm; E = 1mm; B, D, F = 500 µm; C = 250 µm; I = 200 µm e G, H = 50 µm.

87

**FIGURA 12.** Aspectos anatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. observados aos 30 dias de cultivo em vermiculita. A: Plântula; notar catafilo exposto. B: Secção longitudinal da plântula da letra A; observar folíolos em crescimento e raiz adventícia. C: Extremidade distal do catafilo com fibras e compostos fenólicos. D: Lígulas e catafilos; observar fileira de compostos fenólicos. E: Catafilo com fibras próximas aos feixes vasculares em diferenciação; notar estômato (quadrado). F: Raiz principal, secundária e adventícia. G: Detalhe de raiz adventícia. H: Haustório com camada polissacarídica lateral (seta) e células em divisão (retângulo lateral). I: Células do haustório com grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol (retângulo lateral); observar camada polissacarídica. J: Grãos de amido corados com Lugol nos primórdios foliares e suas proximidades; detalhe lateral de estômato com grãos de amido corados com PAS. K: Detalhe de células parenquimáticas do catafilo com grãos de amido corados com PAS. Abreviações: (cr) capa da raiz, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ep) epiderme, (est) estômato, (ev) elementos vasculares, (f) folíolo, (fi) fibra, (fv) feixe vascular, (ha) haustório, (id) idioblasto, (li) lígula, (pc) procâmbio, (pct) pecíolo cotiledonar, (pmc) promeristema caulinar, (ra) raiz adventícia, (rp) raiz primária e (rs) raiz secundária. Barras: A = 2 mm; B, H, F = 500 µm; C, D, E, G, I, J = 200 µm e K = 50 µm.

90

**FIGURA 13.** Aspectos anatômicos e histoquímicos do haustório e segmento foliar de plântula de *Euterpe precatoria* Mart. aos 60 dias de cultivo em vermiculita. A: Haustório. B: Secção longitudinal do haustório. C: Detalhe de feixe vascular da região haustorial. D: Detalhe da região periférica do haustório (seta apontando matriz polissacarídica). E: Pecíolo cotiledonar. F: Segmento foliar. G: Secção transversal do segmento foliar. H: Segmento foliar caracterizado por catafilos com feixes fibrovasculares. I: Pecíolo cotiledonar com grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff* (PAS). J: Região haustorial com grãos de amido corados com PAS e Lugol (detalhe lateral) (seta apontando matriz polissacarídica). K: Eófilo com grãos de amido corados com PAS; notar estômato (cabeça de seta) com grãos de amido. Abreviações: (cf) composto fenólico, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ei) espaços interelulares, (ep) epiderme, (ev) elemento de vaso, (fi) fibra, (fv) feixe vascular, (ha)

92

haustório, (id) idioblasto e (pct) pecíolo cotiledonar. Barras: A = 2 mm; F = 1 mm; B, E, G, I = 500 µm; D, H, J = 200 µm e C, K = 50 µm.

### **CAPÍTULO III: DESSECAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE SEMENTES DE *Euterpe precatória* Mart. - ARECACEAE**

**FIGURA 1.** Percentuais de umidade em função do tempo dessecação em horas de sementes de *Euterpe precatória* Mart. expostas à sílica gel. 113

**FIGURA 2.** Variação no percentual de germinação convencional (A) e *in vitro* (B) e do Índice de Velocidade de germinação - IVG convencional (C) e *in vitro* (D) em função teor de umidade de sementes de *Euterpe precatória* Mart. 117

**FIGURA 3.** Diferentes comportamentos de embriões zigóticos de *Euterpe precatória* Mart. inoculados em meio de germinação *in vitro*. A: Embrião zigótico indiferente ao cultivo *in vitro* (inviável), exceto pela ocorrência de oxidação na região proximal. B: Embrião zigótico contaminado com bactéria (seta). C: Embrião zigótico com região distal (haustório) intumescida; notar região proximal oxidada (seta). D: Emissão de sistema radicular. E: Emissão de parte aérea. F: Planta completa. Abreviações: (ct) catafilo, (eo) eófilo, (ez) embrião zigótico e (ha) haustório. Escalas = A, B: 0,5 mm; C: 1 mm; D-F: 5 mm. 118

**FIGURA 4.** Embrião zigótico de *Euterpe precatória* Mart.. A: Secção longitudinal de embrião zigótico. B: Detalhe da região proximal; notar células vacuoladas (quadrado). Abreviações: (ee) eixo embrionário; (rd) região distal e (rp) região proximal. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm e C: 200 µm. 125

**FIGURA 5.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatória* Mart., proveniente de semente com 33% de teor de umidade, sem dessecação em sílica e cultivado em vermiculita para germinação. A: Embrião zigótico em processo germinativo; notar lígula e emissão de raiz. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico com primórdios foliares desenvolvidos (A). C: Embrião zigótico em germinação; notar eófilo em desenvolvimento e abertura da fenda cotiledonar. D: Raiz. E: Células do meristema fundamental da região haustorial. F: Elementos de vaso em diferenciação. G: Grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) em células da plúmula. H, I: Grãos de amido corados com PAS em células da região haustorial; notar invaginações. Abreviações: (cc) cavidade cotiledonar, (cf) composto fenólico, (cr) capa da raiz, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ev) elemento de vaso, (id) idioblasto, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar e (r) raiz. Barras = A: 2 mm, B: 500 µm, C, D: 200 µm e E-J: 50 µm. 126

**FIGURA 6.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart., proveniente de semente com 17% de teor de umidade, pós dessecação em sílica e cultivado em vermiculita para germinação. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada e início de germinação (abertura lateral da fenda cotiledonar). B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico com primórdios foliares desenvolvidos (A); observar compostos fenólicos (\*). C: Eixo embrionário em intensa divisão celular; notar catafilos, início de eófilo (\*) e abertura da fenda cotiledonar. D: Intensa divisão celular na periferia do eixo. E: Células do meristema fundamental da porção de transição entre a região proximal e distal com espaços intercelulares. F: Detalhe da abertura da fenda cotiledonar. G: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células próximas aos cordões procambiais saindo da plúmula. H, I: Grãos de amido corados e compostos fenólicos (\*) corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff*, respectivamente, em células da plúmula. Abreviações: (ee) eixo embrionário, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm, C: 200 µm e D-J: 50 µm. 128

**FIGURA 7.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart., proveniente de semente com 12% de teor de umidade, pós dessecação em sílica e cultivado em vermiculita para germinação. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A); observar compostos fenólicos (seta e \*). C: Eixo embrionário; notar compostos fenólicos (seta). D: Detalhes da extremidade do promeristema radicular com compostos fenólicos (\*). E: Elemento de vaso visualizado no eixo hipocótilo-radícula. F: Células do meristema fundamental da porção de transição entre a região proximal e distal com espaços intercelulares (quadrado). G: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células do meristema fundamental da região distal. H, I: Grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff*, respectivamente, em células da plúmula. Abreviações: (ee) eixo embrionário, (ev) elemento de vaso), (mf) meristema fundamental, (pf) primórdio foliar, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm, C: 200 µm, D, F, G-I: 50 µm e E: 20 µm. 130

**FIGURA 8.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart., provenientes de sementes com 8,97% de umidade, pós dessecação em sílica e cultivados *in vitro* para germinação, com danos celulares. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A). C, D: Plúmula com células danificadas. E, F: Secção anatômica transversal de embrião zigótico com células danificadas (setas e \*); notar compostos fenólicos na região plumular (\*) e em células subprotodérmicas (quadrado). G: Região da secção da letra E com protoderme e subprotoderme intactas. H: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células da região distal. I: Diminutos grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) em células danificadas da plúmula. J: Grãos de amido corados com PAS em células próximas a plúmula. Abreviações: (cc) cavidade cotiledonar, (ee) eixo embrionário, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm, C, E: 200 µm e D-J: 50 µm. 133

**FIGURA 9.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart., proveniente de semente com 8,97% de teor de umidade, pós dessecação em sílica e cultivado *in vitro* para germinação. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A); observar compostos fenólicos (seta). C: Plúmula; notar compostos fenólicos (seta). D: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células próximas aos cordões procambiais saindo da plúmula. E: Grãos de amido corados com Lugol nas proximidades do promeristema radicular e em células do promeristema radicular. F: Grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* em células próximas a plúmula. Abreviações: (cf) composto fenólico, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm, C: 200 µm e E-G: 50 µm. 135

**FIGURA 10.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart., provenientes de sementes com 8,33% de teor de umidade, pós dessecação em sílica, criopreservados e cultivados *in vitro* para germinação, com danos celulares. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A). C, D: Plúmula com células danificadas. E, F: Secção anatômica transversal de embrião zigótico com células danificadas (seta); notar acúmulo de compostos fenólicos na região protodérmica. G: Elemento de vaso visualizado no eixo hipocótilo-radícula. H: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células da região distal. I: Grãos de amido corados com Lugol em células danificadas da plúmula. J: Grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) em células próximas a plúmula. Abreviações: (cc) cavidade cotiledonar, (ee) eixo embrionário, (ev) elemento de vaso, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm, C, E: 200 µm, D, F, H-J: 50 µm e G: 20 µm. 136

**FIGURA 11.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart., proveniente de semente com 8,33% de teor de umidade, pós dessecação em sílica, criopreservados e cultivado *in vitro* para germinação. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A). C: Eixo embrionário; notar compostos fenólicos (seta). D: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células da região distal. E, F: Grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff*, respectivamente, nas proximidades da plúmula. Abreviações: (ee) eixo embrionário, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm, C: 200 µm e D-F: 50 µm. 137



# DIVERSIDADE GENÉTICA, GERMINAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE *Euterpe precatoria* Mart. (ARECACEAE)

## RESUMO

O *Euterpe precatoria* Mart. é uma das palmeiras nativas da amazônia com significativo potencial econômico, dada a sua multiplicidade de usos, especialmente seus frutos. Mas para atender a demanda atual ainda são necessários estudos relativos a diversos aspectos dessa palmeira, como a diversidade genética populacional, a fisiologia de sementes, além da propagação e estratégias de conservação *ex situ*. Este trabalho teve por objetivo caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações naturais, a morfoanatomia e histoquímica da germinação e avaliar a qualidade fisiológica de sementes e embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. após dessecação e conservação. Para avaliação da diversidade e estrutura genética, amostras foliares de 96 indivíduos tiveram o DNA extraído, sendo as mesmas amplificadas via PCR e submetidas à análise via marcadores ISSR, os quais foram selecionados 24 *primers*. Para caracterização das estruturas reprodutivas, germinação, dessecação e conservação das sementes, foram utilizados frutos coletados no município de Plácido de Castro no Estado do Acre, Brasil. Para a biometria das estruturas reprodutivas utilizou-se um paquímetro digital, considerando um total de 100 frutos e 100 sementes e 15 embriões zigóticos. Já para avaliar a evolução das características biométricas, morfológicas, anatômicas e histoquímicas do processo germinativo foram coletadas amostras em diferentes períodos após a semeadura: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 dias. A avaliação da tolerância à dessecação das sementes ocorreu pela secagem artificial das mesmas por sete períodos: 0, 24, 48, 96, 120, 168 e 216 horas. E, para conservação, as sementes e embriões foram armazenadas em diferentes condições: 6, 25, -20 e -196 °C (nitrogênio líquido). Os 24 *primers* ISSR selecionados amplificaram um total de 316 fragmentos de DNA, com média de 13 fragmentos. Os índices de diversidade genética Nei (He) e Shanonn (I) alcançaram valores médios de 0,11 e 0,17 para as três populações. Segundo AMOVA a maior diversidade genotípica acontece dentro das populações (77%) e entre as populações (23%). Foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas três populações para as estimativas do Coeficiente de Coancestria. Quanto a caracterização das estruturas reprodutivas, verificou-se que o fruto e semente apresentam forma globosa, com diâmetros e comprimentos homogêneos. O embrião zigótico é cônico com cerca de 1,5 mm de diâmetro e 3,5 mm de comprimento. A germinação das sementes da espécie foi classificada como criptocotiledonar, hipógea e adjacente ligular e apenas aos 20 dias após semeadura foram observadas plântulas (33,33%). Esse período foi marcado histologicamente pela expansão da lígula, início de diferenciação do segundo eófilo e ruptura radicular completa. Histoquimicamente, a fase foi caracterizada pelo consumo total das reservas proteicas e aumento dos grãos de amido. Para ocorrência de 100% de germinação foram necessários 60 dias. As sementes manifestaram sensibilidade à dessecação, com valores críticos de germinação e vigor quando atingiram a umidade de 16,88%. Já as umidades de 12,02 e 8,97% proporcionaram efeitos letais na germinação. Para o IVG, os maiores valores foram obtidos quando as sementes não foram dessecadas (28,41% de umidade), com valores máximos de 2,8 para germinação convencional e 4,27 para germinação *in vitro*. Em nível anatômico foram observados danos na plúmula de embriões com 8,97% de umidade e embriões com 8,33% de umidade criopreservados. Diante dos resultados, concluiu-se que as populações estudadas de açai solteiro possuem baixos níveis de diversidade genética,

com maior divergência, dentro das populações. Não há um padrão na estruturação da genética espacial dentro das populações, indicando o cruzamento de indivíduos aparentados. Os propágulos são uniformes em termos biométricos e morfológicos. A germinação das sementes da espécie estudada é lenta e desuniforme e apresenta como marcador morfológico de sucesso no processo germinativo a saída da região proximal do embrião do interior da semente por meio do levantamento do opérculo. Constatou-se ainda que as sementes e embriões zigóticos do açaí solteiro mostram-se sensíveis à dessecação e que nenhuma das temperaturas de conservação é eficiente na manutenção da qualidade fisiológicas das sementes. Estes parâmetros confirmam o comportamento recalcitrante desta espécie.

**Palavras-chave:** Arecaceae; *Euterpe* spp.; Floresta amazônica; conservação genética; marcadores moleculares; recalcitrante; armazenamento de sementes; teor de umidade; embriões zigóticos.

# GENETIC DIVERSITY, GERMINATION AND CONSERVATION *EX SITU*

## *Euterpe precatoria* Mart. (ARECACEAE)

### ABSTRACT

The *Euterpe precatoria* Mart. is one of the native palm trees of the amazon with significant economic potential, given its multiplicity of uses, especially its fruits. However, in order to meet the current demand, studies are still needed on different aspects of this palm, such as population genetic diversity, seed physiology, propagation and ex situ conservation strategies. This work aimed to characterize the genetic diversity and structure of natural populations, morphoanatomy and histochemistry of germination and to evaluate the physiological quality of seeds and zygotic embryos of *Euterpe precatoria* Mart. after desiccation and storage. To evaluate the diversity and genetic structure, foliar samples of 96 individuals had the DNA extracted, the same being amplified by PCR and submitted to ISSR markers analysis, which were selected 24 primers. For characterization of the reproductive structures, germination, desiccation and conservation of the seeds, fruits were collected in the municipality of Plácido de Castro in the State of Acre, Brazil. For the biometry of the reproductive structures a digital caliper was used, considering a total of 100 fruits and 100 seeds and 15 zygotic embryos. To evaluate the biometric, morphological, anatomical and histochemical characteristics of the germination process, were samples collected in different periods after sowing: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 and 60 days. The evaluation of seed desiccation tolerance occurred by artificial drying of the seeds for seven periods: 0, 24, 48, 96, 120, 168 and 216 hours. And, for conservation, the seeds and embryos were stored under different conditions: 6, 25, -20 and -196 °C (liquid nitrogen). The 24 primers selected the ISSR amplified a total of 316 DNA fragments, with an average of 13 fragments. The genetic diversity indexes Nei (He) and Shanonn (I) reached mean values of 0.11 and 0.17 for the three populations. According to AMOVA, the greatest genotypic diversity occurs within populations (77%) and among populations (23%). Were found, significant differences ( $p > 0.05$ ) in the three populations for the estimates of Coancestry Coefficient. Regarding the characterization of the reproductive structures, it was verified that the fruit and seed presented a globose shape, with homogeneous diameters and lengths. The zygotic embryo is conical about 1.5 mm in diameter and 3.5 mm in length. The germination of the seeds of the species was classified as cryptocotiledonar, hypogea and adjacent ligular and only at 20 days after sowing were observed plantules (33.33%). This period was marked histologically by the expansion of the ligula, the beginning of differentiation of the second and complete root rupture. Histochemically, the phase was characterized by the total consumption of the protein reserves and increase of the starch grains. For the occurrence of 100% germination, it took 60 days. The seeds showed sensitivity to desiccation, with critical values of germination and vigor when they reached the humidity of 16.88%. Already in the levels of humidity 12.02 and 8.97% provided lethal effects on germination. For IVG, the highest values were obtained when the seeds were not desiccated (28.41% moisture), with maximum values of 2.8 for conventional germination and 4.27 for in vitro germination. At the anatomical level, were observed embryo plumule damages with 8.97% of moisture and in embryos with 8,33% moisture, cryopreserved. Considering the results, it was concluded that the studied populations of single açai have low levels of genetic diversity, with greater divergence within the populations. There is no pattern in structuring spatial genetics within populations, indicating the crossing of individuals relatives. The propagules are

uniform in biometric and morphological terms. The germination of the seeds of the species studied is slow and uneven and presents as a morphological marker of success the process of exiting the proximal region of the embryo from the seed through the removal of the operculum. It is also observed that the zygotic seeds and embryos of the single açai are sensitive to desiccation and that none of the storage temperatures is efficient in maintaining the physiological quality of the seeds. These parameters confirm the recalcitrant behavior of this species.

**Key words:** Arecaceae; *Euterpe* spp.; Amazon rainforest; genetic conservation; molecular markers; recalcitrant; seed storage; moisture content; zygotic embryos.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A floresta amazônica possui uma diversidade de espécies vegetais tanto classificadas quanto não classificadas botanicamente pelos pesquisadores e, nesta vasta diversidade, existem as palmeiras que dão características e enriquecem as matas onde são encontradas (BATISTA; RAPÔSO; LIBERATO, 2017).

A família das palmeiras (Arecaceae) é uma das mais importantes plantas que podem ser utilizadas na alimentação. Adicionalmente, a família pode servir como ferramenta para descrever a mudança de conhecimento de uso deste grupo de espécies ao longo do tempo, pois um número considerável de produtos podem ser gerados a partir delas (BUSSMANN; ZAMBRANA, 2016).

Para Batista, Rapôso e Liberato (2017), em meio ao grande número de espécies de palmeiras, destaca-se o açaí por ser de grande valor socioeconômico. Entre as espécies de açaí, a *Euterpe precatoria* Mart. tem sido considerada de importante potencial para a diversificação da produção florestal não-madeireira, pois o manejo de seus frutos para produção de polpa engloba aspectos sociais, econômicos e ecológicos concernentes à floresta (ROCHA, 2004).

Mesmo que a principal utilização da espécie seja por meio da polpa extraída dos frutos, diversos outros usos são também advindos dessa espécie, podendo também ser usada para a recuperação de áreas degradadas (BENTES-GAMA *et al.*, 2009), no artesanato (FRAUSIN *et al.*, 2010), no uso medicinal (VALADEAU *et al.*, 2010; PEDROLLO *et al.*, 2016), além de ser importante na fabricação de bebidas (CAMPOS *et al.*, 2016).

Contudo, apesar de sua importância econômica e ecológica, a Amazônia, seu centro de origem, tem passado por um intenso processo de desmatamento e fragmentação para os mais diversos objetivos, em especial pela expansão do agronegócio e extração de madeira. Essa exploração inadequada dos recursos naturais tem ocasionado consequências para os ecossistemas naturais amazônicos, dentre estas a degradação ambiental, com diminuição do tamanho das populações naturais e o isolamento das mesmas que, muitas vezes, tem dificultado o fluxo gênico entre os indivíduos, resultando no cruzamento de indivíduos aparentados, sendo estes fatores também responsáveis pela diminuição ou perda da diversidade genética nessas populações.

Outro aspecto a ser considerado para a *Euterpe precatoria* Mart. é o fato de apresentar um estipe solitário e não produzir perfilhos (FREITAS *et al.*, 2018), sendo a

semente a única maneira para propagação natural da espécie. Com isso, a coleta dos frutos de maneira não planejada, em conjunto com a coleta destrutiva da planta, que segundo Scariot (2015) resulta no corte do estipe por completo quando se deseja a obtenção do palmito, podem ser também agravantes na manutenção da diversidade genética da espécie.

Neste contexto, conhecer a diversidade genética dessa palmeira em populações naturais é um importante instrumento para o estabelecimento de estratégias de utilização, preservação e/ou conservação dessa espécie. Dentro dessas estratégias pode citar a produção de mudas e melhoramento genético; conservação *in situ* com áreas prioritárias para coletas de sementes ou recomendações para criação de áreas protegidas; conservação *ex situ*, como por exemplo, a conservação de sementes em bancos de germoplasmas.

Para Santana *et al.* (2016), a avaliação da diversidade genética é uma das maneiras utilizadas para promover a conservação dos recursos genéticos, por ser possível o conhecimento sobre o grau de variabilidade genética. Assim, esse tipo de informação é importante na formação de germoplasmas e na identificação de novos genes de interesse. De acordo com Singh *et al.* (2017), distintos tipos de marcadores moleculares fundamentados no polimorfismo do DNA são utilizados para a estimativa da diversidade genética nas espécies de plantas. Entre os marcadores moleculares, os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) tem sido utilizados com sucesso em estudos sobre a diversidade genética em populações naturais de palmeiras (VIEIRA *et al.*, 2015; CHAGAS *et al.*, 2015).

Após conhecer a diversidade genética de uma espécie e selecionar os indivíduos geneticamente superiores, a produção de mudas via germinação de sementes e, a conservação de sementes podem ser alternativas eficazes para auxiliarem na sua conservação.

Nas palmeiras as estruturas embrionárias e germinação são bastante peculiares, devido à posição interna do eixo embrionário, seu pequeno tamanho em relação as sementes, e por existir muitos padrões morfológicos de embriões e plântulas. Esses e outros fatores fazem com que os processos germinativos só possam ser descritos adequadamente por meio de uma associação detalhada de características morfológicas e anatômicas, para então definir indicadores morfológicos facilmente visíveis da germinação (HENDERSON, 2006; RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012).

A conservação de sementes possui como objetivo manter esse material genético por longos períodos sob condições controladas, sem perder sua viabilidade. Segundo Kohama *et al.* (2006) e Medeiros e Eira (2006), existem diversas técnicas utilizadas no armazenamento de sementes, que dependem da finalidade da conservação e da longevidade requerida, muito embora, nem todas as técnicas utilizadas na conservação de sementes se adequam para todas as espécies. Segundo Lima *et al.* (2014) e Carvalho e Nascimento (2018), sementes de plantas do gênero *Euterpe* apresentam comportamento recalcitrante, ou seja, não suportam dessecação e armazenamento. É importante ressaltar, no entanto, que são raros os trabalhos na área para a espécie, sendo necessário pesquisas mais direcionadas em busca de confirmar esse comportamento e definir técnicas e condições para sua conservação racional.

Diante do exposto, este estudo teve como principais objetivos caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações, a morfoanatomia e histoquímica da germinação e avaliar a qualidade fisiológica de sementes e embriões zigóticos de *Euterpe precatória* Mart. após dessecação e conservação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

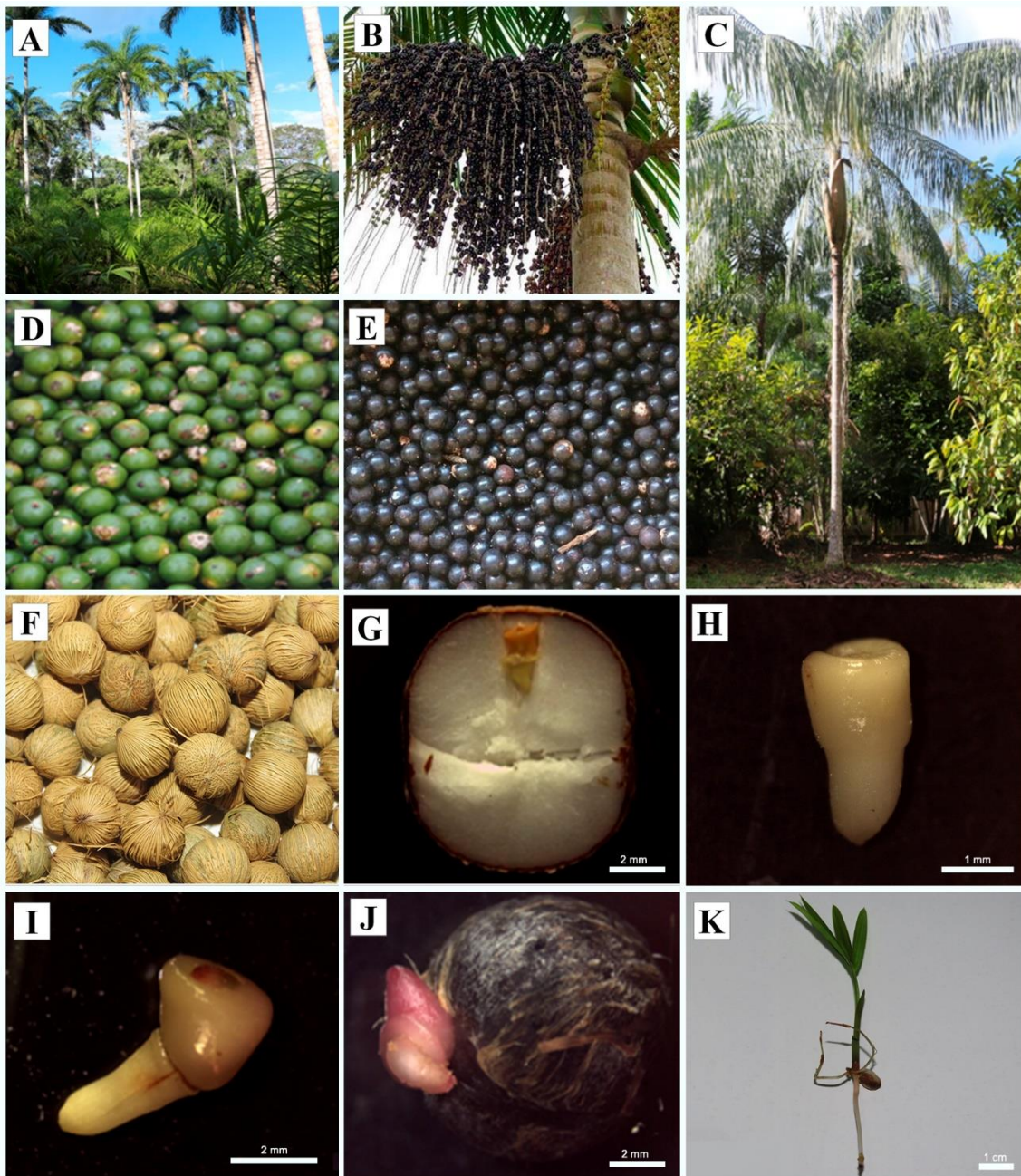
### 2.1 *Euterpe precatoria* Mart.

*Euterpe precatoria* Mart. é popularmente conhecida como açáí do Amazonas e açáí-solitário (AGUIAR; MENDONÇA, 2003), ou ainda açáí-de-terra-firme por ter sua ocorrência em áreas sem inundações permanente na Amazônia Central e Ocidental (GALOTTA; BOAVENTURA; LIMA, 2008).

O açáí é uma espécie nativa, no entanto, não endêmica. Ela apresenta distribuição geográfica na Região Norte do Brasil, com ocorrências confirmadas nos estados do Acre, Amazonas, Pará e Rondônia. Sob domínios fitogeográficos da Amazônia, sua ocorrência varia quanto ao tipo de vegetação, estendendo-se pela Floresta de Terra Firme, Floresta de Várzea e Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial) (FLORA DO BRASIL, 2018).

*Euterpe precatoria* Mart. é uma palmeira de apenas um único tronco (Figura 1C). Ela pode atingir altura de até 20 m, com diâmetro de 25 cm (KANG *et al.*, 2012). Suas folhas são pinadas, planas e divergentes, porém, às vezes pêndulas; apresenta bainha fechada de 0,7 a 1,6 m de comprimento, desenvolvendo um tubo com o palmito ou caule, na grande maioria de cor verde, podendo ocorrer verdes com listas verticais amarelas (LORENZI *et al.*, 2004).





**FIGURA 3.** Aspecto geral de *Euterpe precatória* Mart.. A: Plantas em habitat natural. B: Planta com cacho de frutos maduros. C: Planta completa isolada. D: Frutos imaturos. E: Frutos maduros. F: Sementes com fibras mesocárpicas. G: Semente cortada longitudinalmente com endosperma e embrião zigótico. H: Embrião zigótico extraído da semente. I: Embrião zigótico com indícios de germinação (intumescimento das regiões proximal e distal). J: Germinação da semente, com emissão da raiz e lígula (parte aérea). K: Plântula completa germinada *in vitro*.

As inflorescências nascem axilares e são infrafoliares na antese. Cada indivíduo pode produzir de uma a quatro inflorescências em sucessão durante um período de floração. O broto da inflorescência tem um perfilo tubular e verde que se divide abaxialmente à medida que o broto se expande. Ele se torna marrom e cai muito antes de

o botão abrir. A bráctea peduncular é mais longa que a do propilo e tubular com uma ponta pontiaguda. As inflorescências têm um pedúnculo curto e são ramificadas em rachilas de primeira ordem. Os rachilas têm uma seção basal estéril curta, distalmente carregam flores estaminadas e pistiladas em tríades em poços distintos. O número máximo estimado de flores por inflorescência foi 110550, incluindo 73700 masculinas e 36850 femininas. A polinização desta palmeira ocorre pela combinação de insetos e eventualmente pelo vento (KUCHMEISTER; SILBERBAUER- GOTTSSBERGER; GOTTSSBERGE, 1997).

O fruto é do tipo globoso, de cor de verde quando imaturo e mudam para preto quando amadurece (Figura 1D; 1E). Em cada fruto existe apenas uma semente de 7 a 10 mm, com tegumento fino, eixo embrionário de tamanho reduzido, farto em tecido de reserva (endosperma), sendo este, rico em lipídios (Figura 1F).

As sementes são envolvidas por camadas finas de fibras e mesocarpo comestível e, apresentam germinação, consideravelmente, mais lenta que as sementes de *Euterpe oleracea* Mart., sugerindo a possibilidade da existência de algum mecanismo de dormência que controla a germinação. Contudo, até o momento nada foi publicado a respeito dessa possibilidade (KUCHMEISTER; SILBERBAUER-GOTTSSBERGER; GOTTSSBERGE, 1997; CASTILLO; LARES; HERNANDEZ, 2012; CARVALHO; NASCIMENTO, 2018). Quanto ao comportamento das sementes de *Euterpe precatória* Mart. em relação ao armazenamento, essas foram classificadas como recalcitrantes (LIMA *et al.*, 2014). Como a espécie não apresenta perfilhamentos, a semente assume um papel importante na regeneração natural, constituindo-se como a única forma de propagação (AGUIAR; MENDONÇA, 2003; COELHO *et al.*, 2015).

De acordo com Henderson (2006), o sistema radicular apresenta raiz primária efêmera, raízes secundárias ramificadas, e presença de pêlos radiculares, com pneumatóforos espalhados.

*Euterpe precatória* Mart. possui características ecológicas favoráveis para seu manejo sustentável, tais como alta densidade e frequência, regeneração abundante e grande produção de frutos. Apresenta maior potencial de manejo na floresta de várzea, quando comparado à terra firme, devido principalmente à densidade e estabilidade populacional (ROCHA, 2004). Segundo Costa (2017) no estado do Acre uma palmeira de açaí solteiro pode produzir de 1 a 4 cachos por ano, em média com 19 kg.

Da planta de *Euterpe precatória* Mart. utiliza-se praticamente tudo. Segundo Wadt *et al.* (2004) as folhas podem ser usadas para cobertura de casas, para tecer chapéus,

esteiras, tapetes e cestos; o estipe (tronco) para construção de casas e cercas; o cacho seco serve como vassoura; o endosperma como adubo e para confecção de artesanato; o palmito como alimento; e as raízes como produto medicinal. No entanto, o principal produto do açazeiro é a polpa dos frutos para a alimentação humana.

Nos últimos anos, o açaí, sobretudo a espécie *Euterpe precatoria* Mart. tem se destacado no mercado nacional, sendo inserido cada dia mais na alimentação, principalmente para pessoas que dão preferência a produtos de origem natural. De acordo com Costa *et al.* (2018), a espécie tem demonstrado amplo potencial econômico principalmente por causa de seus frutos, onde um líquido grosso, chamado "vinho do açaí" é extraído do mesocarpo comestível fresco.

Em estudo recente Yuyama *et al.* (2011) observaram que o açaí de diferentes ecossistemas amazônicos reúne características essenciais para a nutrição humana como fonte de energia, fibra alimentar, antocianinas, minerais, particularmente, cálcio e potássio, e os ácidos graxos oleico e linoleico.

É comum encontrar na literatura estudos que citam os usos medicinais de *Euterpe precatoria* Mart., como, por exemplo: a utilização das raízes e extrato dos frutos para tratamento contra a malária, hepatite, febre amarela e dores estomacais (BALSLEV *et al.*, 2008); dor no fígado e nos rins, infecção uterina, purificação do sangue e tuberculose (VALADEAU *et al.*, 2010); anemia e hepatite (PEDROLLO *et al.*, 2016); extrato com antocianina para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos como a doença de Alzheimer (DA) e doença de Huntington (HD). Muito embora, ressaltam que são necessários mais estudos para divulgar a extensão destes efeitos (PEIXOTO *et al.*, 2016).

Um dos primeiros trabalhos desenvolvidos com *E. precatoria* Mart. foi realizado por Aguiar e Mendonça (2003), como objetivo de descrever a morfo-anatomia de sua semente como contribuição aos estudos posteriores.

Com o passar dos anos algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas com a finalidade de propagação da espécie, como, por exemplo, Coelho *et al.* (2015) trabalharam com efeito da irrigação no comportamento fisiológico das mudas. Batista, Rapôso e Liberato (2017) determinaram o protocolo de assepsia para reprodução *in vitro*. Costa *et al.* (2018) estudaram o efeito da temperatura, da luz e do teor de umidade da semente na germinação de sementes, e concluíram que a temperatura a 20°C promoveu as maiores médias de porcentagem de germinação e taxa de germinação, sob luz ou escuro. As sementes foram tolerantes até 11% de umidade.

## 2.2 Conservação dos recursos genéticos

Segundo Barata *et al.* (2011), a conservação dos recursos genéticos vegetais consiste em preservar e gerir a variabilidade genética de espécies com importância atual ou futura, em benefício do desenvolvimento sustentável. É considerada uma ação importante, já que em plena mudança global, os ecossistemas estão sujeitos às alterações climáticas e fortes pressões antropogênicas, e a redução da diversidade genética é uma realidade cada vez mais atual. Ainda salienta os autores, que a conservação dos recursos genéticos vegetais é uma prioridade estabelecida e reconhecida em nível mundial.

Essa prioridade passou a ser reconhecida a partir da década de 1970, com entendimento e conscientização mundial de preservação dos recursos genéticos vegetais para atender a demanda da variabilidade genética para o melhoramento, principalmente para alimentação. Nessa mesma década, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), incentivou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para conservação de recursos genéticos. No Brasil, em 1974 foi criado o Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), atualmente Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (SIMON, 2010).

Essa preocupação com a conservação dos recursos genéticos vegetais se deu, principalmente, por que de acordo com Carderalli *et al.* (2013), com o passar dos anos, os ecossistemas, nos quais se inserem as populações naturais de espécies arbóreas tropicais, vêm sendo modificados, resultando em áreas fragmentadas, formando mosaicos de vegetação remanescente, mergulhados em uma matriz antropizada.

Quando a floresta se torna fragmentada ocorre à redução no tamanho das populações e, conseqüentemente, na sua diversidade genética e no potencial adaptativo das populações arbóreas ali presentes, tornando-as, com este isolamento, significativamente mais vulneráveis a eventos ambientais, demográficos e genéticos (BATISTA *et al.*, 2012).

Em populações naturais de espécies arbóreas, a crescente fragmentação florestal aliada à exploração madeireira tem sido a principal ameaça à sustentabilidade dos ecossistemas florestais, aumentando as possibilidades de erosão genética, decorrente da drástica redução do tamanho populacional. Este fato, aliado ao isolamento das populações numa matriz pouco permeável, gera condições propícias para a manifestação dos efeitos da deriva genética, diminuição do fluxo gênico entre populações, aumento da endogamia,

reduções na variabilidade genética e no tamanho efetivo, o que afeta as gerações descendentes (SENNA *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2012).

Neste sentido, a conservação dos recursos genéticos vegetais torna-se um instrumento fundamental mesmo para aquelas populações que apresentam alta taxa de variabilidade genética e estão fora da lista de espécies ameaçadas de extinção, sendo essencial para as futuras gerações, no que diz respeito ao melhoramento da espécie, conservação e ao aproveitamento de genes específicos de interesse (FREITAS *et al.*, 2006). Glasenapp *et al.* (2014) ressaltam que apenas com a conservação da diversidade genética podem ser mantidos os processos evolutivos atuantes nas populações.

A Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD) em 1992, realizada no Rio de Janeiro, dentro de seu quadro mais amplo, define duas estratégias de conservação: conservação *ex situ* e conservação *in situ* (STHAPIT; PALUDOSI; MAL, 2010).

Apenas nos anos 2001, o Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para a Alimentação e a Agricultura (TIRFAA) reconheceu que a diversidade genética deve ser mantida também nos sistemas agrícolas locais (conservação *on farm*), reconhecendo que a participação dos agricultores é fundamental no processo de conservação dos recursos genéticos vegetais. Esse Tratado Internacional foi adotado por 125 países e estabeleceu normas importantes sobre a conservação (*ex situ*, *in situ* e *on farm*) e a utilização sustentável dos recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura (BUSTAMANTE, 2010; SANTONIERI; BUSTAMANTE, 2016).

Para melhor entendimento dessas três maneiras de conservação dos recursos genéticos vegetais, segue suas descrições:

### **2.2.1 Conservação *ex situ***

Para Calgaro *et al.* (2015), a conservação *ex situ* ocorre quando o material é conservado em locais diferentes daqueles de onde naturalmente ocorrem.

Batista *et al.* (2012) relataram que a conservação *ex situ* de recursos vegetais pode ser realizadas de distintas maneiras, como coleções permanentes de pólen, armazenamento de sementes, culturas de tecidos ou coleções de plantas mantidas em campo, de acordo com as características da espécie e a disponibilidade de recursos materiais e humanos. Araújo *et al.* (2014) discorrem sobre outra estratégia que seria a conservação em bancos de germoplasmas estabelecidos em forma de testes de procedências e progênies.

Outra técnica utilizada na conservação *ex situ* é a criopreservação, um método de conservação *in vitro* a longo período, em que o material biológico é submetido à baixíssimas temperaturas utilizando nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor (-150 °C) (SANTOS, 2000). Martins *et al.* (2009), estudaram a técnica de criopreservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl) como uma alternativa a conservação genética *ex situ* da espécie.

Camillo *et al.* (2009) relatam a técnica da cultura de tecidos *in vitro* como opção para conservação genética vegetal *ex situ*, especialmente em casos de espécies com sementes recalcitrantes e de difícil propagação vegetativa por métodos convencionais; neste caso o objetivo deste trabalho foi adequar uma metodologia para a conservação *in vitro* do algodão-do-campo - *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. espécie que encontra-se na lista de espécies medicinais nativas prioritárias para conservação no cerrado.

Neste contexto, a criopreservação pode ser um eficiente método indicado para a conservação *ex situ* e, quando associada às técnicas de cultura de tecidos, possibilitam a conservação e multiplicação de espécies nativas (BÁRBARA *et al.*, 2015).

A conservação *ex situ* tem sido adotada como uma estratégia eficiente para preservar populações de espécies vegetais da extinção, tendo como objetivo conservar a variabilidade genética de diferentes populações de espécies florestais, para uso atual ou futuro, com a finalidade de satisfazer as exigências econômicas, sociais e ambientais. Além de assegurar a manutenção da representatividade genética dos recursos naturais dentro e fora do seu habitat natural, a conservação *ex situ* pode contribuir para entendimento dos potenciais produtivos, ecológicos e controle genético de caracteres de valor econômico de inúmeras espécies (KUBOTA *et al.*, 2015).

Porém, Sebbenn *et al.* (2009) alertam que somente a conservação *ex situ* não garante a conservação das espécies. Desastres naturais, como por exemplo, incêndios, podem causar a perda dos bancos genéticos, sendo fundamental recombinar essa variação genética em pomares de sementes e expandi-la através de reflorestamentos ambientais, o que asseguraria uma maior conservação dessas espécies.

### 2.2.2 Conservação *in situ*

A conservação *in situ* dos recursos vegetais naturais, de fato, ocorre quando o material é conservado no local de origem e ocorrência da espécie (CALGARO *et al.*, 2015).

Simon (2010) caracteriza conservação dos recursos genéticos *in situ* como um procedimento que busca preservar as populações de espécies em seu estado natural de ocorrência na natureza. O autor salienta que o objetivo deste tipo de conservação não é apenas preservar os indivíduos das espécies de interesse, mas também os *habitats* onde ocorrem, tendo em vista à manutenção das interações entre os organismos e os processos evolutivos.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2017), a conservação *in situ* de recursos genéticos é realizada, basicamente, em reservas genéticas, reservas extrativistas e reservas de desenvolvimento sustentável. Elas podem ser organizadas também em áreas protegidas, seja de âmbito federal, estadual ou municipal. As reservas genéticas, por exemplo, são implantadas e mantidas em áreas prioritárias, de acordo com a diversidade genética de uma ou mais espécies de reconhecida importância científica ou socioeconômica. Essas reservas podem existir dentro de uma área protegida, de uma reserva indígena, de uma reserva extrativista e de uma propriedade privada, entre outras.

Como exemplo dessa estratégia de conservação, Freitas e Medeiros (2008) citam algumas iniciativas que têm sido realizadas, como os projetos de conservação da agrobiodiversidade desenvolvidos em áreas de agroextrativismo na Amazônia e em áreas de Cerrado do norte de Minas Gerais, sul do Ceará (Floresta Nacional do Araripe), Mato Grosso (Parque Indígena do Xingu) e Tocantins (Terra Indígena Krahô), através do Programa Biodiversidade Brasil-Itália, executado pela Embrapa e o Instituto Chico Mendes, com a participação de organizações não governamentais, movimentos sociais, institutos de pesquisas e universidades. Neste projeto estão sendo desenvolvidos estudos para conservação *in situ* e *on farm* de algumas espécies nativas, como o pequi (*Caryocar brasiliense*), a mangaba (*Hancornia speciosa*) e o coquinho azedo (*Butia capitata*), além das variedades crioulas de espécies cultivadas.

Akashi Junior e Castro (2010) relatam o uso de corredores de biodiversidade (ecológicos) como uma alternativa viável de conservação dos ecossistemas em larga escala, como uma ação complementar à função desempenhada pelas Unidades de Conservação.

### 2.2.3 Conservação *on farm*

Com a modernização da agricultura no Brasil, parte das áreas e tradições agrícolas foram comprometidas, ocasionando importantes impactos em relação à diversidade genética. Por isso, para se prevenir o processo de erosão genética, tem sido proposta a conservação de recursos fitogenéticos na própria situação onde eles se desenvolveram (*in situ* e *on farm*) (ARAÚJO; AMOROSO, 2012).

A conservação genética dos recursos vegetais denominada *on farm* é uma estratégia complementar à conservação *in situ*, pois, neste caso é possível o contínuo processo evolutivo das espécies. Esta estratégia de conservação apresenta como particularidade o fato de envolver recursos genéticos, especialmente variedades crioulas - cultivadas por agricultores, especialmente pelos pequenos agricultores, além das comunidades locais, tradicionais ou não e populações indígenas, detentoras de grande diversidade de recursos fitogenéticos e de um amplo conhecimento sobre eles (MMA, 2017).

A base da conservação *on farm* é fundamentada em inserir a valorização dos conhecimentos dos agricultores relativos às formas de conservação de sementes e mudas e o estímulo à identificação e manutenção de um conjunto de práticas, algumas delas milenares que, empreendidas por eles, resultam na ampliação da base genética e na adaptação dos cultivos aos desafios das mudanças ambientais (BUSTAMANTE, 2010). Neste contexto, Lima *et al.* (2013) consideram a conservação *on farm* uma proposta pertinente por preconizar o manejo sustentável da diversidade genética de variedades dentro dos sistemas produtivos dos agricultores tradicionais.

A conservação *on farm* é, portanto, uma alternativa dinâmica de manejo de recursos fitogenéticos, que permite que os processos de seleção natural e humana continuem a atuar no sistema de produção. A conservação na exploração é geralmente utilizada para descrever o processo dinâmico de gestão pelo qual os agricultores e variedades de culturas tradicionais que foram desenvolvidas nas suas condições locais e que continuam a modificar graças às suas práticas de gestão e aos esforços de seleção das culturas (STHAPIT; PALUDOSI; MAL, 2010).

Para Clement *et al.* (2007), mesmo com número de coleções *ex situ*, a representatividade de cada uma geralmente é pequena, dado a dificuldade de justificar coletas abrangentes para espécies com pouca ou nenhuma expressão econômica. Segundo



os autores, pode-se concluir que a maioria dos recursos genéticos vegetais nativos do Brasil não é bem representada nas coleções existentes. E, no Brasil, como no mundo, a maioria dos recursos genéticos nativos é conservada *on farm*.

Um exemplo de conservação *on farm* no Parque Indígena do Xingu é a forma remanescente de plantio da mandioca. Uma única família da aldeia Yawalapiti realiza um ritual religioso durante a implantação de sua roça, denominada “Casa do Kukurro” (FREITAS; MEDEIROS, 2008).

### **2.3. Marcadores Moleculares**

Na década de 70 iniciou os avanços das *Novas Biotecnologias* com o desenvolvimento de tecnologias como fusão de protoplastos, técnica do DNA recombinante e marcadores bioquímicos. Utilizando-se das mais variadas metodologias, elas permitiram que diversos seres vivos pudessem ser racionalmente explorados, otimizando-os com finalidades econômicas ou sociais. Atualmente as biotecnologias celulares e moleculares estão sendo rapidamente absorvidas pelos programas de melhoramento varietal (BRAMMER, 2000).

Neste contexto, Ramalho e Furtini (2009) relatam que a dificuldade do melhoramento de plantas é que se tem a informação do fenótipo e não do genótipo. Em inúmeras situações, quando o caráter é muito influenciado pelo ambiente, a eficiência da seleção pode ser pequena. Especialmente durante o início do século XX procurou-se por meio de métodos de melhoramento e, sobretudo, da melhoria da precisão experimental da avaliação das progênies, incrementar essa eficiência. Com os avanços da biologia molecular, as técnicas logo despertaram a atenção, por possibilitar o manuseio do próprio DNA em vez somente do fenótipo.

Para Pires *et al.* (2011), a terminologia Marcadores Genéticos tem uma abrangente definição que é dada a qualquer alteração possível de ser observada, que é herdável e que diferencia dois ou mais indivíduos. De acordo com Borém e Miranda (2009), quatro tipos de marcadores genéticos têm sido usados em vegetais: os marcadores morfológicos, citológicos, bioquímicos, moleculares. Neste momento, o último será melhor discutido a seguir.

Em marcadores moleculares dois importantes conceitos são fundamentais, que é a presença de poliforfismo e a natureza do marcador. Uma sequência de DNA que é idêntica em todos os indivíduos analisados não gera informação que permita diferenciar

geneticamente os indivíduos. Estes marcadores denominados de não polimórficos, geralmente não são considerados em análises genéticas. Com isso, um dos critérios de utilização é a presença de polimorfismo na população em que estes são utilizados. Em relação à segunda classificação que é quanto à natureza do marcador, são chamados de marcadores dominantes quando não são capazes de diferenciar o genótipo homocigoto dominante (AA) do genótipo heterocigoto (Aa). Quando o marcador permite esta distinção dos heterocigotos são chamados de codominantes (PIRES *et al.*, 2011).

A variabilidade genética é a base da biodiversidade e pode ser acessada por meio de marcadores genéticos. E os métodos para detectar, analisar e quantificar a variabilidade genética em nível molecular oferecem algumas vantagens, como a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos, a possibilidade da análise a partir de pequena quantidade de tecido das plantas e a não influência do ambiente. Além disso, propicia a redução do tempo para identificação da diversidade genética entre os indivíduos trabalhados, auxilia em programas de melhoramento genético da espécie, além de poder ser utilizados para a análise em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (XAVIER *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2006; KAMADA *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2011; PIRES, 2012; COUTINHO; GUIMARÃES; VIDAL, 2014).

Para Oliveira *et al.* (2013), o potencial de uso dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se a identificação de genótipos, quantificação da variabilidade genética, estudos de diversidade e distância genética. Brammer (2000) afirma ainda que a aplicação de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética tem aumentado nas últimas décadas, considerando tanto em estudos genéticos como em programas de melhoramento genético.

Existem muitas tecnologias da genética molecular que podem ser utilizadas para fornecer informações úteis aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Nenhum marcador é superior a todos os outros para uma ampla gama de aplicações. Contudo, cada tecnologia apresenta vantagens e desvantagens. A escolha de uma ou outra vai estar condicionada a alguns fatores, como: o objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros, dos recursos humanos disponíveis e com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007; KUMAR *et al.*, 2009).

Existem diferentes técnicas que permitem identificar diretamente o polimorfismo do DNA. Os marcadores moleculares mais utilizados são diferenciados pelas técnicas utilizadas para a revelação das características entre indivíduos, permitindo a obtenção de

um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo (COUTINHO; MILITÃO NETO; VERDE, 2006; LIMA *et al.*, 2015). A eficácia dos diferentes marcadores é confirmada com a vasta utilização dessas técnicas nos estudos de conservação genética e no melhoramento de plantas (SOUZA, 2015).

### **2.3.1 ISSR (*Inter-simple Sequence Repeats*)**

Os marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat – Inter Repetições de Sequência Simples) são fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação de regiões do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se de único *primer*, (FALEIRO, 2007). Os mesmos foram desenvolvidos com o surgimento da necessidade de explorar repetições de microssatélites, sem a necessidade do conhecimento anterior do sequenciamento do DNA das espécies (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994).

Os marcadores ISSR envolvem amplificação por PCR do DNA usando um único *primer* composto por uma sequência de microssatélites, como (CA)<sub>8</sub> ancorada na extremidade 3' ou 5' por 2-4 nucleotídeos arbitrários, muitas vezes degenerados. As sequências de repetições e nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente, em conjunto com a separação dos produtos das amplificações em gel de poliacrilamida (KUMAR *et al.*, 2016).

O ISSR utiliza uma sequência simples repetida como oligonucleotídeo iniciador (Olii) para amplificar um fragmento de DNA delimitado por dois microssatélites invertidos, o que gera um alto nível de polimorfismo (SILVA *et al.*, 2011).

Com o andamento da PCR o marcador ISSR gera fragmentos de várias dimensões, designados de locos, que em seguida são avaliados via eletroforese (CHAGAS *et al.*, 2015). Cada banda corresponde a uma sequência de DNA delimitada por pelos dois microssatélites invertidos (BORNET; BRANCHARD, 2001).

Na literatura são encontradas diversas vantagens atribuídas aos marcadores moleculares ISSR, como produzirem fragmentos com boa reprodutibilidade e requerem pouca infraestrutura em termos de equipamento de laboratório para execução dos estudos (DIAS *et al.*, 2015); nenhum conhecimento prévio sobre a sequência de marcadores da espécie é requerido (GOYAL *et al.*, 2015); a amplificação do ISSR pode revelar maior número de fragmentos por *primer*, quando comparados ao RAPD (SOARES *et al.*, 2016); a técnica é simples, rápida, de baixo custo financeiro, confiável e é necessário apenas uma pequena quantidade da amostra de DNA (PURAYIL *et al.*, 2018). Porém, todos os

marcadores também apresentam desvantagens. A principal desvantagem dos marcadores ISSR é serem de natureza dominante (SOARES *et al.*, 2016).

De acordo com Faleiro (2007), as principais aplicações desta técnica são análise da diversidade e filogenia, e fingerprinting (impressão digital). Esse tipo de marcador permite a identificação de ampla variabilidade intra e interespecíficas e, com isso, fundamentam-se como uma ferramenta bastante útil em programas de melhoramento e estudos de diversidade (LORENZONI *et al.*, 2014).

#### **2.4. Conservação de sementes**

O armazenamento de sementes passou a ser uma atividade essencial quando o homem deixou de ser nômade e passou a cultivar o seu alimento, necessitando conservar sementes para o próximo plantio. O aprendizado dessa atividade envolveu inicialmente a proteção das sementes contra aves, insetos e microrganismos e, posteriormente, os aspectos ligados à germinação e aos fatores ambientais que influenciam a sua longevidade. Com o avanço da genética e do melhoramento de plantas, o homem sentiu a necessidade de armazenar pequenos estoques de sementes por períodos mais longos. Mais tarde, ao observar a perda de material genético que poderia ser valioso para trabalhos de melhoramento, foram criados os Bancos de Germoplasma, com a missão de conservar materiais genéticos de uso atual ou potencial pelo maior período de tempo possível, utilizando os mais recentes resultados da fisiologia de sementes (MEDEIROS; EIRA, 2006).

Os autores acima citados definiram armazenamento de sementes como a atividade que constitui guardar sementes obtidas numa determinada ocasião, buscando manter a sua máxima qualidade fisiológica, física e sanitária, para uso futuro.

Em uma colocação pertinente, Figueiredo Neto *et al.* (2014) dizem que as condições de armazenamento são determinantes para garantia da qualidade fisiológica das sementes e, embora a sua qualidade não possa ser melhorada, boas condições durante este período contribuirão para mantê-las viáveis por um tempo mais longo, retardando o processo de deterioração. Para Zuchi *et al.* (2013), adequadas condições de armazenamento reduz o metabolismo das sementes e diminui o ataque de microorganismos patogênicos, minimizando assim a perda de qualidade.

Porém, Davide *et al.* (2003) relatam que para determinar as condições ambientais adequadas para cada espécie é necessário o conhecimento sobre a capacidade de

armazenamento das sementes, como também da elaboração de programas para a conservação de germoplasma. Mas ressaltam ainda que diante da grande diversidade de espécies nas florestas tropicais, a literatura ainda é deficiente sobre a tecnologia dessas sementes, principalmente em relação ao comportamento no armazenamento.

As condições durante o armazenamento, como a umidade relativa do ar e temperatura do ambiente de conservação das sementes são duas dos mais importantes fatores que afetam a longevidade, podendo, portanto, proporcionar alterações fisiológicas e bioquímicas das mesmas (SILVA *et al.*, 2011; MONIRA *et al.*, 2012).

No entanto, além das condições do armazenamento existem outros fatores que influenciam sobre a conservação das sementes, como, por exemplo, os citados por Costa (2009) e Carvalho e Nakagawa (2012), como: a qualidade inicial da semente; vigor das plantas ascendentes; condições durante a maturação das sementes; teor de água das sementes; atuação de mecanismos de dormência; grau maturidade fisiológica no momento da colheita; ataque de pragas e doenças; e integridade física das sementes.

Um fator de suma importância que já foi citado acima, mas, vale a pena enfatizar é em relação ao comportamento das sementes durante o armazenamento, que está diretamente relacionada com a longevidade das mesmas. De acordo com este comportamento as sementes são geralmente classificadas em três grupos. Inicialmente dois grupos proposto por Roberts (1973), sendo as sementes ortodoxas as que podem ser dessecadas a baixos níveis de umidade (em torno de 5%) e armazenadas a temperaturas baixas, o que possibilita a manutenção da viabilidade por um longo período; e as sementes recalcitrantes que não toleram ser dessecadas a estas condições e apresentam, portanto, dificuldades de armazenamento. Posteriormente, Ellis *et al.* (1990) verificaram um comportamento de armazenamento intermediário das sementes, ou seja, entre ortodoxo e recalcitrante.

O armazenamento das sementes recalcitrantes de espécies florestais é um desafio para as pesquisas, visto que quando ocorre o dessecamento de uma semente recalcitrante, rapidamente se reduz sua viabilidade e vigor, o que faz com que a semente perda completamente a capacidade germinativa (YUYAMA, MENDES e VALENTE, 2010). Segundo Carvalho, Silva e Davide (2006) existe uma associação entre o comportamento das sementes durante o armazenamento e os grupos ecológicos a que as espécies pertencem.

Em função da dificuldade de armazenamento de sementes recalcitrantes em longo prazo, Costa (2009) recomenda que sejam formuladas estratégias de conservação *in situ*

dessas espécies, e que devem ser levadas em consideração, como forma de garantir a preservação e conservação de sua diversidade genética.

Em contraponto às sementes recalcitrantes, as sementes ortodoxas podem ser armazenadas em baixas temperaturas e baixos teores de umidade (entre 5 % e 7 %), mantendo a viabilidade por longos períodos. Pode-se dizer que a temperatura e o teor de umidade são determinantes para que as sementes ortodoxas mantenham sua viabilidade, o que pode ser mantido, dependendo das condições e das estratégias de armazenamento adotadas (COSTA, 2009; MOROZESK *et al.*, 2014).

São muitas as opções de ambientes controlados para o armazenamento de sementes. Contudo, de acordo com Piña-Rodrigues, Figliolia e Silva (2015) a escolha do equipamento ou técnica precisa atender alguns requisitos como facilidade de acesso e manipulação limpeza do ambiente de armazenamento. Os autores mencionam que além do uso de geladeiras e congeladores, pode ser utilizado:

- *Câmara fria*: neste equipamento apenas a temperatura é controlada e a umidade relativa varia de acordo com a quantidade de vapor de água do ambiente. Podem ser armazenadas na câmara fria sementes ortodoxas em embalagens impermeáveis e intermediárias e recalcitrantes em embalagens semipermeáveis;
- *Câmara seca*: neste caso a umidade relativa do ar é reduzida utilizando um desumidificador. As sementes ortodoxas podem ser armazenadas neste local, e podem ser acondicionadas em embalagens permeáveis;
- *Câmara fria e seca*: ambas as condições de temperatura e umidade relativa são controladas com equipamentos de refrigeração e desumidificador. Indicada para armazenamento de sementes por longos períodos, permite o armazenamento de sementes ortodoxas em embalagens permeáveis ou semipermeáveis;
- *Ambiente de laboratório*: não há o controle da temperatura ou umidade relativa que são variáveis. Indicado, principalmente, para o armazenamento de sementes com dormência física, quando ocorre a impermeabilidade do tegumento à água, como exemplo, o guapuruvu (*Schizolobium parayba*).

Outra técnica utilizada no armazenamento de sementes é a criopreservação, sendo constantemente usada para conservação de sementes por longos períodos em bancos de germoplasma (WETZEL; REIS; RAMOS, 2003). Esta técnica consiste em armazenar o material biológico submetido a baixíssimas temperaturas utilizando nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor (-150 °C) (SANTOS, 2000).

Houve um progresso significativo nas pesquisas utilizando as técnicas de criopreservação de sementes. Este avanço atribui-se aos bons resultados obtidos com as mesmas. Para Martins *et al.* (2009) e Goldfarb *et al.* (2010), a semente é um tipo de material que pode ser crioconservado, sendo mínima a deterioração biológica do material durante o armazenamento, mantendo-se as qualidades fisiológicas.

No entanto, para que as sementes possam ser armazenadas nesses locais são necessários recipientes ou embalagens apropriadas. Com isso, deve-se avaliar melhor o tipo de embalagem em que as sementes devem ser acondicionadas, pois estas assumem importância relevante na preservação da viabilidade e vigor das sementes (GUEDES *et al.*, 2012). A deterioração está associada também as características dos recipientes que contém as sementes, dependendo da facilidade para as trocas de vapor de água entre as sementes com a atmosfera e condições do ambiente de armazenamento (MARCOS-FILHO, 2015).

São muitos os atributos que devem ser observados durante o processo de escolha da embalagem para o armazenamento ou transporte de sementes. Deve-se considerar o comportamento fisiológico (espécie), grau de umidade das sementes, o volume e o peso, condições e tempo necessário para o acondicionamento, resistência do material a ruptura, relação com a umidade relativa e temperatura, proteção à invasão de insetos e roedores e aspectos econômicos (MARCOS-FILHO, 2015; PIÑA-RODRIGUES; FIGLIOLIA; SILVA, 2015).

Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), as embalagens são classificadas, pelo grau de permeabilidade ao vapor de água que possuem, da seguinte forma:

- *Porosas*: são aquelas completamente permeáveis ao vapor de água, ocorre livre troca gasosa entre as sementes e o meio. Pode ser mencionado como exemplos as de embalagens de pano, polipropileno trançado, papel e papelão.
- *Semipermeáveis*: neste caso apenas parte da troca de vapor de água entre as sementes e o meio é permitida. Pode citar como exemplo, a junção de lâminas de papel ou asfalto, polietileno e poliéster.
- *Impermeáveis*: com esse tipo de embalagem não é permitido a troca de vapor de água entre as sementes e o meio ambiente. São utilizados materiais como lata de metal, plástico, vidro, alumínio, entre outras.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, M. O.; MENDONÇA, M. S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatória* Mart. (Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n 1, p. 37-42, 2003.
- AKASHI JUNIOR, J.; CASTRO, S. S. Corredores de biodiversidade como meios de conservação ecossistêmica em larga escala no Brasil: uma discussão introdutória ao tema. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 15, p. 20-28, 2010.
- ARAÚJO, C. R.; AMOROZO, M. C. M. Manutenção da diversidade agrícola em assentamentos rurais: um estudo de caso em Moji-Mirim – SP, Brasil. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p.265-280, 2012.
- ARAÚJO, D.; SEBBENN, A. M.; ZANATTO, A. C. S.; ZANATA, M.; MORAIS, E.; MORAES, M. L. T.; FREITAS, M. L. M. VARIACÃO GENÉTICA PARA CARACTERES SILVICULTURAIS EM PROGÊNIES DE POLINIZAÇÃO ABERTA DE *Astronium graveolens* Jacq. (ANACARDIACEAE). **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 1, p. 61-68, 2014.
- BALSLEV, H.; GRANDEZ, C.; ZAMBRANA, N. Y. P.; MØLLER, A. L.; HANSEN, S. L. Palmas (Arecaceae) úteis en los alrededores de Iquitos, Amazonía Peruana. **Revista Peruana de Biología**, v. 15, (supl. 1), p. 121- 132, 2008.
- BÁRBARA, E. P. S.; SILVA, A. A.; SOUZA, M. M. O. R.; GURGEL, Z. E. R.; MARCHI, M. N. G.; BELLINTANI, M. C. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 91-96, 2015.
- BARATA, A. M.; ROCHA, F.; REIS, A.; LOPES, V. R. O Banco Português de Germoplasma Vegetal e a conservação dos recursos genéticos em Portugal. In: COELHO, P. S.; REIS, P. (Editores). **AGRORRURAL: CONTRIBUTOS CIENTÍFICOS**, p. 964-974. Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I. P. e Imprensa Nacional-Casa da Moeda, S. A. 2011. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/269696579\\_O\\_Banco\\_Portugues\\_de\\_Germoplasma\\_Vegetal\\_e\\_a\\_conservacao\\_dos\\_recursos\\_geneticos\\_em\\_Portugal](https://www.researchgate.net/publication/269696579_O_Banco_Portugues_de_Germoplasma_Vegetal_e_a_conservacao_dos_recursos_geneticos_em_Portugal)
- BATISTA, C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, M. A.; ZANATTO, A. C. S.; SANTOS, P. C.; ZANATA, M.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Estimativas de parâmetros genéticos e a variabilidade em procedências e progênies de *Handroanthus vellosi*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 71, p. 269-276, 2012.
- BATISTA, B. N.; RAPÔSO, N. V. M.; LIBERATO, M. A. R. Determinação do protocolo de assepsia para reprodução *in vitro* de *Euterpe precatória* Mart. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 1-118, 2017.
- BENTES-GAMA, M. M.; ROCHA, R. B.; CAPELASSO, P. H. S; PEREIRA, N. S. **Desenvolvimento inicial de espécies nativas utilizadas na recuperação de paisagem alterada em Rondônia**. Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, 2009. 10 p. Circular Técnica, 108.



- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 5.ed. Viçosa: UFV, 2009. 529p.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, n. 1, p. 209–215, 2001.
- BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Embrapa Trigo, Documentos online 03, 2000.
- BUSSMANN, R. W.; ZAMBRANA, N. Y. P. Facing global markets – usage changes in Western Amazonian plants: the example of *Euterpe precatoria* Mart. and *E. oleracea* Mart. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Wrocław, v. 81, n. 4, p. 257-261, 2012.
- BUSTAMANTE, P. G. Conservação e Manejo dos Recursos Genéticos “On Farm”. **Horticultura Brasileira**. v. 28, n. 4, 2010.
- CALGARO, H. F.; BUZETTI, S.; SILVA, L. R.; STEFANINI, L.; MIRANDA, L. P. M.; MORAES, M. A.; MORAES, M. L. T. Distribuição natural de espécies arbóreas em áreas com diferentes níveis de antropização e relação com os atributos químicos do solo. **Revista Árvore**, v.39, n.2, p.233-243, 2015.
- CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação in vitro de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.2, p.184-189, 2009.
- CAMPOS, J.; LARES, M.; PÉREZ, E.; MELO, O.; COLMENARES, A.; GUTIÉRREZ, R.; HERNÁNDEZ, M. S. Formulation of a fermented drink made of asaí (*Euterpe precatoria* Mart.). **Agronomía Colombiana**, v.34, (1Supl.), p. 847-S849, 2016.
- CARDERALLI, A.; COSTA, R. B.; AZEVEDO, L. P. A.; RIBEIRO, E. S.; BATISTA, B. M. F.; SOUSA, R. A. T. M. Seleção precoce em progênies de meios irmãos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. via metodologia reml/blup. **Ambiência**, Guarapuava (PR), v. 9, n. 3, p. 605 – 617, 2013.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590p.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. S.; DAVIDE, A. C. classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p.15-25, 2006.
- CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Technological innovations in the propagation of Açaí palm and Bacuri. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 1: (e-679), 2018.
- CASTILLO Q. Y. M.; LARES A. M.; HERNANDEZ G. M. S. Caracterización bromatológica y fisicoquímica del fruto amazónico asaí (*Euterpe precatoria* Mart). **Vitae**, v. 19, n. 1, p. 309-311, 2012.

- CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineenses*. **Revista Brasileira Ciências Agrárias**, Recife, v.10, n.1, p.147-152, 2015.
- CLEMENT, C. R.; ROCHA, S. F. R.; COLE, D. M.; VIVAN, J. L. Conservação *on farm*. In: Nass, L.L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. 2007, 858p.
- COELHO, C. F.; MIRANDA, I.; MELO, Z.; BARBOSA, E. Physiological Behave of Acai Seedlings (*Euterpe precatoria* MART.) under Increasing Levels of Irradiance. **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 3, p. 236-242, 2015.
- COSTA, C. R. X., PIVETTA, K. F. L., DE SOUZA, G. R. B., MAZZINI-GUEDES, R. B., PEREIRA, S. T. S. AND NOGUEIRA, M. R. Effects of Temperature, Light and Seed Moisture Content on Germination of *Euterpe precatoria* Palm. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 98-106. 2018. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.91009>
- COSTA, C. J. **Armazenamento e conservação de sementes de espécies do Cerrado**. (Documentos 265), Planaltina-DF: Embrapa Cerrado, 2009. 30p.
- COSTA, E. L. **Pode o açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) ser parte importante no desenvolvimento socioeconômico das famílias extrativistas no Acre, Brasil?** 2017. 59 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COUTINHO, T. C.; GUIMARÃES, M. A.; VIDAL, M. S. Determinação da diversidade genética entre acessos de algodão por meio de marcadores microssatélites. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 1447-1458, 2014.
- COUTINHO, H. D. M.; MILITÃO NETO, V.; VERDE, L. C. L. Técnicas com marcadores moleculares usadas nas ciências da saúde. **Revista brasileira ciências da saúde**, n. 10, v. 2, p.177-188, 2006.
- DAVIDE, A. C.; CARVALHO, L. R.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. **Cerne**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 2003.
- DIAS, F. T. C.; BERTINI, C. H. C. M.; SILVA, A. P. M.; CAVALCANTI, J. V. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista de Ciências Agrônômicas**, v. 46, n. 3, p. 563-572, 2015.
- HENDERSON, F. M. Morphology and Anatomy of Palm Seedlings. **The Botanical Review**, v. 72, n. 4, p. 273-329, 2006.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

*Euterpe* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22139>>. Acesso em: 01 Mar. 2018

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FIGUEIREDO NETO, A.; DANTAS, B. F.; ALMEIDA, F. A. C.; LIMA, M. S.; SILVA, F. S. Influência da embalagem e do local de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de abóbora ‘jacarezinho’ (*Curcubita moschata* Duch). **Engenharia na agricultura**, Viçosa, v. 22, n. 4, 2014.

FRAUSIN, G.; TRUJILLO, E.; CORREA, M. A.; GONZALEZ, V. H. Plantas útiles en una comunidad indígena murui-muinane desplazada a la ciudad de florencia (Caquetá-Colombia). **Mundo amazónico**, v.1, n. 1, p. 267-278, 2010.

FREITAS, E. O.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; FERREIRA, J. C. B.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis in açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K. (Eds.). **Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants, Forestry Sciences**. Switzerland: Springer International Publishing, 2018. p. 267-290.

FREITAS, M.L.M., AUKAR, A.P.A., SEBBENN, A.M., MORAES, M.L.T., LEMOS, E.G.M. Variação genética em progênies de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. alemão em três sistemas de cultivo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 319-329. 2006.

FREITAS, F. O.; MEDEIROS, M. B. Conservação in situ dos recursos filogenéticos. In: MARIANTE, A. S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, A. C. V. **Informe nacional sobre a situação dos recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura do Brasil**. Brasília. Embrapa, 2008. cap. 3, p. 31-39.

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; LIMA, L. A. R. S. Antioxidant and cytotoxic activities of ‘açai’ (*Euterpe precatoria* Mart.). **Química Nova**, v. 31, n 6, p.1427-1430, 2008.

GLASENAPP, J. S.; CASALI, V. W. D.; MARTINS, E. R.; CRUZ, C. D.; BARBOSA, P. B. Descrição da diversidade genética de populações naturais de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville em unidades de conservação de Minas Gerais. **Revista Árvore**, v. 38, n. 1, p.103-112, 2014.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C.; NASCIMENTO, C. L.; BRITO, N. M.; SOUTO, F. M. Incidência de fungos e qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) após o armazenamento criogênico. **Revista Biotemas**, v. 23, n. 1, 2010.

GOYAL, M.; GAUTAM, R.; KUMAR, P.; DHILLON, S. Application of inter simple sequence repeat markers to analyze molecular relationships in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). **Agricultural Science Digest**, v. 35, n. 3, p. 195-198, 2015.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; GONÇALVES, E. P.; COSTA, E. G.; MEDEIROS, M. S. Armazenamento de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.1, p. 68-75, 2012.

KÜCHMEISTER H.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. Flowering, pollination, nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatoria* (Arecaceae), an Amazonian rain forest palm. **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, p.71–97, 1997.

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 671–677, 2012.

KAMADA, T.; PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; VIEIRA, R. F.; CAMPOS, W. O. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 403-409, 2009.

KOHAMA, S.; MALUF, A. M.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 1, p.72-78, 2006.

KUBOTA, T. Y. K.; SILVA, E. C. B.; MORAES, M. L. T.; TARAIZI, R.; SEBBENN, A. M. Herdabilidade em caracteres de crescimento em populações fragmentadas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae). **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 105, p. 235-242, 2015.

KUMAR, P.; GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. **Plant Omics Journal**, v. 2, n. 4, p.141-162, 2009.

KUMAR, P.; KUMAR, M.; NARESH, R. K.; KUMAR, N.; PRADEEP CHAUDHARY, P.; SHARMA, S. Evaluation of genetic diversity among gladiolus (*Gladiolus hybridus* Hort.) germplasm using issr markers. **International Journal of Agricultural Statistical Science**, v. 12, n. 1, p. 277-283, 2016.

KUCHMEISTER, H.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. Flowering, pollination, nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatoria* (Arecaceae), an Amazonian rain forest palm. **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, p.71-97, 1997.

LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, V. F. S.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, edição especial, p. 251-257, 2014.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; COSTA, J. T. M.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, Plantarum, 2004.

LIMA, R. A.; LOPES, M. T. G.; BENTES, J. L. S.; VALENTE, M. S. F.; PEREIRA, J. O.; MUNIZ, G. I. B. Diversidade e estrutura genética de *Senna reticulata*. **Floresta**, Curitiba, PR, v. 45, n. 3, p. 507-514, 2015.

LIMA, P. G. C.; OLIVEIRA, R.; COELHO-FERREIRA, M. R.; PEREIRA, J. L. G. Agrobiodiversidade e etnoconhecimento na Gleba Nova Olinda I, Pará: interações sociais e compartilhamento de germoplasma da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 8, n. 2, p. 419-433, 2013.

LIMA, M. JR.; HONG, T. D.; ARRUDA Y.M.B.C.; MENDES, A.M.S.; ELLIS, R.H. Classification of seed storage behaviour of 67 Amazonian tree species. **Seed Science and Technology**, v. 42, p. 363-392, 2014.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. 2 ed. Londrina, PR: ABRATES, 2015. 660 p.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; ANDRADE, A. C. S.; SALES, W. R. M. Conservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 071-076, 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Conservação in situ, ex situ e on farm**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>>. Acesso em: 23 de maio de 2017.

MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. Comportamento Fisiológico, Secagem e Armazenamento de Sementes Florestais Nativas. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. **Circular técnica**, Nº 127.

MONIRA, U. S.; AMIN, M. H. A.; AKTAR, M. M.; MAMUN, M. A. A. Effect of containers on seed quality of storage soybean seed. **Bangladesh research publications journal**, v. 7, n. 4, p. 421-427, 2012.

MORAES, M. A.; VALÉRIO FILHO, W. V.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, A. M.; MANOEL, R. O.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Produtividade, estabilidade e adaptabilidade em progênies de *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão – Anacardiaceae. **Scientia Forestalis**. Piracicaba, v. 40, n. 93, p. 069-076, 2012.

MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; DUARTE, I. D.; ZANI, L. B.; CORTE, V. B. Longevidade de sementes nativas da Floresta Atlântica. **Natureza on line**, v. 12, n. 4, p.185-194, 2014.

OLIVEIRA, F. L.; MOULIN, M. M.; BIANCHI, P. A.; PIMENTA, S.; RODRIGUES, R. Uso de marcadores ISSR para estimar a diversidade genética entre acessos de pimenta coletados no sul do estado do Espírito Santo. **Perspectiva Online**, v. 10, n. 3. p. 35-43, 2013.

PEDROLLO, C. T.; KINUPP, V. F.; SHEPARD JR., G.; HEINRICH, M. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical Survey and Environmental Conservation. **Journal of Ethnopharmacology**. 2016.

PEIXOTO, H.; ROXO, M.; KRSTIN, S.; WANG, X.; WINK, M. Anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Food**, v. 26, n. 1, p. 385-393, 2016.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B.; SILVA, A. **Sementes Florestais Tropicais: da Ecologia a Produção**. Sorocaba: UFSCAR. 2015

PIRES, I. E.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, R. L.; RESENDE JUNIOR, M. R. **Genética Florestal**. 1 Edição. Viçosa, MG: Editora Arka, 2011. 318p.

PIRES, M. V. V. **Estudo de características morfológicas e variabilidade genética de Baru e Araticum utilizando marcadores RAPD e microssatélites**. 70f. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

PURAYIL, F. T.; ROBERT, G. A.; GOTHANDAM, K. M.; KURUP, S. S.; SUBRAMANIAM, S.; CHERUTH, A. J. Genetic variability in selected date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars of United Arab Emirates using ISSR and DAMD markers. **Biotech**, v. 8, n. 109, p. 1-8, 2018.

RAMALHO, M. A. P.; FURTINI, I. V. Técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento vegetal: alcance e limites. **Ceres**, v. 56, n. 4, p. 473-479, 2009.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, p. 499-514, 1973.

ROCHA, E. Potencial ecológico para o manejo de frutos de açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart.) em áreas extrativistas no Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, nº 2, p. 237 – 250, 2004.

SANTONIERI, L.; BUSTAMANTE, P. G. Conservação *ex situ* e *on farm* de recursos genéticos: desafios para promover sinergias e complementaridades. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 11, n. 3, p. 677-690, 2016.

SANTANA, J. G. S.; NASCIMENTO, A. L. S., COSTA, T. S. ALMEIDA, T. M. B.; RABBANI, A.R.C.; SILVA, A. V. C. Estimation of genetic diversity in a natural population of cambui tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers. **Genetics and Molecular**, v. 15, n. 4, p. 2-11, 2016.

SCARIOT, A. O. Palmeiras brasileiras: Botânica, ecologia, usos e conservação. In: LOPES, R.; OLIVEIRA, M. S. P.; CAVALLARI, M. M.; BARBIERI, R. L.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. (editores técnicos). **Palmeiras Nativas do Brasil**. 1.ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. cap. 1, p. 17-33.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SEBBENN, A. M.; FREITAS, M. L. M.; ZANATTO, A. C. S.; MORAES, E. Seleção dentro de progênies de polinização aberta de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze (Lecythidaceae), visando à produção de sementes para recuperação ambiental. **Revista Instituto Floresta**, v. 21, n. 1, p. 27-37, 2009.

SENN, S. N.; FREITAS, M. L. M.; ZANATTO, A. C. S.; MORAES, E.; ZANATA, M.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Variação e parâmetros genéticos em teste de progênies de polinização livre de *Peltophorum dubium* (Sprengel) taubert em Luiz Antonio – SP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 95, p. 345 - 352, 2012.

SILVA, D. G.; CARVALHO, M. L. M.; NERY, M. C.; OLIVEIRA, L. M.; CALDEIRA, C. M. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Tabebuia serratifolia*. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2011.

SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, G. A. F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.46, n.9, p.1082-1088, 2011.

SIMON, M. F. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: Conservação in-situ**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010, 13p.

SINGH, S. K.; CHHAJER, S.; PATHAK, R.; BHATT, R. K.; KALIA, R. K. Genetic diversity of Indian jujube cultivars using SCoT, ISSR, and rDNA markers. **Tree Genetics & Genomes**, v.13, n.12. p. 1-14, 2017.

SOARES, A.N.R.; VITÓRIA, M.F.; NASCIMENTO, A.L.S.; LEDO, A.S.; RABBANI, A.R.C.; SILVA, A.V.C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, n. 15, v. 3, 2016.

SOUZA, D.C.L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.17, n.3, p.495-503, 2015.

STHAPIT, B.; PADULOSI, S.; MAL, B. Role of On-farm/*In situ* Conservation and Underutilized Crops in the Wake of Climate Change. **Indian Journal of Plant Genetic Resources**, v. 23, n. 2, p. 145-156, 2010.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONCECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B. Caracterização molecular de acessos de mandioca açucarados e não açucarados. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 455-461, 2011.

VALADEAU, C.; CASTILLO, J. A.; SAUVAIN, M.; LORES, A. F.; BOURDY, G. The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, 127, p. 175–192, 2010.

WADT, L. H. O.; RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; FERREIRA, E. J. L.; CARTAXO, C. B. C. **Manejo de açaí solteiro (*Euterpe precatória* Mart.) para produção de frutos.** Rio Branco, AC: Secretaria de Extrativismo e Produção Familiar, 2004. 34 p.

WETZEL, M. M. V. S.; REIS, R. B.; RAMOS, K. M. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. EMBRAPA: **Circular Técnica 26**, Brasília, p. 1-5, 2003.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.

YUYAMA, K.; MENDES, N. B.; VALENTE, J. P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 601-607, 2010.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. F.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatória* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-83, 1994.

ZUCHI, J.; FRANÇA-NETO, J. B.; SEDIYAMA, C. S.; LACERDA FILHO, A. F.; REIS, M. S. Physiological quality of dynamically cooled and stored soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 3, p. 353-360, 2013.



## CAPÍTULO I

### DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE *Euterpe precatoria* Mart. EM POPULAÇÕES NATURAIS NA AMAZÔNIA POR MARCADORES ISSR

#### RESUMO

O *Euterpe precatoria* Mart. é uma palmeira promissora da floresta amazônica, com multiplicidade de usos e benefícios ecológicos. Neste trabalho objetivou-se avaliar a diversidade e estrutura genética de três populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart. do Estado do Acre, por meio de marcadores moleculares ISSR. Inicialmente foi extraído DNA de 96 amostras foliares pelo método CTAB, os quais foram amplificados via PCR e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, seguido da fotodocumentação em luz UV para posterior avaliação. Os 24 *primers* ISSR selecionados amplificaram um total de 316 fragmentos, com média de 13 fragmentos. Os índices de diversidade genética Nei ( $H_e$ ) e Shanonn ( $I$ ) alcançaram valores médios de 0,11 e 0,17 para as três populações. Segundo AMOVA a maior diversidade genotípica aconteceu dentro das populações (77%) e entre as populações (23%). Foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas três populações para as estimativas do Coeficiente de Coancestria. Conclui-se que as populações de *Euterpe precatoria* Mart. possuem baixos níveis de diversidade genética, com maior divergência dentro das populações. Verificou-se que não há um padrão na estruturação da genética espacial dentro das populações, apresentando grande variação no coeficiente de coancestria, independente das classes distâncias geográficas, o que indica o cruzamento de indivíduos aparentados.

**Palavras chave:** Arecaceae; palmeira açai; conservação genética; marcadores moleculares; diversidade genética.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável da biodiversidade encontrada na Floresta Amazônica torna-se um tema cada vez mais relevante, principalmente, por ser fonte de espécies promissoras que apresentam potencial para diversos usos comerciais. Entre essas espécies, destaca-se o *Euterpe precatoria* Mart. (açai solteiro), que é uma palmeira tradicionalmente consumida por comunidades nativas da Amazônia. Porém, seu consumo aumentou recentemente devido as suas propriedades nutricionais e ao alto nível de antioxidantes presentes em seus compostos. Mesmo sendo uma espécie interessante economicamente, ainda não é cultivada de forma comercial, sendo ainda sub-utilizada (YUYAMA *et al.*, 2011; DÍAZ *et al.*, 2014; QUIROGA; GÓMEZ; LARES, 2017).

No entanto, mesmo considerando a importância ecológica e econômica para a região amazônica, Azêvedo *et al.* (2017) salientam que a exploração dos frutos de *E. precatoria* Mart. ainda é realizada de maneira extrativista. Este fato pode comprometer de forma negativa as populações naturais, ocasionando declínio da diversidade e variabilidade genética. Para Ramos *et al.* (2018), a espécie em questão é muito promissora e deve ser valorizada de acordo com sua importância, com esforços de investimento a curto prazo para dar inícios a estudos em domesticação, principalmente, na gestão e técnicas de conservação, pois a alta demanda atual compromete a oferta e os preços do mercado, estimulando a implementação de áreas de monocultura de indivíduos com pouca variabilidade genética.

Cardona (2010) definiu a diversidade genética como sendo a multiplicidade de frequências alélicas que se fazem presentes em um grupo de indivíduos, e que em conjunto com o ambiente, caracteriza a natureza do fenótipo.

Desta maneira, são importantes os estudos relacionados à caracterização da estrutura genética das populações em nível de diversidade. Eles podem gerar informações que auxiliam no desenvolvimento e recomendação de práticas de manejo sustentável, na definição de áreas de conservação e áreas com prioridades para o manejo dos recursos genéticos, além de ajudarem a projetar uma gestão mais eficiente dos programas de conservação. Como, por exemplo, direcionar estratégias de coleta de material para conservação em bancos de germoplasma e programas de melhoramento (GELETA; BRYNGELSSON, 2009; RAMALHO *et al.*, 2016; AZÊVEDO *et al.*, 2017).

A biotecnologia, especialmente, o uso de marcadores moleculares é uma ferramenta utilizada com sucesso em estudos de diversidade genética em populações

naturais. Com ela é possível realizar caracterização da diversidade entre os indivíduos, dentro e entre populações. Existem diversos marcadores moleculares, apresentando todos suas vantagens e desvantagens, a depender do objetivo do estudo. Contudo, os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat* – Inter Repetições de Sequência Simples) têm sido empregados com êxito nos estudos de diversidade genética, pois de acordo com Lorenzoni *et al.* (2014), esse tipo de marcador permite a identificação de ampla variabilidade intra e interespecíficas.

Os marcadores ISSR são fragmentos de DNA obtidos a partir da amplificação via PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando-se de único *primer*, com tamanho entre 16 a 20 pares de bases (FALEIRO, 2007). Na literatura é comum encontrar uma série de vantagens sobre esse marcador, podendo-se citar: a necessidade de pouca infraestrutura em termos de equipamento de laboratório (SOUZA *et al.*, 2008); alto grau de polimorfismo e reprodutibilidade (SANTANA *et al.*, 2011); dispensar de conhecimento prévio do genoma da espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2014); requerer pouca quantidade da amostra de DNA (GOYAL *et al.*, 2015); é considerada uma técnica simples, rápida, confiável e de baixo custo (PURAYIL *et al.*, 2018). Por outro lado, apresenta como principal desvantagem ser um marcador de natureza dominante (SOARES *et al.*, 2016).

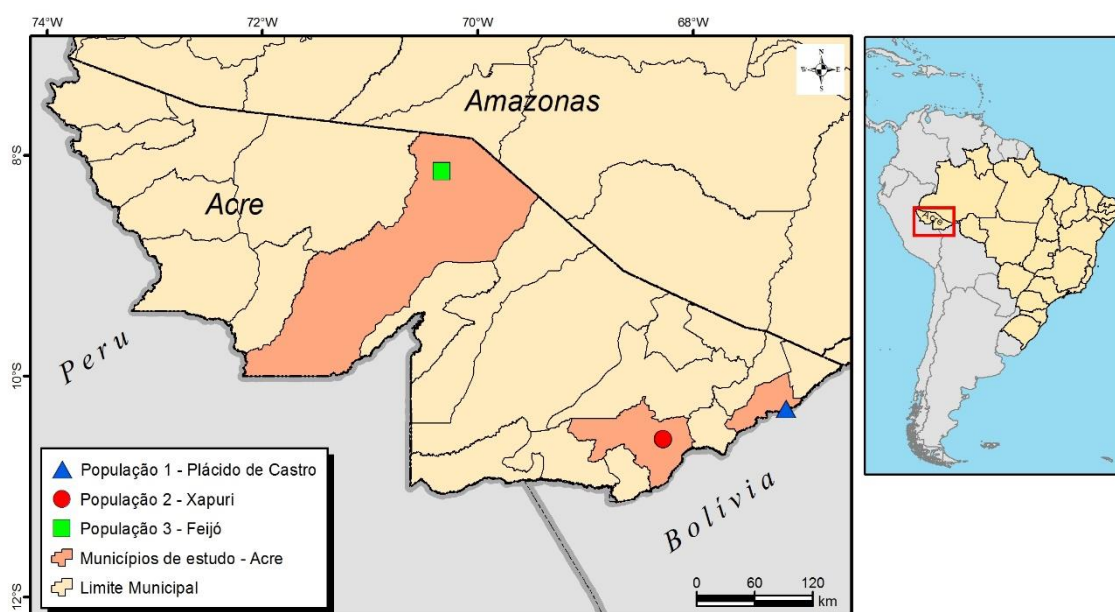
Os marcadores ISSR têm se mostrado eficientes na caracterização da diversidade genética de algumas palmeiras, como: *Copernicia prunifera* - carnaúba (VIEIRA *et al.*, 2015) e *Elaeis guineenses* Jacq. - dendê (CHAGAS *et al.*, 2015). No entanto, até o momento não foi encontrado na literatura estudos com uso desse marcador com intuito de averiguar diversidade e a estrutura genética para a espécie *Euterpe precatoria* Mart. (SÁNCHEZ, 2013; LIMA, 2014; AZEVEDO *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2018).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade e estrutura genética de *Euterpe precatoria* Mart. em populações naturais no Estado do Acre, com a utilização marcadores moleculares ISSR.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de coleta de material vegetal

Para avaliação da diversidade genética foram coletadas amostras foliares novas de 96 indivíduos georreferenciados oriundos de três populações naturais localizadas no Estado do Acre (Figura 1), nos municípios de Plácido de Castro - População 1, Xapuri - População 2 e Feijó - população 3, sendo 32 indivíduos de cada população.



**FIGURA 1.** Localização das populações estudadas, mapa do Brasil com ênfase no Estado do Acre e localização nos municípios. Observar as figuras geométricas, onde: triângulo em azul = População 1- Plácido de Castro; círculo vermelho = População 2- Xapuri; quadrado verde = População 3- Feijó.

A primeira população coletada foi no município de Plácido de Castro, local com características de floresta de várzea. De acordo com Rodrigues *et al.* (2003), a floresta de várzea deste município é representada por espécies adaptadas a solos com excesso de água, com dominância de ciperáceas, espécies lenhosas xeromórficas com xilopódios e palmeiras. Segundo os mesmos autores os solos dessas áreas foram desenvolvidos em rochas moles, constituídos por argilitos silticos e siltitos argilosos que imprimem ao solo uma baixa permeabilidade e pobres condições físicas.

As coletas das demais populações ocorreram em locais de terra firme, nos municípios de Xapuri com predominância de Argissolos, e Feijó onde predominam os

Cambissolos (ACRE, 2010). Nessas duas últimas populações o tipo de vegetação pode se enquadrar como Floresta Aberta com Palmeiras com associação com Floresta Densa.

Na Tabela 1, encontra-se maior detalhamento sobre a caracterização do relevo e climática dos municípios do Estado do Acre onde localizam-se as populações naturais em estudo.

**TABELA 1.** Caracterização de climática e relevo dos municípios nos quais estão localizadas as populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart. em estudo

Características	Municípios / Populações		
	Plácido de Castro - P1	Xapuri - P2	Feijó - P3
Altitude média (m)	144	175	159
Clima (Köppen)	Equatorial quente e úmido (Am)	Equatorial quente e úmido (Am)	Equatorial quente e úmido (Am)
Precipitação média anual mm	1.853	1.830	2.205
Umidade relativa do ar média anual (%)	80	81	84
Temperatura média anual (°C)	26,3	25,8	25,8
Relevo	pano a suave ondulado	pano a suave ondulado	pano a suave ondulado

Fonte: Adaptado de [www.climate-data.org](http://www.climate-data.org)

Após a coleta, as amostras foliares foram acondicionadas em tubos falcon contendo sílica gel, identificadas. Em seguida, elas foram transportadas de avião para Brasília-DF, aonde encontra-se o Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMPRAPA CENARGEN), e permaneceram armazenadas em freezer a -80°C até o momento da extração do DNA.

## 2.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA foi utilizado aproximadamente 150 mg de tecido foliar, por meio do método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Cada amostra de DNA foi fracionada e inserida em tubo de 2 mL contendo cerca de 12 *beads* (esferas de metal), e adicionado 700µL da solução CTAB 2% + 2-mercaptoetanol. Em seguida, o material vegetal foi triturado em *TissueLyser* por um minuto. Após trituração, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C por 60

minutos, agitando-as a cada 10 minutos. Após esse período, as amostras foram retiradas e deixadas esfriar por cinco minutos.

Em capela de exaustão, as amostras foram adicionadas 600  $\mu\text{L}$  de CIA 24:1 (solução clorofórmio e álcool isoamílico), agitadas por aproximadamente 30 segundos e centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. Na sequência foi retirada a fase superior de cada amostra e transferida para tubos de 1,5 mL previamente identificados. Foi acrescentado então 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado as amostras e armazenadas em freezer  $-20^\circ\text{C}$  por 30 minutos, homogeneizando-as a cada 15 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm.

Após a retirada por inversão de toda solução, cuidadosamente para não descartar o pellet foi realizada uma sequência de lavagens em 500  $\mu\text{L}$  de etanol nas concentrações de 70 e 100%, sempre centrifugando-se as amostras por 5 minutos a 12.000 rpm.

O DNA precipitado, após última lavagem em etanol 100%, foi deixado em temperatura ambiente para secagem e posteriormente solubilizado em Tris-EDTA. Para quantificação da concentração total de DNA extraído foram analisadas as imagens obtidas em géis de agarose a 1% em luz de Ultra Violeta (UV) em fotodocumentador, e quando necessário diluído a 3 a 20  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e conservado em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até utilização.

### **2.3 Amplificação do DNA extraído**

Para cada amostra amplificada foram utilizados uma solução de volume final de 13  $\mu\text{l}$ , constituída de 2,84  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, 1,3  $\mu\text{L}$  de tampão IB 10X, 1,3  $\mu\text{L}$  de BSA ( $2,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 1,3  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2,5 mM), 0,26  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase ( $5 \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de *primer* (1,2 mM) e 3  $\mu\text{L}$  de DNA genômico ( $3 \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ).

As amplificações do DNA extraído foram realizadas por PCR em termocicladores Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®), executando-se 37 ciclos de amplificação, sendo, uma etapa de iniciação de cinco minutos a  $94^\circ\text{C}$ , uma etapa de desnaturação a  $94^\circ\text{C}$  por 45 segundos e, uma etapa de ligação do *primer* ISSR ao DNA a  $56^\circ\text{C}$  por 45 segundos, além de uma etapa de síntese da cadeia complementar pela DNA polimerase a  $72^\circ\text{C}$  por um minuto e, por fim a etapa de extensão das cadeias a  $72^\circ\text{C}$  por sete minutos.

As soluções resultantes do processo de amplificação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo (13,5  $\mu\text{L}$ ). Em seguida foi realizada a fotodocumentação dos géis em luz UV, utilizando o marcador de

DNA *ladder* de 1 Kb (Invitrogen®) para estimar o tamanho molecular dos fragmentos amplificados.

No total, foram testados 57 *primers* aleatórios (Sigma-Aldrich®), para identificar quais deles apresentaram o melhor perfil de fragmento. Para isso foram separadas aleatoriamente oito amostras de DNA do conjunto total de indivíduos. Para seleção dos *primers* seguiu-se os critérios de acordo com Vieira *et al.* (2015), ou seja, com maior número de fragmentos e boa resolução. Destes, foram escolhidos 24 *primers* para serem utilizados nas 96 amostras.

## 2.4 Análise dos dados pelo marcador ISSR

Os resultados obtidos por meio dos marcadores ISSR foram avaliados a partir das fotografias dos géis, onde foram registradas a ausência (0) ou presença (1) dos fragmentos amplificados, sendo possível a constituição da matriz binária utilizada nas análises estatísticas.

Os parâmetros de diversidade genética, como número (P) e percentual de locos polimórficos (P%), número de alelos observados (Na) e efetivos (Ne), diversidade genética de Nei (He), índice de Shannon (I) foram calculados com auxílio do programa POPGENE (YEH *et al.*, 1997).

Para estimar a eficiência dos *primers* ISSR utilizados em detectar polimorfismo entre dois indivíduos, foi calculado o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), utilizando-se seguinte fórmula (ROLDAN-RUIZ *et al.*, 2000):

$$PIC = 2P_i \cdot (1 - P_i)$$

Onde:  $P_i$  é a frequência de fragmentos polimórficos amplificados e,  $1 - P_i$  é a frequência do alelo nulo.

Para determinar o comportamento da diversidade genética dentro e entre as populações foi estimada a análise de variância molecular (AMOVA) usando o programa ARLEQUIN v.3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

Os parâmetros de identidade e a distância genética de Nei (1978) foram estimados por meio do programa POPGENE. A análise de coordenadas principais (PCoA), utilizando a distância Euclidiana, foi realizada visando representar as distâncias genéticas

entre as populações, através do programa GeneAIEx v.6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Foi estimado também o coeficiente de coancestria genética, com objetivo de avaliar o padrão de estrutura espacial entre as populações pelo coeficiente de kinship entre pares de indivíduos para cada uma das classes de distância, com auxílio do programa SPAGeDI, versão 1.2 (HARDY; VEKEMANS, 2005). Foram preestabelecidas diferentes classes de distância de acordo com as populações. Foram calculados coeficientes a partir da correlação entre as distâncias genéticas e as matrizes de conectividade espacial, considerando intervalos de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente de coancestria médio estimado para classe de distância. Para testar a ocorrência de estrutura genética espacial dentro de cada classe de distância, utilizaram-se 10.000 permutações.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação do Marcador Molecular ISSR

A metodologia de extração e amplificação do DNA mostrou-se eficiente na detecção de polimorfismo para os indivíduos coletados das três populações de *Euterpe precatoria* Mart.. Dos 57 primers ISSR testados, 24 foram selecionados e utilizados no estudo da diversidade genética de *E. precatoria* Mart., conforme Tabela 2.

**TABELA 2.** Primers ISSR, sequência de nucleotídeos, número de fragmentos amplificados (locos), PIC (Conteúdo de Informações Polimórficas), percentagem de fragmentos amplificados e amplitude dos fragmentos (pb = pares de base)

Nome do primer	Sequência (5'3')	Fragmentos amplificados de DNA	PIC	Fragmentos polimórficos (%)	Amplitude dos locos
ISSR 15 zm	GTGCACACACACACACAC	10	0,30	30,0	300-1650
ISSR 17 zm	CAGCTCTCTCTCTCTCTC	13	0,53	53,85	300-1650
ISSR 18 zm	GTGCTCTCTCTCTCTCTC	12	0,66	66,67	400-1650
ISSR 27 zm	GTACTTCTTCTTCTTCTTC	13	0,61	61,54	300-2000
ISSR 32 zm	AGCAGCAGCAGC	16	0,31	31,25	200-2000
ISSR 35 zm	AGCAGCAGCAGCG	09	0,33	33,33	300-2000
ISSR 38 zm	AGCAGCAGCAGCAT	11	0,72	72,73	400-3000
ISSR 39 zm	AGCAGCAGCAGCAC	14	0,42	42,86	200-3000
ISSR 50 zm	CCAGCTGCTGCTGCT	13	0,76	76,92	300-3000
ISSR 52 zm	GGCACCACACACACACACACA	22	0,63	63,64	200-2000
ISSR 53 zm	CGCAACACACACACACACACA	15	0,60	60,0	300-1650
ISSR 54 zm	GGCTACACACACACACACACA	18	0,38	38,89	200-1650
ISSR 55 zm	CCTCCACACACACACACACA	17	0,64	64,71	200-1650
ISSR 56 zm	GCTACCACACACACACACACA	14	0,28	28,57	200-1650
ISSR 57 zm	CGTCCACACACACACACACA	14	0,35	35,71	200-2000
ISSR 58 zm	CGAACCACACACACACACACA	13	0,30	30,77	200-1650
ISSR 59 zm	GGCCAGCTGCTGCTGCTGCTGCT	7	0,57	57,14	700-2000
ISSR 6 pv	GACAGACAGACART	9	0,66	66,67	300-2000
ISSR 7 ps	AGAGAGAGAGAGAGAGYG	13	0,69	69,23	300-1650

ISSR 9 ps	ACACACACACACACACYA	9	0,66	66,67	400-2000
ISSR 10 ps	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	15	0,60	60,0	200-2000
ISSR UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	11	0,63	63,64	300-2000
ISSR UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	18	0,83	83,33	300-1650
ISSR UBC 857	ACACACACACACACACYG	10	0,40	40,0	300-1650

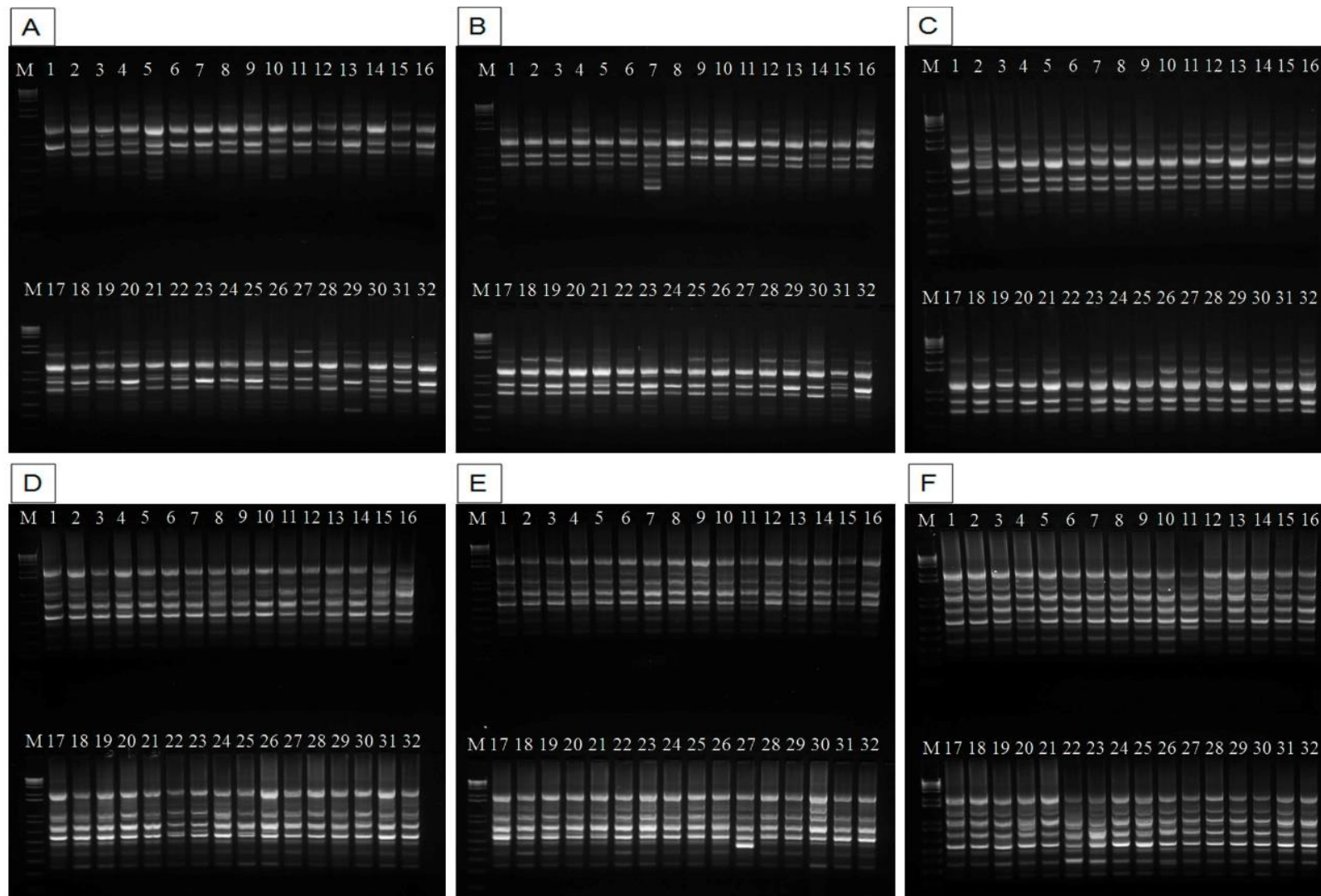
R= purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).

Os *primers* geraram um total de 316 fragmentos de DNA, com média de 13 fragmentos. O número de fragmentos amplificados teve uma amplitude mínima e máxima entre 7 a 22, isto para os *primers* ISSR 59 ZM e 52 ZM. Em relação ao percentual de fragmentos polimórficos, todos os *primers* apresentaram polimorfismo igual ou superior a 30%, mas destacaram-se os *primers* UBC 840 (83,33%), 50 ZM (76, 92%), 38 ZM (72,73%), 7 PS (69,23%), 9 PS, 6 PV e 18 ZM (66,67%), 55 ZM (64,71%) e 52 ZM (63,64%).

Para avaliar a eficiência dos *primers* ISSR em indicar o polimorfismo entre dois indivíduos, pela ausência ou presença de fragmentos, foi calculado o PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica), com valores que variaram entre 0,30 a 0,83, respectivamente, dependendo do *primer* utilizado, e em média de 0,60 (Tabela 1).

Segundo Botstein *et al.* (1980), os marcadores são classificados de acordo com o conteúdo de informação polimórfica, em pouco informativo, com valores inferiores a 0,25, moderadamente informativo de 0,25 a 0,5 e valores acima de 0,5 em altamente informativo. Para este estudo todos os marcadores enquadram-se de moderado a altamente informativo. De acordo com Costa *et al.* (2015), este parâmetro auxilia na classificação dos *primers* conforme a eficiência na detecção do polimorfismo, servindo como base para selecionar os *primers*.

Na Figura 2 observa-se o perfil dos fragmentos gerados pelos *primers* ISSR 9 PS e 35 ZM para 96 indivíduos das três populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart..



**FIGURA 2.** Perfil de fragmentos ISSR provenientes das ampliações dos *primers* 9 PS e 35 Zm de *Euterpe precatoria* Mart. em três populações naturais do Estado do Acre. A- *Primer* 9 PS para 32 indivíduos da população 1 (Plácido de Castro); B- *Primer* 9 PS para 32 indivíduos da população 2 (Xapuri); C- *Primer* 9 PS para 32 indivíduos da população 3 (Feijó); D- *Primer* 35 ZM para 32 indivíduos da população 1 (Plácido de Castro); E- *Primer* 35 ZM para 32 indivíduos da população 2 (Xapuri); F- *Primer* 35 ZM para 32 indivíduos da população 3 (Feijó). M - Marcador.

### 3.2 Diversidade Genética Populacional

O índice de diversidade genética Nei ( $H_e$ ), assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, alcançou valor médio de 0,11 ( $\pm 0,01$ ), com o maior número de alelos observados ( $N_a$ ) e efetivos ( $N_e$ ) para os indivíduos da população 1, de 1,38 e 1,21, respectivamente. No entanto, para as outras populações os esses valores são minimamente inferiores, e não apresentaram diferenças significativas a 5% de probabilidade ( $p > 0,05$ ). Outro parâmetro utilizado para estimativa da diversidade genética entre as populações foi de índice de Shannon ( $I$ ), que atingiu o valor médio de 0,17 ( $\pm 0,01$ ) para as três populações (Tabela 3).

**TABELA 3.** Distribuição da diversidade genética de três populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart. no Estado do Acre, a partir de marcadores ISSR

População	Parâmetros de Diversidade Genética					
	$N_a$	$N_e$	I	$H_e$	P (%)	P
Pop. 1 Plácido de Castro/AC	1,38 ( $\pm 0,03$ )	1,21 ( $\pm 0,02$ )	0,18 ( $\pm 0,01$ )	0,12 ( $\pm 0,01$ )	39,56	125
Pop. 2 Xapuri/AC	1,32 ( $\pm 0,03$ )	1,19 ( $\pm 0,02$ )	0,17 ( $\pm 0,01$ )	0,11 ( $\pm 0,01$ )	33,86	107
Pop. 3 Feijó/AC	1,36 ( $\pm 0,03$ )	1,18 ( $\pm 0,02$ )	0,16 ( $\pm 0,01$ )	0,10 ( $\pm 0,01$ )	36,71	116
<b>Total</b>	1,35 ( $\pm 0,02$ )	1,19 ( $\pm 0,01$ )	0,17 ( $\pm 0,01$ )	0,11 ( $\pm 0,01$ )	36,71	116

Na: número de alelos observados; Ne: número de alelos efetivos; He: diversidade genética de Nei; I: Índice de Shannon; P (%): porcentagem de locos polimórficos; P: nº de locos polimórficos; (...): desvio padrão.

As estimativas dos índices de Nei ( $H_e$ ) e Shannon ( $I$ ) encontradas nesse estudo, são indicativos de níveis baixos de diversidade genética dentro e entre as populações. Conforme Giustina *et al.* (2014), quanto mais o índice de Shannon ( $I$ ) se aproxima de 0 menor é a diversidade genética presente na população. Resultados estes confirmados também pelo percentual de locos polimórficos que em média atingiram aproximadamente 37%.

Esses valores inferiores dos índices de diversidade genotípica dentro das populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart. não era esperada, principalmente, por se tratar de uma espécie alógama, ou seja, que necessita da flor de outro indivíduo para fecundação, conceitualmente denominada de fertilização cruzada. Por outro lado, outros fatores podem explicar esse comportamento, como: a pressão antrópica sobre essas populações, especialmente, pela exploração dos frutos para alimentação e comercialização do açaí, contribuindo para a diminuição da densidade de indivíduos,

considerando que as sementes são a única alternativa de regeneração natural da espécie, por não apresentar perfilhos, e conseqüentemente, o cruzamento de indivíduos aparentados (endogamia); outra hipótese pode ser atribuída à diminuição do fluxo gênico, pela ausência ou dificuldade dos agentes polinizadores e dispersores de sementes em virtude da fragmentação da vegetação; ou as populações poderem ser originadas por poucos genótipos. Deve-se considerar também a metodologia aplicada nesse estudo, e em pesquisas futuras, talvez se deva aumentar o esforço amostral, as distâncias entre os indivíduos e/ou outro tipo de marcador.

Gonçalves *et al.* (2010) afirmam que se a coleta de frutos for efetuada sem planejamento, pode resultar na erosão da variabilidade genética, por restrições na disseminação de sementes, com reflexos no sucesso reprodutivo e na regeneração natural.

Lima (2014) encontrou valor médio de diversidade genética Nei ( $H_e$ ) = 0,49 para três populações de *Euterpe precatoria* Mart. no estado do Amazonas, resultado superior ao alcançado no presente estudo, porém, com uso de marcadores microssatélites. Com esse mesmo marcador e espécie Ramos *et al.* (2018) também observaram altos níveis de diversidade genética (variação  $H_e = 0,58 - 0,62$ ) de uma população no Amazonas, independentemente dos estádios ontogenéticos dos indivíduos (reprodução de polinização aberta, imaturos, jovens e plântulas), mantendo os padrões semelhantes de diversidade genética ao longo de gerações, porém, com a população se encontrando-se em uma floresta em clímax.

Com uso de marcadores ISSR em palmeira, os valores mais próximos ao desse estudo foram estimados por Chagas *et al.* (2015), em uma população de *Elaeis guineensis* Jacq., conhecida popularmente como dendê, onde a diversidade genética de Nei ( $H_e$ ) foi de 0,194 ( $\pm 0,210$ ) e o índice de Shannon ( $I$ ) de 0,2850 ( $\pm 0,3004$ ). Os autores justificam esses resultados em função da análise de gargalo genético, que indicou que a população sofreu redução de tamanho com o decorrer dos anos, por prováveis atividades agrícolas e à perda de habitats.

Se esses baixos níveis de diversidade genética nas populações de *Euterpe precatoria* Mart. no estado do Acre estiverem realmente atribuído ao comportamento da espécie, torna-se algo preocupante, pois a exploração não racional dessa espécie pode leva-lá à vulnerabilidade. Torna-se cada vez mais importantes estratégias de conservação.

Apesar da baixa diversidade genética estimada pelos índices de Nei ( $H_e$ ) e Shanonn ( $I$ ) para a espécie nessas populações, através da análise de variância molecular (AMOVA) foi possível notar que a maior diversificação genotípica acontece

significativamente ( $p < 0,01$ ) dentro das populações, representando 77% da variação total ocorrida, e que apenas 23% está relacionado à variância molecular entre as populações (Tabela 4). É provável, que esse ocorrido seja devido à distância geográfica entre as populações, o que esclarece que em comparação a níveis de diversidade genética as mesmas sejam pouco semelhantes.

**TABELA 4.** Análise de variância molecular (AMOVA) para dois níveis hierárquicos de três populações naturais de *Euterpe precatoria* Mart. no Estado do Acre, Brasil

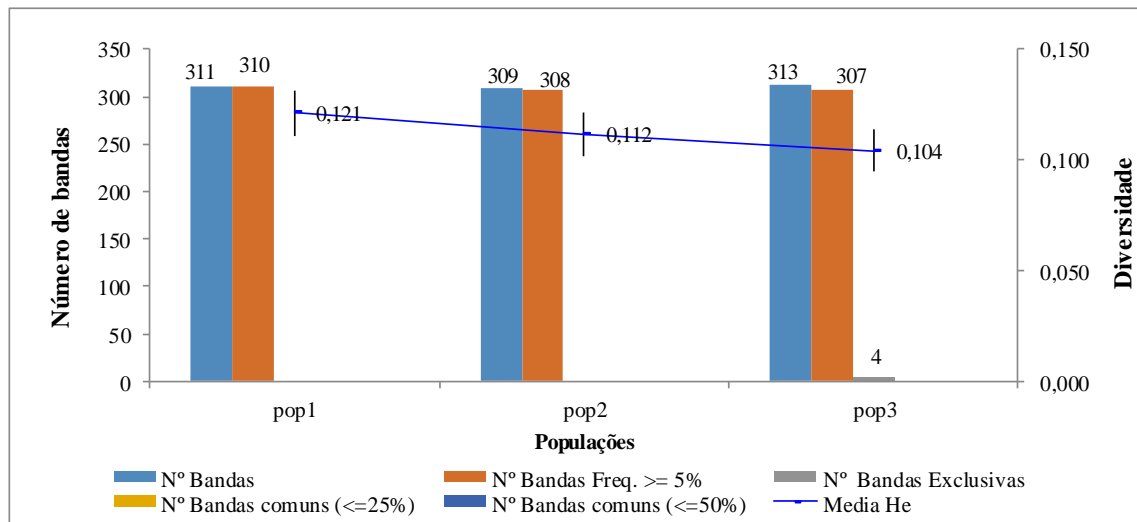
F. V	GL	SQ	QM	S <sup>2</sup>	Varição total (%)
Entre população	2	409,719	204,859	5,810	23%
Dentro de população	93	1760,313	18,928	18,928	77%
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>2170,031</b>		<b>24,738</b>	<b>100%</b>

F.V =Fonte de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; S2 = variância.

Lacerda e Kageyama (2003) relatam que a maior variabilidade genética das espécies arbóreas alógamas, como é o caso da *Euterpe precatoria* Mart., ocorre dentro de populações e destaca a importância de conhecer suas causas.

Os resultados da análise de variância molecular desse estudo, corroboram com os obtidos por Rossi *et al.* (2014), também usando os marcadores ISSR para a palmeira *Mauritia flexuosa* L. f. (buriti). Os autores concluíram que a maior variância total ocorreu dentro de populações (84,14%), e somente 15,87% entre populações.

Observa-se, na Figura 3 que em relação ao número das bandas e número de bandas frequentes  $\geq 5\%$  seguiu o mesmo padrão para as três populações, e não apresentou bandas comuns em nenhuma das delas. As populações 1 e 2 não apresentaram bandas exclusivas, enquanto que a população 3 mesmo com menor valor de índice de Nei ( $H_e$ ) = 0,104, foi observado quatro bandas exclusivas, ou seja, frequências alélicas específicas para esta população, fator que, possivelmente, está relacionado a capacidade adaptativa de determinados genótipos a condições ambientais específicas como solo, altitude, umidade, relevo, entre outros. Vale ressaltar que a população 3 é a mais distante geograficamente das demais.



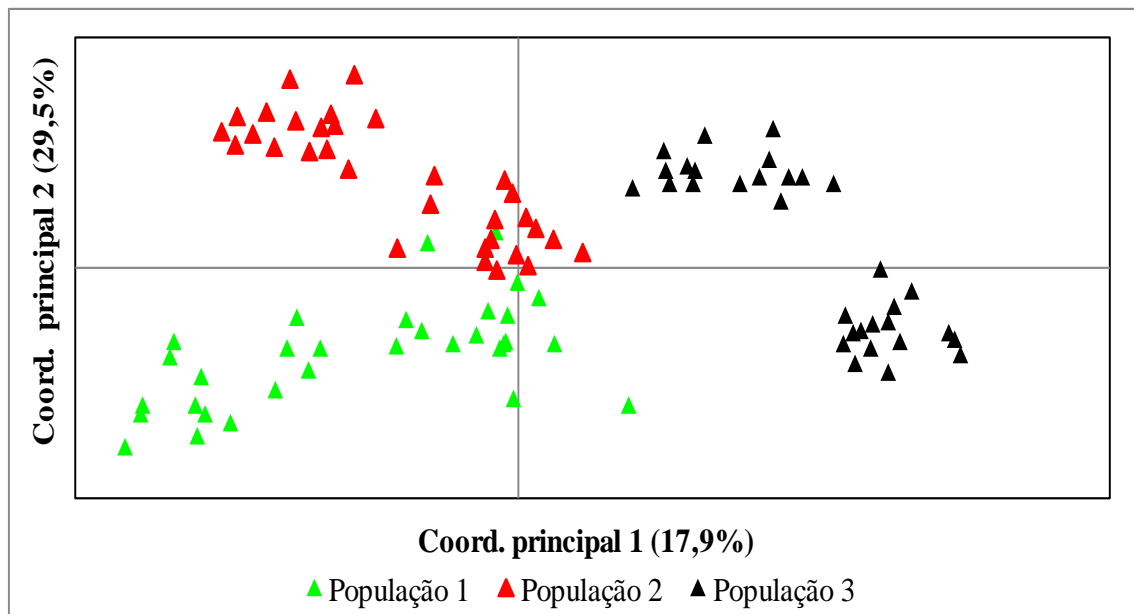
**FIGURA 3.** Padrões totais de bandas para as três populações de *Euterpe precatória* Mart., considerando o número total de bandas polimórficas e índice de diversidade de Nei.

A distância genética de Nei variou de acordo com as distâncias geográficas das populações naturais de *Euterpe precatória* Mart., sendo a distância genética entre as populações 1 e 2, nos municípios de Plácido de Castro e Xapuri, de 0,037 e a estimativa da identidade de Nei foi de 0,963, com distância geográfica de 129 km. E entre as populações 1 e 3 em Plácido de Castro e Feijó a distância genética foi de 0,053, com identidade de Nei estimada em 0,949, distantes 425 km. Para as populações 2 e 3 localizadas em Xapuri e Feijó, distantes cerca de 351 km, a distância genética foi de 0,051 e identidade de Nei 0,951.

Nei (1978) apresenta uma classificação da distância genética como baixa, no caso de distâncias menores que 0,05; média em distâncias entre 0,05 e 0,15, e alta quando as distâncias forem maiores que 0,15. Para as populações em estudo, tem-se que quanto menor a distância geográfica, menor a distância genética, que é o caso entre as populações 1 e 2, considerada baixa. Já para as demais distâncias entre populações, foram consideradas médias, sendo também geograficamente mais distantes.

Os resultados de distância genética de Nei foram confirmados pela análise de coordenadas principais (PCoA), obtidas pela distância euclidiana, considerando as três populações (Figura 4). Verificou-se que os dois primeiros eixos respondem por 47,4% da variação total, demonstrando que estão estruturadas geneticamente. Mesmo sendo possível visualizar a separação dos indivíduos em três grupos, ou seja, as três populações, indicando que de fato ocorre variação genética entre elas, existe uma maior similaridade

entre as populações 1 e 2 pela aproximação de indivíduos que compartilham alelos comuns nessas duas populações.

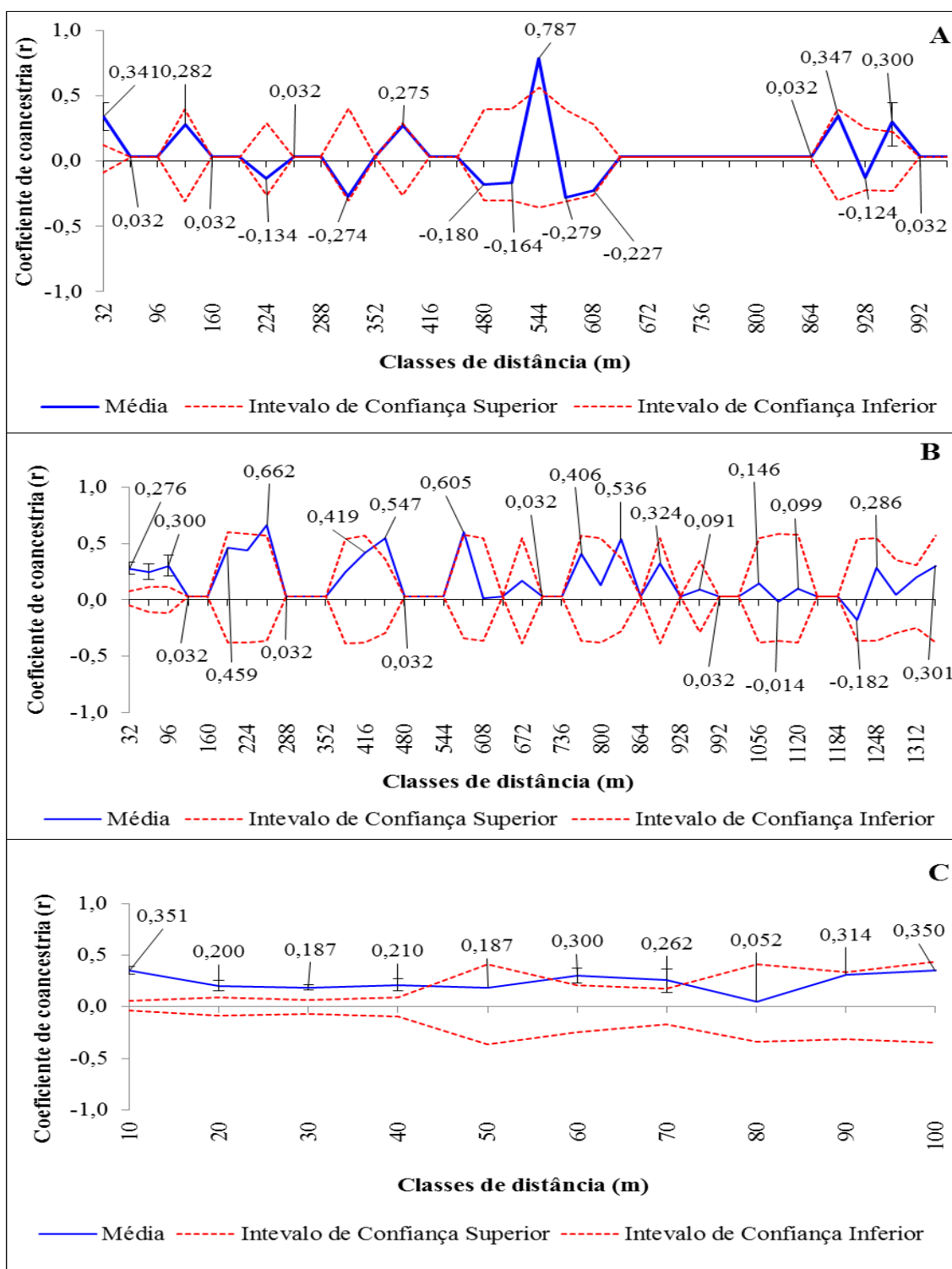


**FIGURA 4.** Análise de coordenadas principais dos 96 indivíduos de *Euterpe precatoria* Mart. de três populações naturais no Estado do Acre, por meio dos marcadores moleculares ISSR.

### 3.3 Estrutura Genética Espacial

As estimativas do coeficiente de coancestria dentro das classes de distâncias geográficas e entre pares de indivíduos sofreu variações relevantes de acordo com cada população estudada, e diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) foram observadas para as três populações (Figura 5). Ressalta-se que coancestria são probabilidades, portanto, este parâmetro varia entre 0 e 1.





**FIGURA 5.** Correlograma para o coeficiente de coancestria para classes de distância entre os indivíduos de três populações de *Euterpe precatoria* Mart., com intervalo de confiança a 95% de probabilidade. A - População 1 (Plácido de Castro); B - População 2 (Xapuri); C - População 3 (Feijó).

Os resultados do coeficiente de coancestria apontaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) com valores positivos e negativos entre os indivíduos para as três populações, independentemente da distância geográfica entre eles, sem estabelecer um padrão de distribuição na estrutura genética espacial.

Na População 1, obteve-se grande variação no coeficiente de coancestria ao longo das classes de distâncias, sendo  $\Theta_{xy} = 0,341$  para os pares de indivíduos localizados na primeira classe de distância com até 32m, compartilham de alelos comuns com grau de parentesco entre irmãos completos e entre pais e filhos. Após essa classe, como aumentou a distância geográfica houve um decréscimo no grau de parentesco, ocorrendo valores próximos à zero ou negativos até a classe cinco com 288m de distância. Porém, a maior estimativa ( $\Theta_{xy} = 0,787$ ) foi observada na classe de número oito, com 544m de distância entre os pares de plantas, sugerindo o cruzamento entre irmãos de autofecundação.

A População 2 também revelou grande a variação no coeficiente de coancestria, mesmo com o aumento das classes de distância geográfica de até aproximadamente 1300m, contudo, foram observados os maiores picos ( $\Theta_{xy} = 0,419$  -  $\Theta_{xy} = 0,660$ ) para os indivíduos presentes nas classes de distâncias 5, 7, 8, 10, 13 e 14 (288 a 864m), sendo esses valores próximos ao assumidos entre irmãos de autofecundação e autocoancestria de indivíduos não endogâmicos, indicando endogamia.

Para População 3 foram encontrados apenas valores de coeficiente de coancestria positivos e, com os maiores valores  $\Theta_{xy} = 0,351$  e  $0,350$  nos pares de indivíduos presentes nas classes de menor e maior distância com 10 e 100m, respectivamente, indicando o cruzamento entre irmãos completos e entre pais e filhos. O menor valor estimado foi para classe de distância com 80 m com  $\Theta_{xy} = 0,052$ , próximo ao esperado entre primos de primeiro grau.

A falta de um padrão estabelecido, apresentando oscilações nos valores de coancestria nas diferentes classes de distâncias, independente da distância geográfica, podem estar relacionados a diversos fatores, como ao próprio sistema reprodutivo da espécie (alogamia). De acordo com Lima (2014), a reprodução da mesma é, predominantemente, por cruzamentos e que ocorreram cruzamentos entre indivíduos parentes; os agentes de polinização, que são principalmente insetos (besouros e abelhas) e ocasionalmente pelo vento, podem levar os grãos de pólen a maiores distâncias, inclusive polinizar vários indivíduos com o mesmo material genético. Outro fator é a síndrome de dispersão de suas sementes, sendo os animais, os principais vetores de transporte das sementes, que também favorecem a disseminação mais distante. Ou

explicada também pela baixa divergência genética encontrada dentro das populações, como já discutido anteriormente.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os retratados por Lima (2014) para a mesma espécie *Euterpe precatoria* Mart em populações no Amazonas, por meio dos marcadores microssatélites, na qual, observou que até 56 km os indivíduos apresentaram grau de parentesco. Embora estejam destoantes dos verificados por Ramos *et al.* (2018), em uma população em floresta clímax no Amazonas também com uso dos marcadores microssatélites, que notaram baixos valores de coeficientes de coancestria, variando de  $\Theta_{xy} = 0.0161$  para indivíduos na fase reprodutiva a  $\Theta_{xy} = 0.0312$  na fase de plântulas.

A estrutura genética espacial em populações naturais é influenciada por diversos fatores, mas na maioria dos casos, é decorrente de limitações na dispersão de genes via sementes e pólen, deriva genética e seleção, que podem favorecer um ou diferentes genótipos (MOURA *et al.*, 2009; EPPERSON, 1992). Segundo Moraes, Kageyama e Sebbenn (2005), a principal consequência da estruturação é o aumento da probabilidade de ocorrer o cruzamento entre indivíduos parentes, causando endogamia na população. Ramos *et al.* (2018) justificam alguns níveis de endogamia pela polinização aberta para formação de sementes.

Contudo, de acordo com Gonçalves *et al.* (2010), para definir a escala espacial de estudos e poder fazer deduções com relação a distribuição espacial dos genótipos, são necessárias informações importantes sobre a história de vida e mecanismos de dispersão das espécies.

#### 4. CONCLUSÕES

- Os marcadores moleculares ISSR se mostram eficientes para avaliação da diversidade genética de populacional de *Euterpe precatoria* Mart.;
- Os índices de diversidade avaliados revelam níveis baixos de diversidade genética para a espécie dentro das três populações estudadas;
- A divergência genotípica ocorre, principalmente, dentro das populações;
- As populações 1 e 2 são mais próximas em relação a distância genética Nei;
- Não há um padrão na estruturação da genética espacial dentro das populações, ocorrendo grande variação dos coeficientes de coancestria, independente das classes de distâncias geográficas;
- Os valores elevados dos coeficientes de coancestria encontrados nas três populações indicam o cruzamento de indivíduos aparentados, o que também pode explicar a baixa diversidade encontrada nas populações estudadas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZÊVEDO, H. S. F. S.; BENVINDO, F. D.; CAVALCANTE, L. N.; HAVERROTH, M.; WADT, L. H. O; CAMPOS, T. Transferability of heterologous microsatellite loci between species of *Euterpe* genus. **Genetics and Molecular Research**, v.16, n. 4, p. 1-7, 2017.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

CARDONA, J. O. Análisis de diversidad genética de las razas colombianas de maíz a partir de datos Roberts *et al.*, (1957) usando la estrategia WardWLM. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 2, n.1, p. 199-207, 2010.

CHAGAS, K. P. T.; SOUSA, R. F.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineenses*. **Revista Brasileira Ciências Agrárias**, v.10, n.1, p.147-152, 2015.

COSTA, D. F.; VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CHAGAS, K. P. T. C. Diversidade genética e seleção de iniciadores ISSR em uma população natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

DOYLE, J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

DÍAZ, R. O.; CARDONA, J. E.; CARRILLO, M.; HERNÁNDEZ, M. S.; FERNÁNDEZ-TRUJILLO, J. P.; GUTIÉRREZ, R. H.; LARES, Y. M. Postharvest handling and uses of asaí (*Euterpe precatoria*) fruit. **Acta Horticulturae**, v. 1047, p. 269-274, 2014.

EPPERSON, B. K. Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. **New Forests**, v. 6, p. 257- 278, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN: a software for opulation data analysis. Version 3.1. Geneva: University of Geneva, 2007. Disponível em: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

GELETA, M.; BRYNGELSSON, T. Inter simple sequence repeat (ISSR) based analysis of genetic diversity of *Lobelia rhynchopetalum* (Campanulaceae). **Hereditas**, v.146, n.1, p. 122-130, 2009.

ACRE. **Guia para o uso da terra acreana com sabedoria: Resumo educativo do Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre: fase II** (escala 1: 250.000) Rio Branco: Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Acre, 2010. 152p.: il.

GOYAL, M.; GAUTAM, R.; KUMAR, P.; DHILLON, S. Application of inter simple sequence repeat markers to analyze molecular relationships in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). **Agricultural Science Digest**, v. 35, n. 3, p. 195-198, 2015.

GONÇALVES, A. C.; REIS, C. A. F.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 2, p. 325-332, 2010.

GIUSTINA, L.D.; LUZ, L.N.; VIEIRA, F.S.; ROSSI, F.S.; SOARES-LOPES, C.R.A.; PEREIRA, T.N.S.; ROSSI, A.A.B. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3510-3519, 2014.

HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDi 1.2: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.618- 620, 2005.

LACERDA, C. M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial de duas populações naturais de *Myracrodruon urundeuva* M. Allemão, na região semiárida, Brasil. **Revista Árvore**, v.27, n. 2, p.145-150, 2003.

LORENZONI, R. M.; SOARES, T. C. B.; SANTIAGO, V. F. S.; SILVA, J. A.; COELHO, R. I. Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, edição especial, p. 251-257, 2014.

LIMA, P. P. **Caracterização da variabilidade genética, sistema de cruzamento e parâmetros de germinação e emergência de *Euterpe precatoria* Martius em populações do baixo rio Solimões**. 2014. 56p. Dissertação de mestrado. Instituto nacional de pesquisas da amazônia – INPA. Manaus.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum spp.* do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 82, p.143-150, 2009.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. sob diferentes condições antrópicas. **Revista Árvore**, v. 29, n. 2, p.281-289, 2005.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

OLIVEIRA, N. N.; VIANA, A. P.; QUINTAL, S. S. R.; PAIVA, C. L.; MARINHO, C. S. Análise de distância genética entre acessos do Gênero *Psidium* via marcadores ISSR. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 917-923, 2014.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. Genalex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.288-295, 2006.

PURAYIL, F. T.; ROBERT, G. A.; GOTHANDAM, K. M.; KURUP, S. S.; SUBRAMANIAM, S.; CHERUTH, A. J. Genetic variability in selected date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars of United Arab Emirates using ISSR and DAMD markers. **Biotech**, v. 8, n. 109, p. 1-8, 2018.

QUIROGA, Y. M. C.; GÓMEZ, M. S. H.; MARY, L. Componentes Bioactivos del Asai (*Euterpe oleracea* Mart. y *Euterpe precatoria* Mart.) y su efecto sobre la salud. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v. 36, n. 3, p. 58 - 66, 2017.

RAMOS, S. L. F.; DEQUIGIOVANNI, G.; SEBBENN, A. M.; LOPES, M. T. G.; MACÊDO, E. L. V.; VEASEY, E. A.; ALVES-PEREIRA, A.; SILVA, P. P.; GARCIA, J. N.; KAGEYAMA, P. Y. Paternity analysis, pollen flow, and spatial genetic structure of a natural population of *Euterpe precatoria* in the Brazilian Amazon. **Ecology and Evolution**, p. 1 -15, 2018.

RAMALHO, A. B.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ZORTÉA, K. E. M.; TIAGO, A. V.; MARTINS, K. C. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 207 - 214, 2016.

ROSSI, F. S.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; BRAUWERS, L. R.; SILVA, M. L.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 104, p. 631-639, 2014.

ROLDAN-RUIZ, I. et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, v. 6, p. 125-134, 2000.

RODRIGUES, T. E.; GAMA, J. R. N. F.; SILVA, J. M. L.; VALENTE, M. A.; SANTOS, E. S.; ROLIN, P. A. M. **Caracterização e Classificação de Solos do Município de Plácido de Castro, Estado do Acre**. (Documentos 160), Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2003, 51p.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.843-849, 2008.

VIEIRA, F. A.; SOUSA, R. F.; SILVA, R. A. R.; FAJARDO, C. G.; WAGNER FRANCO MOLINA, W. F. Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. **Revista Brasileira Ciências Agrárias**, v. 10, n. 4, p. 525-531, 2015.

SÁNCHEZ, J. M. B. **Estructura genética de *Euterpe precatoria* (Mart.) en los Andes Tropicales**. 2013, 66 p., dissertação de mestrado. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES FILHO, W. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P.C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre

acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SOARES, A.N.R.; VITÓRIA, M.F.; NASCIMENTO, A.L.S.; LEDO, A.S.; RABBANI, A.R.C.; SILVA, A.V.C. Genetic diversity in natural populations of mangaba in Sergipe, the largest producer State in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, n. 15, v. 3, 2016.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Center; University of Alberta, 1997.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA FILHO, D. F.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.



## CAPITULO II

### CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOMÉTRICA DE ESTRUTURAS REPRODUTIVAS E MORFOANATÔMICA E HISTOQUÍMICA DO PROCESSO GERMINATIVO DE *Euterpe precatoria* Mart.

#### RESUMO

Os frutos de *Euterpe precatoria* Mart. têm sido explorados comercialmente para uso em alimentos e bebidas, devido às suas propriedades medicinais e energéticas. Mas para atender a demanda de forma sustentável são necessárias mais pesquisas em relação a sua propagação. Neste contexto, objetivou-se caracterizar as estruturas reprodutivas e descrever temporalmente o processo germinativo de *Euterpe precatoria* Mart. (açai solteiro). Para tal, foram utilizados frutos coletados no município de Plácido de Castro no Estado do Acre, Brasil. Para a biometria das estruturas reprodutivas utilizou-se um paquímetro digital, considerando um total de 100 frutos e 100 sementes e 15 embriões zigóticos. Já para avaliar a evolução das características biométricas, morfológicas, anatômicas e histoquímicas do processo germinativo foram coletadas amostras em diferentes períodos após a semeadura: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 dias. Verificou-se que os frutos e sementes apresentam forma globosa, com diâmetros e comprimentos médios de 11,51 e 10,27 mm e 11,83 e 10,01 mm respectivamente. Já o embrião zigótico é cônico com cerca de 1,5 mm de diâmetro e 3,5 mm de comprimento. A germinação das sementes é classificada como criptocotiledonar, hipógea e adjacente ligular e apenas aos 20 dias após semeadura foram observadas plântulas (33,33%). Esse período foi marcado histologicamente pela expansão da lígula, início de diferenciação do segundo eofilo e ruptura radicular completa. Histoquimicamente este estágio foi caracterizado pelo consumo total das reservas proteicas e aumento dos grãos de amido. Para ocorrência de 100% de germinação foram necessários 60 dias. Diante dos resultados, conclui-se que os propágulos são uniformes em termos biométricos e morfológicos. A germinação das sementes da espécie estudada é lenta e desuniforme e apresenta como marcador morfológico de sucesso no processo germinativo a saída da região proximal do embrião do interior da semente por meio do levantamento do opérculo. Verifica-se que consumo de reservas proteicas do embrião está relacionado ao fornecimento de energia necessário à protusão radicular.

**Palavras chave:** Arecaceae; fisiologia da germinação; Floresta Amazônica; palmeira açai; propágulos; morfogênese.

## 1. INTRODUÇÃO

A floresta amazônica possui uma ampla diversidade vegetal, destacando-se a família botânica Arecaceae pela variedade de espécies passíveis de usos, contribuindo para a diversificação da produção florestal não madeireira. Entre estas menciona-se o açaí que é nativo da região amazônica da América do Sul. Ele é especialmente, importante pela exploração comercial da polpa dos frutos para uso em alimentos e bebidas (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009). No ano de 2017 a produção de frutos do açaí foi de 219.885 toneladas, procedente principalmente do extrativismo vegetal (IBGE, 2017).

*Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe precatoria* Mart. são as duas principais espécies de açaí que têm chamado a atenção da comunidade científica dadas as propriedades medicinais atribuídas aos seus frutos (QUIROGA; GÓMEZ; LARES, 2017). Desde a década passada o açaí e outras frutas ganharam o status de "superfruit", expressão referida a frutos com alto poder energético, capacidade antioxidante, propriedades imunológicas e antienvhecimento, devido, principalmente às quantidades substanciais fitoquímicas de polifenóis, polissacarídeos e fibras (PEIXOTO *et al.*, 2016). Kang *et al.* (2012) concluíram que as atividades antioxidantes da polpa dos frutos do *E. precatoria* Mart. é superior à dos frutos do *E. oleracea* Mart., muito embora, tenha recebido consideravelmente menos atenção de pesquisadores do que a *E. oleracea* Mart. (CAREY *et al.*, 2015).

*E. precatoria* Mart., também conhecida popularmente como açaí solteiro é uma palmeira de haste única, pinada, que atinge alturas de até 20 m, com um diâmetro de 25 cm (KANG *et al.*, 2012). E por não apresentar perfilhos, a reprodução sexuada (via sementes) é a única alternativa de propagação natural dessa espécie. Mas apesar da importância ecológica e econômica das palmeiras amazônicas, a literatura é limitada em diferentes aspectos, principalmente, no que se refere à biologia e morfologia de frutos, sementes e propagação, restringindo-se as pesquisas a um número pequeno de espécies de valor econômico (ARAÚJO; LEITÃO; MENDONÇA, 2000; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003).

De acordo com Mendonça *et al.* (2008), para as palmeiras são necessárias mais pesquisas em relação as estruturas reprodutivas, com contribuições para conservação dos ecossistemas naturais amazônicos, além de dar subsídio a estudos taxonômicos e fisiológicos. Desta maneira, os estudos a respeito da caracterização morfológica e

biométrica de frutos e sementes tornam-se necessários, pois auxiliam na identificação botânica das espécies e permitem sua diferenciação no mesmo gênero (CRUZ; MARTINS; CARVALHO, 2001). Além disso, pode proporcionar detectar a variabilidade genética dentro de populações de uma mesma espécie e suas relações com os fatores ambientais e programas de melhoramento genético (GONÇALVES *et al.*, 2013). Estes estudos também esclarecem os aspectos ecológicos envolvidos na germinação e no estabelecimento das espécies vegetais (MATOS *et al.*, 2014), como também podem direcionar a escolha das estratégias de conservação *ex situ*.

Além dos aspectos já mencionados, pesquisas relacionadas a morfoanatomia e histoquímica da germinação de sementes das espécies desse grupo de plantas também são importantes, particularmente em *E. precatória* Mart. por não perfilhar. Considerando-se que para a maioria das palmeiras o processo germinativo não foi completamente descrito e as estruturas de plântulas não foram identificadas, e do ponto de vista anatômico pouco se conhece (GENTIL; FERREIRA, 2005; OLIVEIRA; MENDONÇA; ARAÚJO, 2010). Silva *et al.* (2014) e Lima *et al.* (2014) ressaltam sobre ausência desse tipo estudo para espécies recalcitrantes, como é o caso de *E. precatória* Mart..

Nas palmeiras as estruturas embrionárias e germinação são bastante peculiares, devido à posição interna do eixo embrionário, seu pequeno tamanho em relação as sementes, e por existir muitos padrões morfológicos de embriões e plântulas. Esses e outros fatores fazem com que os processos germinativos só possam ser descritos adequadamente por meio de uma associação detalhada de características morfológicas e anatômicas, para então definir indicadores morfológicos facilmente visíveis da germinação (HENDERSON, 2006; RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012).

Estudos histoquímicos também são incipientes entre as palmeiras, com um déficit de literatura sobre a caracterização das reservas de sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2013), com pesquisas limitadas a poucas espécies como *Phoenix dactylifera* L. (DEMASON, 1988), *E. edulis* Mart. (PANZA *et al.*, 2004) e *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. Ex Mart. (MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010).

Nesse contexto, salienta-se a importância da realização de estudos morfoanatômicos de estruturas reprodutivas para melhor compreensão do processo germinativo e na interpretação de testes de germinação e de vigor (RODRIGUES; MENDONÇA; GENTIL, 2015), além de estudos histoquímicos dos principais metabólitos de reservas, fundamentais ao processo germinativo de *E. precatória* Mart.

Adicionalmente, são poucas as pesquisas sobre a caracterização dos propágulos e

a morfoanatomia da germinação de *Euterpe precatoria* Mart. Aguiar e Mendonça (2002) e posteriormente Bernardes (2010) foram os pioneiros nesta temática para espécie, constituindo estes trabalhos os mais importantes para espécie até então sobre o assunto, muito embora tais estudos apresentem dados relativamente pouco aprofundados sobre aspectos específicos do processo. O presente estudo, também traz a caracterização histoquímica do comportamento das principais reservas nutricionais durante o processo germinativo, sendo assim inédito para o *Euterpe precatoria* Mart..

Neste contexto, os resultados alcançados neste trabalho, podem demonstrar parâmetros importantes para a melhor compreensão do processo germinativo das palmeiras, em especial do gênero *Euterpe*. Além disso, pode fornecer informações para futuros estudos de propagação, produção de mudas, identificação de plântulas no solo em estudos de regeneração natural, conservação e domesticação da espécie estudada.

Com isso, esta pesquisa objetivou caracterizar a morfologia e biometria de estruturas reprodutivas e descrever temporalmente os aspectos morfológicos, anatômicos e histoquímicos de embriões e plântulas durante as fases do processo germinativo, além de propor características morfológicas a serem utilizadas como indicadores de germinação de *Euterpe precatoria* Mart.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos de *Euterpe precatoria* Mart. foram coletados de plantas matrizes adultas no município de Plácido de Castro, localizado no Estado do Acre, Brasil. Em seguida, foram acondicionados em sacos plásticos e caixa de isopor e transportados para o Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMPRAPA CENARGEN) em Brasília-DF, onde foi conduzido todo experimento.

No laboratório, os frutos foram lavados em água corrente, colocados para secar a sombra em bandejas plásticas por 24 horas e beneficiados manualmente com auxílio de bisturi, retirando-se toda polpa. Em seguida, o teor de umidade das sementes foi determinado pelo método da estufa a 105°C durante 24 horas, de acordo com as Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009), utilizando-se três repetições de 10 sementes.

Para caracterização biométrica dos frutos e sementes, foram selecionados de forma aleatória 100 frutos e 100 sementes e com auxílio de paquímetro digital foram realizadas as medidas de diâmetro em sentido transversal e comprimento longitudinalmente. Os dados mensurados para essas variáveis foram submetidos à análise estatística descritiva e distribuição de frequências em intervalos de classes, conforme Pontes *et al.* (2018), utilizando-se o Office Excel (versão 2010).

Para avaliar a evolução das características biométricas, morfológicas, anatômicas e histoquímicas dos embriões zigóticos e do processo germinativo foram coletadas amostras em diferentes períodos após a semeadura: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 dias. Para isso, posteriormente à remoção da polpa, em câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por um processo de assepsia, onde as mesmas permaneceram imersas por três minutos em álcool etílico 70%, seguidos de 30 minutos em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% de concentração, acrescido de três gotas de Tween 20 para cada 100 ml de hipoclorito. Passados os 30 minutos, as sementes foram lavadas em água destilada e autoclavada por três vezes.

Na sequência, foram semeadas um total de 165 sementes (15 sementes por período de avaliação), utilizando-se caixas do tipo gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) e vermiculita de granulometria super fina como substrato, com 100% da capacidade de água. As caixas plásticas foram mantidas em câmara de germinação tipo BOD (PERCIVAL, BOONE IOWA 50036), com temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas. O processo de montagem e reposição de água nos gerbox foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações fúngicas e/ou bacterianas.

As descrições morfológicas e avaliações biométricas foram realizadas para cada período preestabelecido com auxílio do software Leica Application Suite EZ por meio de imagens obtidas via microscópio Leica DM 750. Na fase inicial da germinação (2 a 15 dias) foram mensurados os seguintes parâmetros dos embriões zigóticos: comprimento total (mm); diâmetro (mm) da divisão entre as regiões proximal e distal (distinguíveis por diferenças de coloração); diâmetro (mm) da área central da região proximal e diâmetro (mm) da área central da região distal. Com avanço do processo germinativo, foram consideradas as variáveis comprimento e diâmetro (mm) da lígula, da parte aérea (primeiro e segundo catafilos), da raiz primária (mm), da raiz adventícia e do haustório. Para a realização das medições supracitadas, 15 sementes foram avaliadas em cada período preestabelecido. Para que fosse possível realizar as medições e descrições morfológicas as sementes foram abertas longitudinalmente com ajuda de um torno de bancada (morsa) e os embriões e plântulas foram retirados do endosperma com pinças.

Para a avaliação da germinação foi considerado o critério tecnológico (BRASIL, 2009), com a protusão da raiz primária e emissão da lígula.

As avaliações anatômicas foram realizadas também para todos os períodos acima citados, onde embriões zigóticos ou plântulas (cinco em cada período) foram submetidos às etapas de fixação, desidratação e emblocamento conforme o seguinte protocolo: fixação em solução de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), por um período de 24 horas (sob vácuo durante a primeira hora), seguida de três lavagens em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo); logo após, desidratação em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70% - 100%, 100%), por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante. Posteriormente, cortes longitudinais e transversais (3-7  $\mu$ m) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C.

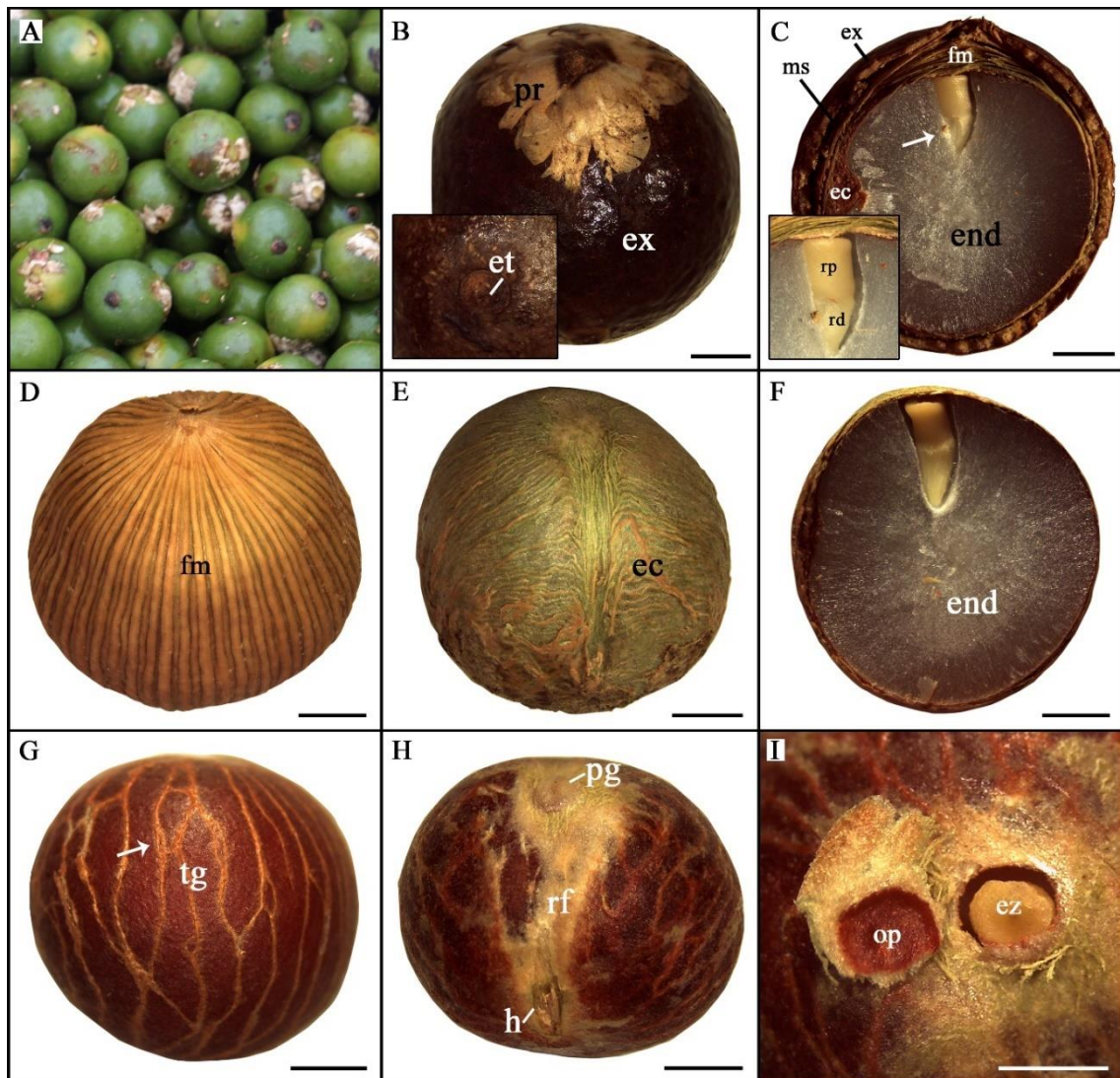
Para análise histoquímica as secções obtidas a partir do material emblocado foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos (O'BRIEN *et al.*, 1964); *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para visualização de proteínas (VIDAL, 1970); *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) usado para identificar polissacarídeos neutros; Lugol (JOHANSEN, 1940) para detecção de grãos de amido e Sudan IV (PEARSE, 1972) para visualização de lipídeos totais. A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM

750 e programa Leica Application Suite EZ.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização morfológica e biométrica de estruturas reprodutivas de *Euterpe precatória* Mart.

O fruto de *E. precatória* Mart. é globoso, com variação na coloração de acordo com estágio de maturação, passando de verde quando imaturos para púrpura-negra quando maduros (Figura 1A; 1B). O fruto apresenta perianto e estigma persistentes mesmo após maturação e dispersão de cor esbranquiçada e marrom, respectivamente (Figura 1A; 1B). Esse comportamento foi confirmado para outras palmeiras como *Oenocarpus minor* Mart. (MENDONÇA *et al.*, 2008) e *Syagrus coronata* (Mart.) Becc (SANTOS-MOURA, 2013).



**FIGURA 1.** Caracterização morfológica de frutos e diásporos de *Euterpe precatória* Mart. A: Frutos verdes. B: Fruto maduro; detalhe do estigma (lateral). C: Corte



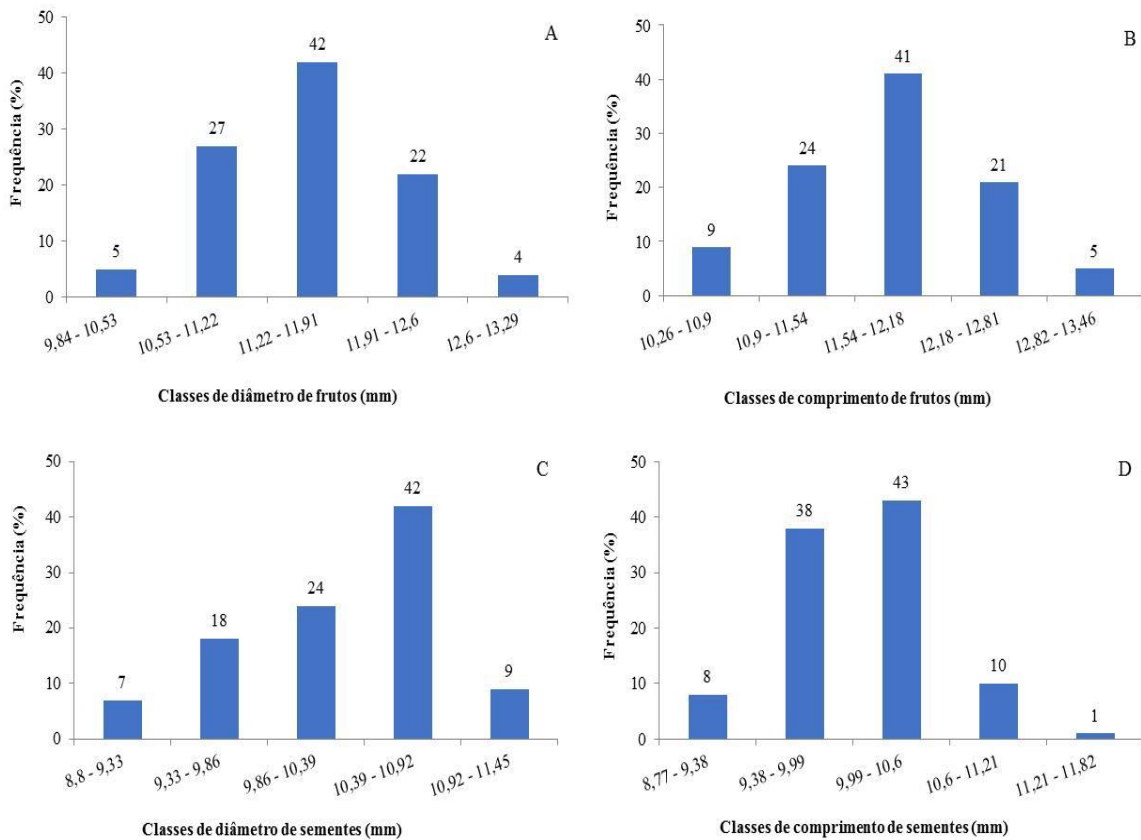
longitudinal do fruto maduro com semente e embrião zigótico inserido perifericamente; observar fibras mesocárpicas, endocarpo e as regiões proximal e distal do embrião zigótico. D: Semente com fibras mesocárpicas. E: Semente mostrando o endocarpo. F: Corte longitudinal da semente. G: Tegumento com estrias endocárpicas (seta). H: Vista frontal da semente; notar hilo, hafe e poro germinativo. I: Detalhe do poro germinativo aberto. Abreviações: (ec) endocarpo, (end) endosperma, (et) estigma, (ex) exocarpo, (ez) embrião zigótico, (fm) fibras mesocárpicas, (h) hilo, (op) opérculo, (pg) poro germinativo, (pr) perianto, (rd) região distal, (rf) rafe, (rp) região proximal e (tg) tegumento. Barras: B-F = 2mm.

Quando o fruto é cortado longitudinalmente (Figura 1C) é simples a identificação de três camadas: o exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo conhecido comumente como a casca do fruto, tem consistência lisa e ausência de pilosidade, com variações de cores já mencionadas. O mesocarpo é constituído pela polpa, que é comestível e de coloração arroxeadada e envolvida pelas fibras mesocárpicas. Já o endocarpo é uma camada fina de cor verde, que recobre toda a semente e está inserido imediatamente abaixo das fibras mesocárpicas (Figura 1E).

Com relação as variáveis biométricas os frutos apresentaram dimensões médias de 11,51 mm de diâmetro e 11,83 mm de comprimento (Tabela 1), e a maioria (42%) se enquadram no intervalo de classe de diâmetro de 11,22 -11,91 mm, e 41% no intervalo de classe de comprimento de 11,54 - 12,18 mm, exibindo, deste modo, pouca variação (Figura 2A; 2B). Valores similares para a mesma espécie são relatados por Lorenzi *et al.* (2004) quanto às dimensões de diâmetro (1,0 - 1,3 cm), e por Bernardes (2010), com valores médios de 13,7 mm de comprimento e 14,3 mm de diâmetro. Portanto, os resultados observados neste estudo também estão de acordo com a maioria das palmeiras, pois para Tomlinson (1990), os frutos desse grupo de plantas estão incluídos no intervalo de classe de tamanho de 1,0 - 1,4 cm.

**TABELA 1.** Estatística descritiva da caracterização biométrica de frutos e sementes de *Euterpe precatória* Mart., coletadas no Estado do Acre, Brasil

Parâmetros	FRUTOS		SEMENTES	
	Diâmetro (mm)	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Comprimento (mm)
Valor mínimo	9,84	10,26	8,8	8,77
Valor máximo	13,29	13,46	11,43	11,8
Média	11,51	11,83	10,27	10,01
Mediana	11,38	11,90	10,40	10,07
Desvio padrão	0,64	0,63	0,57	0,52
Coefficiente de variação (%)	5,55	5,29	5,52	5,16



**FIGURA 2.** Frequências (%) em intervalos de classes do diâmetro de frutos (A), comprimento de frutos (B), diâmetro de sementes (C) e comprimento de sementes de *Euterpe precatória* Mart. coletadas no Estado do Acre, Brasil.

O fruto apresenta uma única semente, que por sua vez, tem formato globular, de cor marrom, que compreende a maior parte do fruto e é envolta por tegumento e endocarpo coberto por fibras mesocárpicas, após a remoção da polpa (Figura 1D). O endosperma exibe uma pequena cavidade periférica onde o embrião zigótico se encaixa (Figura 1C, F). Conforme observado na Figura 1, o endosperma é denso, rígido, homogêneo, esbranquiçado e brilhante, como previamente mencionado por Aguiar e Mendonça (2003). O tegumento encontra-se aderido ao endosperma é delgado, amarronzado com estrias endocárpicas amarelas (Figura 1G, H), similar ao observado por Mendonça *et al.* (2008), em *Oenocarpus minor* Mart., no entanto, os autores se referem as estrias como cicatrizes deixadas pelas fibras do endocarpo. Com a retirada do endocarpo é possível observar longitudinalmente no tegumento uma cicatriz que se refere a rafe, com o poro germinativo em um dos extremos (região do ápice), e no outro extremo (região basal) o hilo (Figura 1H).

As sementes mensuradas possuem dimensões de diâmetro e comprimento mínimas

de 8,8 e 8,77 mm e máximas de 11,43 e 11,8 mm, respectivamente (Tabela 1). E cerca de 42 e 43% estão incluídas nos intervalos de classes de 10,39 - 10,92 mm de diâmetro e de 9,99 - 10,6 mm de comprimento, e assim como os frutos apresentaram baixas variações biométricas (Figura 2C, D). Esses valores estão próximos aos verificados por Aguiar e Mendonça (2003) com diâmetro médio de 11,5 mm, porém, ligeiramente inferiores aos reportados por Bernardes (2010) com valores médios de 12,1 mm de diâmetro e 12,4 mm de comprimento. Contudo, mesmo se tratando da mesma espécie é comum a ocorrência dessas variações, pois tratam-se de sementes coletadas em diferentes locais e épocas, bem como procedentes de outros materiais genéticos.

Poucas variações biométricas foram relatadas por Rodrigues, Mendonça e Gentil (2015) para a palmeira *Bactris maraja* Mart.. Os autores sugerem que sejam indícios que as plantas matrizes não apresentavam grandes variações genéticas. Esses mesmos autores salientam ainda a importância de informações como valores de dimensões máximas para a seleção de sementes com maior potencial germinativo. Silva *et al.* (2017) concluíram que o tamanho das sementes influenciou na qualidade de mudas do *Euterpe oleracea* Mart., onde as sementes de maiores dimensões produziram mudas mais vigorosas, fato que poderia relacionar também o tamanho das sementes com a escolha das alternativas de propagação e de conservação da espécie.

O teor de umidade das sementes de *E. precatoria* Mart. foi de 33,0% após a coleta e beneficiamento dos frutos. Valor próximo (35,1%) para a mesma espécie foi obtido por Bernardes (2010), e teores de umidades superiores foram verificados para o *E. oleracea* Mart., com 43,4% de umidade inicial (NASCIMENTO; CICERO; NOVEMBRE, 2010). Já para *E. edulis* Mart. o teor de umidade após a coleta variou entre 46,2 e 48,8%, de acordo com a época do ano (MARTINS *et al.*, 2009). Para Umarani, Aadhavan e Faisal (2015), sementes dispersas da planta matriz com alto conteúdo de água é característico de espécie recalcitrante.

O embrião zigótico de *E. precatoria* Mart. é pequeno em relação ao volume total do endosperma e adjacente ao poro germinativo, recoberto por uma estrutura denominada de opérculo (Figura 1I). É cônico, mede cerca de 3,5 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro e apresenta uma região distal mais estreita, embebida no endosperma, que corresponde ao haustório e uma região proximal (basal) mais larga, adjacente ao tegumento da semente, onde localiza-se o eixo embrionário (Figura 1C).

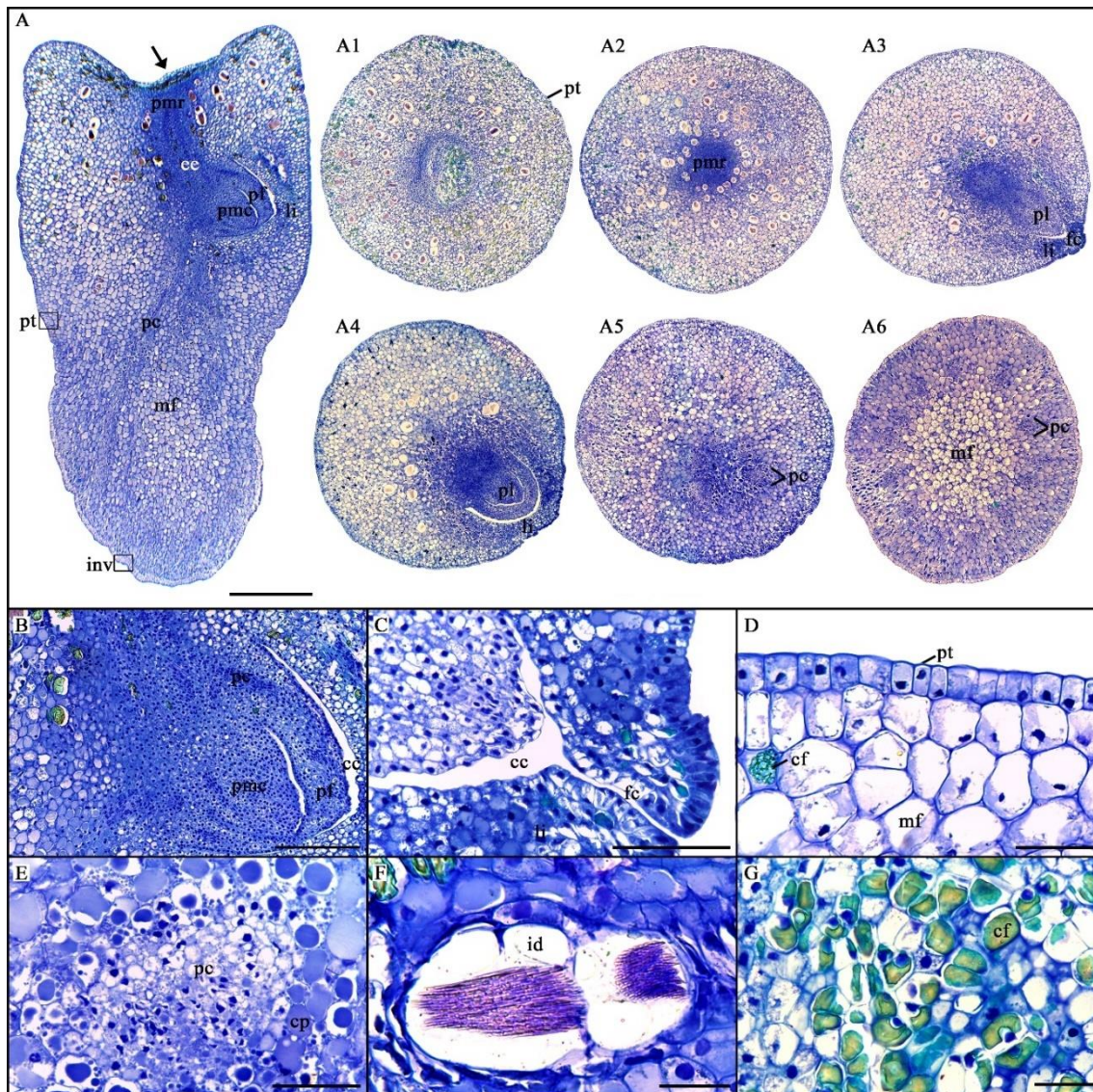
O embrião de *E. precatoria* Mart. é consideravelmente pequeno quando comparado

ao de outras palmeiras, como *Oenocarpus minor* Mart. (cerca de 9 mm) (MENDONÇA *et al.*, 2008). A região proximal também é conhecida como pecíolo cotiledonar por alguns autores (GENTIL; FERREIRA, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2012; RIBEIRO, OLIVEIRA; GARCIA, 2012; NEVES *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A região distal, especificamente, tem a função de mobilizar reservas das sementes durante o processo germinativo (RIBEIRO, OLIVEIRA; GARCIA, 2012; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2017).

A região proximal e a distal podem ser distinguidas pela sua coloração, onde no material fresco, imediatamente após a remoção do embrião da semente, a porção com coloração mais amarelada corresponde à região proximal, ao passo que a porção com coloração variando entre bege a esbranquiçada corresponde à região distal (Figura 1C). Essa distinção de ambas regiões em função da cor também tem sido relatada em outras palmeiras (ARAÚJO *et al.*, 2000; MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010; RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; RODRIGUES; MENDONÇA; GENTIL, 2015; DIAS *et al.*, 2018). Magalhães *et al.* (2012), por outro lado, não identificaram diferenças macroscópicas entre essas duas regiões em *Butia capitata* Mart. (Becc.), as diferenciando somente com base em aspectos anatômicos.

### **3.2 Caracterização anatômica e histoquímica de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart.**

Conforme as análises anatômicas, o embrião de *E. precatoria* Mart. é composto por eixo embrionário e cotilédone. O eixo embrionário é formado por plúmula (pólo caulinar) e eixo hipocótilo-radícula (pólo radicular). O eixo embrionário é ainda curvo, obliquamente posicionado com relação ao eixo do cotilédone (Figura 3A).



**FIGURA 3.** Anatomia de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart. A: Secção longitudinal do embrião zigótico (A1-A6: secções transversais); B: Plúmula. C: Detalhes da lígula, fenda cotiledonar e cavidade cotiledonar. D: Detalhe da protoderme e meristema fundamental. E: Detalhe do procâmbio (corte transversal); F: Idioblastos com ráfides. G: Compostos fenólicos. Abreviações: (cc) cavidade cotiledonar, (cf) composto fenólico, (ee) eixo embrionário, (fc) fenda cotiledonar, (id) idioblasto, (inv) invaginação, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar, (pmr) promeristema radicular e (pt) protoderme. Barras = A: 500  $\mu$ m; B: 200  $\mu$ m e C-G: 50  $\mu$ m.

O posicionamento oblíquo do eixo embrionário também é uma característica de outras palmeiras do mesmo gênero, como *E. edulis* Mart. (PANZA; LÁINEZ; MALDONADO, 2004), e de outros gêneros, como *Cocos nucifera* L. (HACCIUS; PHILIP, 1979), *Washingtonia filifera* (Linden ex André) H. Wendl. (DEMASON, 1988b), *O. minor* Mart. (OLIVEIRA; MENDONÇA; ARAÚJO, 2010), *Butia capitata* Mart. (Becc.)

(MAGALHÃES *et al.*, 2012), *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) (MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010; RIBEIRO OLIVEIRA; GARCIA, 2012), *Mauritia flexuosa* L. f. (SILVA *et al.*, 2014) e *Bactris maraja* Mart. (RODRIGUES; MENDONÇA; GENTIL, 2015).

Os primórdios foliares, em número de dois (catafilos) com protoderme definida e o promeristema caulinar (composto por células pequenas, isodiamétricas, arranjadas compactamente, com alta relação núcleo citoplasma), formam a plúmula (Figura 3A, B). A plúmula está localizada na cavidade cotiledonar que é formada pela lígula. A lígula apresenta a fenda cotiledonar, que cria uma abertura para o ambiente externo (Figura 3A3, A4, C), semelhante ao relatado em *Attalea vitrivir* Zona (NEVES *et al.*, 2013) e *M. flexuosa* L. f. (SILVA *et al.*, 2014). Essa cavidade é pressionada durante o processo germinativo, permitindo a emergência da plúmula (AGUIAR; MENDONÇA, 2003).

O eixo hipocótilo-radícula não é totalmente diferenciado, uma vez que não exhibe protoderme definida, como também mencionado nas palmeiras *A. aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. (RIBEIRO, OLIVEIRA; GARCIA, 2012), *Syagrus inajai* (Spruce) Becc. (GENOVESE-MARCOMINI *et al.*, 2013), *A. vitrivir* Zona (NEVES *et al.*, 2013), *M. flexuosa* L. f. (SILVA *et al.*, 2014) e *Bactris maraja* Mart. (RODRIGUES; MENDONÇA; GENTIL, 2015) e posiciona-se centralmente ao corpo do embrião (Figura 3A). Nas proximidades do promeristema radicular verifica-se uma pequena elevação que marca o local de saída raiz (Figura 3A) reportada inicialmente por Aguiar e Mendonça (2002). A plúmula e a região hipocótilo-radícula exibem células do meristema fundamental e células procambiais. No eixo embrionário, as células são menores e com arranjo mais compacto em comparação com as demais células do embrião (Figura 3A).

O cotilédone é simples e, como visualizado na Figura 3A, exhibe protoderme, meristema fundamental e procâmbio totalmente diferenciados e facilmente distinguíveis por meio dos formatos e posições de suas células. Durante o processo germinativo, o cotilédone assume a função de um órgão de absorção chamado de haustório (VIANA *et al.*, 2016), responsável pela hidrólise de compostos de reservas do endosperma e sua mobilização para a emergência da plântula (VERDEIL; HOCHER, 2002; OLIVEIRA; MENDONÇA; ARAÚJO, 2010; NEVES *et al.*, 2013; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2017). A protoderme é unisseriada com células justapostas, variando de quadrada à retangular, com núcleos evidentes (Figura 3A, D) e com leves invaginações na extremidade distal (Figura 3A).

As células do meristema fundamental, localizadas na região proximal, tendem a ser

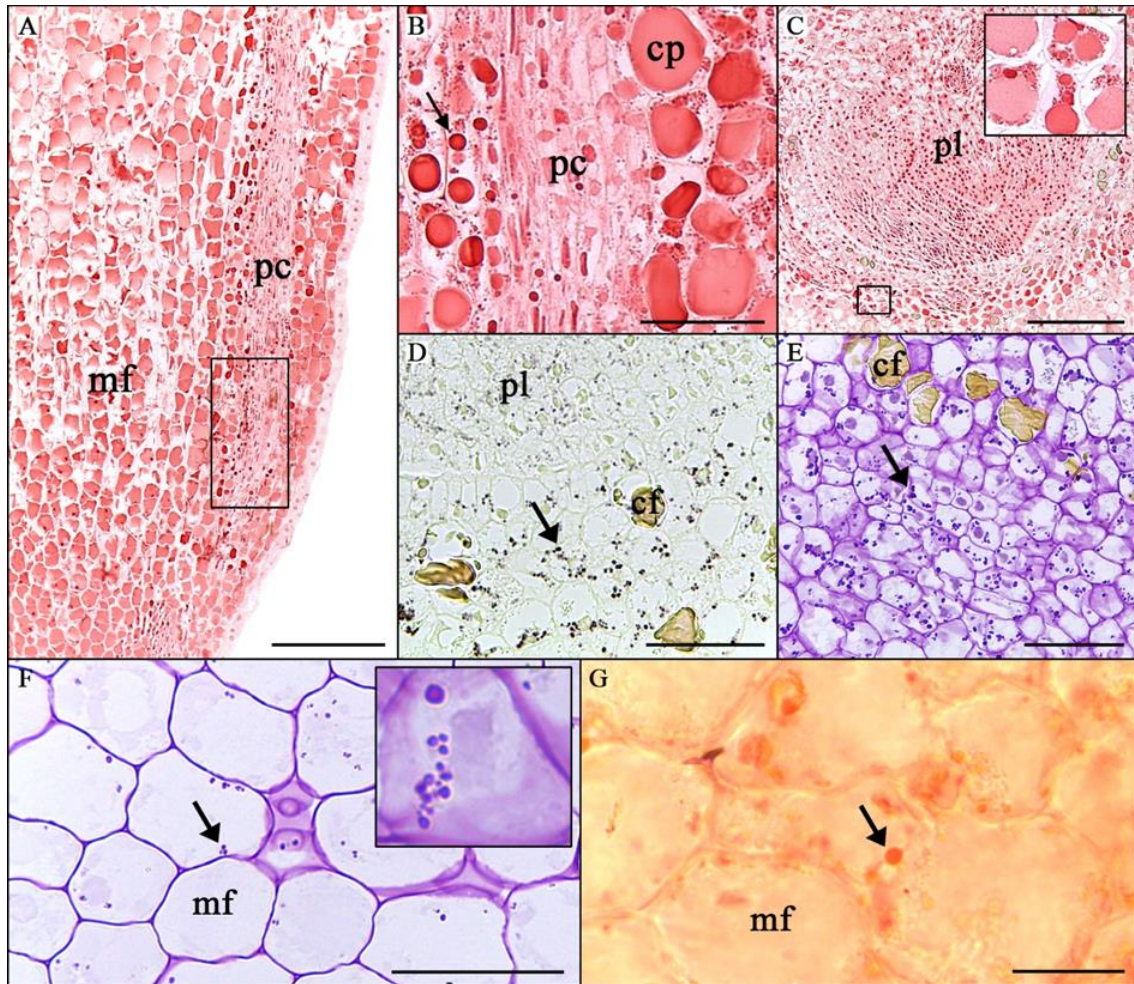
isodiamétricas e, da região haustorial, exibem formatos mais variados. Além do mais, exibem dimensões maiores e vacúolos proeminentes nas regiões central e distal que nas regiões periférica e proximal (Figura 3A). As células procambiais são estreitas, com núcleos evidentes, longitudinalmente alongadas e agrupadas em cordões (Figura 3A, E). Os cordões procambiais são direcionados do nó cotiledonar em direção a região proximal e em direção a região distal, onde tornam-se gradualmente mais periféricos e paralelos ao comprimento do embrião (Figura 3A).

Adicionalmente, verificaram-se abundância de idioblastos com ráfides inclusas (Figura 3F) e de compostos fenólicos (Figura 3G), sobretudo, na região proximal, nas vizinhanças do eixo embrionário (Figura 3A). Salienta-se que, a oxidação dos compostos fenólicos ocorre quase que imediatamente após o isolamento do embrião zigótico do interior da semente, conferindo coloração escura na região proximal.

Conforme Oliveira, Mendonça e Araújo (2010), tais compostos, também observados em *O. minor* Mart., provavelmente têm função protetiva do eixo embrionário. Panza, Láinez e Maldonado (2004) também relataram idioblastos e compostos fenólicos, especificamente taninos, em *E. edulis* Mart.. Já Silva *et al.* (2014) associaram a abundância de metabólitos secundários em embriões zigóticos de *M. flexuosa* L. f. a um mecanismo de adaptação a ambientes alagadiços, como mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos típicos desse ambiente. Contudo, Zona (2004) salientam que a função mais provável da ocorrência de ráfides em embriões zigóticos de palmeiras, embora ainda não comprovada experimentalmente, seria de depósitos de cálcio, oxalato e/ou peróxido de hidrogênio. Ainda segundo esse autor, a presença de ráfides é uma característica comum em palmeiras. Já Veloso *et al.* (2016) associaram a abundância de compostos fenólicos em células de embriões zigóticos de *M. flexuosa* L. f. com uma possível atividade antioxidante, que pode estar relacionada a modulação do comportamento recalcitrante.

Menciona-se que a literatura descritiva dos aspectos anatômicos do embrião zigótico de *E. precatória* Mart., até o momento, é limitada ao trabalho de Aguiar e Mendonça (2003). Já em termos de histoquímicos, este é o primeiro trabalho sobre a espécie. As análises histoquímicas revelaram a presença de corpos proteicos, por reação positiva com *Xylidine Ponceau*, com diferentes tamanhos e formatos ao longo de toda região haustorial, sobretudo, na sua periferia ao redor dos cordões procambiais (Figura 4A, B), e nas proximidades do eixo embrionário (Figura 4C). Além de proteínas, grãos de amido diminutos e em pequenas quantidades também foram identificados na plúmula e nas suas proximidades (Figura 4D,

E) e na extremidade distal (Figura 4F), por meio dos corantes *Periodic Acid Schiff* e Lugol. Além dos compostos de reserva mencionados, observaram-se corpos lipídicos ou oleossomos, conforme reação positiva com Sudan IV. Os corpos lipídicos exibiam formato arredondado e tamanho inferior ao dos corpos proteicos (Figura 4G).



**FIGURA 4.** Histoquímica de embrião zigótico *Euterpe precatoria* Mart.. A: Corpos proteicos em células do cotilédone, conforme reação positiva com *Xylidine Ponceau*. B: Corpos proteicos em células adjacentes aos cordões procambiais (seta). C: Corpos proteicos visualizados nas proximidades da plúmula (detalhe em quadrado lateral). D: Grãos de amidos corados com Lugol em células da plúmula e em células próximas a plúmula (seta). E: Polissacarídeos corados com *Periodic Acid Schiff* em células próximas a plúmula (seta); prováveis grãos de amido. F: Prováveis grãos de amido em células do cotilédone – extremidade distal (seta). G: Corpos lipídicos em células do cotilédone coradas com Sudan III. Abreviações: (cf) composto fenólico (cp) corpo proteico, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio e (pl) plúmula. Barras = A, C: 200 µm; B-F: 50 µm e G: 20 µm.

Conteúdo proteico e lipídico abundante em embriões zigóticos é uma característica comum a palmeiras de diferentes gêneros (DEMASON, 1985; DEMASON, 1988a;



PANZA; LÁINEZ; MALDONADO, 2004; MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010; NAZÁRIO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014; RODRIGUES; MENDONÇA; GENTIL, 2015; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2017; CARDOSO, 2018; DIAS *et al.*, 2018) e ambos subsidiam o crescimento do embrião durante o processo germinativo como reserva alimentar até a planta ter autonomia fotossintética. Uma parcela considerável do conteúdo proteico de sementes (endosperma e embrião zigótico), de acordo com Copeland *et al.* (1999), é metabolicamente inativa e auxilia o crescimento/desenvolvimento do embrião durante a germinação, funcionando como reserva alimentar, ao passo que a outra parcela, considerada metabolicamente ativa, é composta por enzimas catalisadoras dos processos metabólicos de digestão, translocação e utilização de reservas. Já as gotas lipídicas ou oleossomos armazenam triacilgliceróis que estão relacionados com o fornecimento de energia e, provavelmente, na sinalização durante o processo de germinação (LAIBACH *et al.*, 2015).

A presença de grãos de amido em embriões zigóticos de palmeiras, geralmente, não são comuns, com poucos relatos, como em *E. edulis* Mart. (PANZA; LÁINEZ; MALDONADO, 2004), *B. capitata* Mart. (OLIVEIRA *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2018) e *S. oleracea* Mart. Becc (CARDOSO, 2018) e, provavelmente, funcionam como fonte adicional de energia. Conforme Oliveira *et al.* (2013), a presença incomum de amido em embriões zigóticos de algumas palmeiras está envolvida com o rápido processo germinativo relacionado com a recalcitrância.

O acúmulo de reservas proteicas no interior de vacúolos, de acordo com Veloso *et al.* (2016), merece atenção no contexto do comportamento recalcitrante, comportamento esse típico de sementes do açai solteiro (*E. precatoria* Mart.). Nessa conjuntura, a presença de proteínas LEA positivamente relacionadas à preservação de membranas celulares mediante proteção contra estresse oxidativo (SHARMA *et al.*, 2016) associado ao processo de dessecação, não pode ser descartada em células de embriões de *E. precatoria* Mart., o que merece estudos futuros. Essas proteínas foram identificadas em embriões zigóticos de *E. edulis* Mart. (PANZA *et al.*, 2007), uma espécie recalcitrante.

### **3.3 Caracterização morfoanatômica e histoquímica do processo germinativo de *Euterpe precatoria* Mart.**

Quanto ao processo germinativo, entre os 6 e 10 dias, os embriões exibiram um leve intumescimento, com um discreto incremento nas suas dimensões (Figura 6A, B).

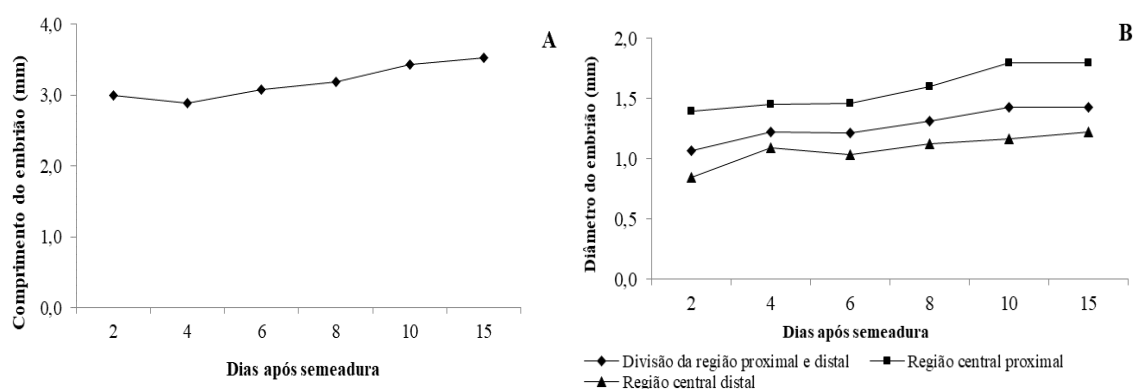
Entre os 10 e 15 dias, visualizou-se a emergência da porção proximal através do poro germinativo com consequente abertura do opérculo circular (Figuras 1I e 5B; 5C). Concomitantemente a projeção da porção proximal externamente à semente, observou-se a formação de uma linha entre esta e a região distal do embrião inserida, dentro da semente, que nesse trabalho é considerada a marcação entre a região proximal onde o eixo embrionário está posicionado e o pecíolo cotiledonar (Figuras 5C e 10A). Essa marcação também foi notificada em *W. filifera* (Linden ex André) H. Wendel (DEMASON, 1988b). Verificou-se também o intumescimento da porção proximal caracterizando o botão germinativo, conforme Figuras 5C e 10A (GENTIL; FERREIRA, 2005; OLIVEIRA; MENDONÇA; ARAÚJO, 2010; BASKIN; BASKIN, 2014), que coincide com o aumento do diâmetro da porção central dessa região (Figura 6B). Notou-se, ainda, em alguns embriões o estufamento e arroxamento do ponto de onde a raiz emerge, assim como o alongamento da região distal do embrião (Figuras 5C e 10A).



**FIGURA 5.** Prancha da evolução morfológica do processo germinativo de *Euterpe precatoria* Mart. por 80 dias em vermiculita. A: Embrião zigótico inserido periféricamente dentro do endosperma. B: Levantamento do opérculo e exposição da região proximal aos 10 dias. C: Formação do botão germinativo aos 15 dias; observar no embrião lateral o arroxejamento do ponto de saída da raiz (retângulo) e linha limítrofe

entre a região proximal e o pecíolo cotiledonar (seta). D, E: Protusão da raiz e lígula aos 20 dias. F: Emissão do primeiro catafilo aos 30 dias. G: Emissão do segundo catafilo e surgimento da raiz adventícia aos 40 dias. H: Desenvolvimento do segundo catafilo, do haustório e das raízes aos 60 dias. I: Heterogeneidade do processo germinativo aos 60 dias. J: Eófilo esverdeado aos 80 dias. Abreviações: (bg) botão germinativo, (ct) catafilo, (e) eófilo, (end) endosperma, (ez) embrião zigótico, (ha) haustório, (op) opérculo, (li) lígula, (pct) pecíolo cotiledonar, (ra) raiz adventícia, (rp) raiz primária e (rs) raiz secundária. Barras: H, I = 10 mm, A-G, J = 2mm e B-D (embriões laterais) = 1mm.

Os aspectos biométricos dos embriões não apresentaram diferenças importantes entre o período de 2 a 15 dias após sementeira das sementes em vermiculita, cujo comprimento médio aumentou apenas 0,5 mm (Figura 6A). A mesma tendência foi constatada quanto ao diâmetro das diferentes regiões do embrião, com aumento médio de 0,4 mm para a divisão da região proximal e distal e regiões central proximal e distal (Figura 6B). Esses pequenos acréscimos estão de acordo com o observado morfológicamente neste período, sendo verificado apenas leve intumescimento, causado, sobretudo pela absorção de água.



**FIGURA 6.** Comprimento (A) e diâmetro (B) médio (mm) de embriões zigóticos de *Euterpe precatória* Mart. no período de 2 a 15 dias após sementeira.

A partir do 20º dia, o botão germinativo adquiriu coloração roxa bem evidente e a partir dele verificou-se a saída da lígula e da raiz primária (Figuras 5D, E e 11A, E). Ainda a partir do 20º dia, observou-se a emergência do primeiro catafilo em alguns poucos embriões, em posição contrária ao meristema radicular. Observou-se também início da expansão da região haustorial (Figura 5E). A partir do 30º dia, além de um discreto incremento nas dimensões do haustório, verificou-se também o desenvolvimento

do primeiro catafilo na maioria dos embriões (Figura 5F, 12A) e a formação de raízes secundárias em alguns embriões (Figura 12A).

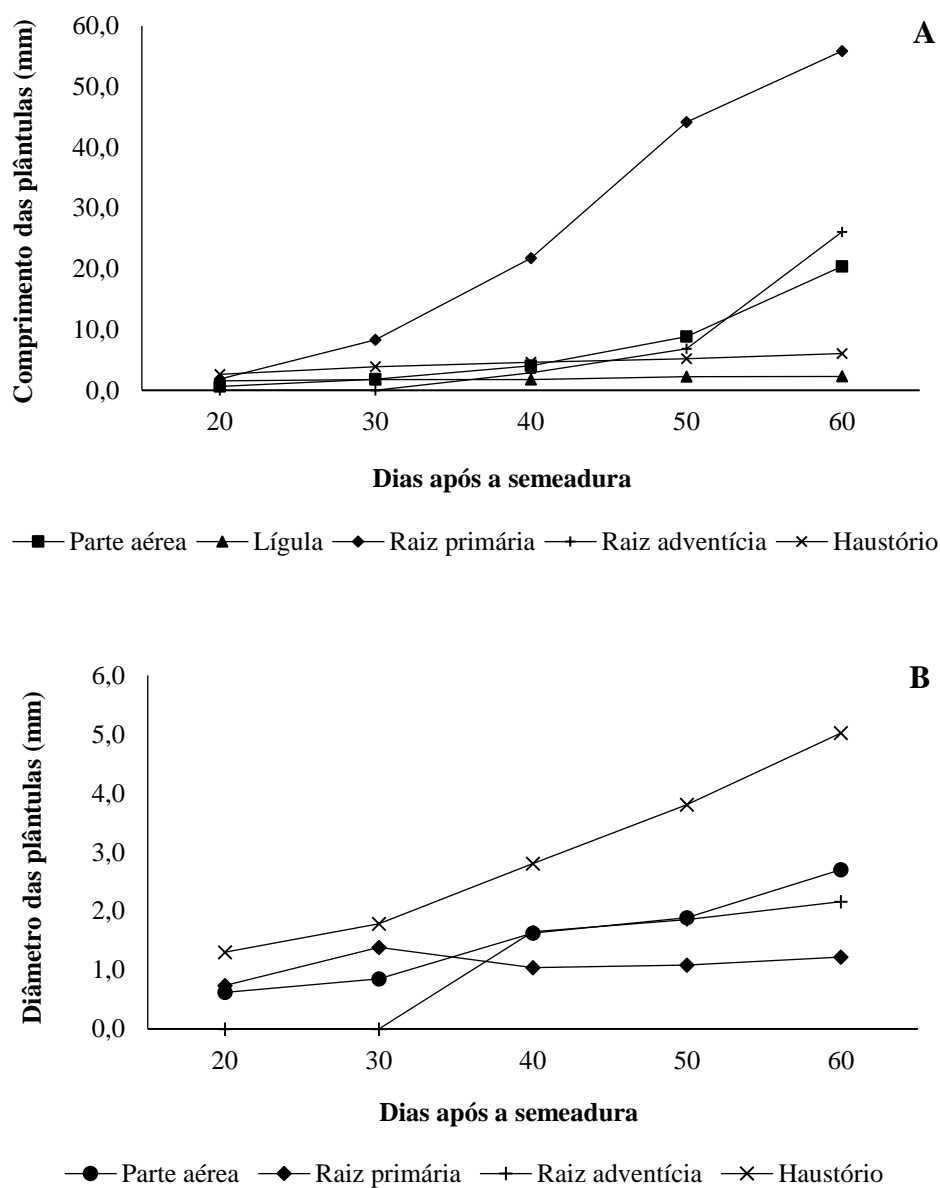
A partir dos 40 dias, notou-se o desenvolvimento mais pronunciado das raízes e do primeiro catafilo (alongamento) e apontamento do segundo catafilo, envolvidos pela lígula (Figura 5G). Além da formação de raízes secundárias, observou-se a formação de raiz classificada como “shoot-borne” ou adventícia (HENDERSON, 2006), com espessura superior às demais raízes, porém com o comprimento inferior ao da raiz principal (Figura 5G), supondo-se que sua principal função seja a de sustentação. Raiz adventícia com diâmetro superior ao da raiz principal também foi mencionado por Gentil e Ferreira (2005) durante o processo germinativo de *Astrocaryum aculeatum* G. Meyer. Aos 50 dias de avaliação, verificaram-se crescimento mais pronunciado do haustório. Notou-se também o engrossamento da raiz adventícia.

Os 60 dias foram marcados pelo desenvolvimento do segundo catafilo, alongamento das raízes primárias, secundárias e adventícia e crescimento mais expressivo do haustório, que cresceu mais em comprimento que em diâmetro e adquiriu um aspecto esponjoso (Figura 5H). Concomitantemente ao crescimento do haustório observou-se o consumo de reservas do endosperma e consequente redução do seu volume (Figura 13A). Os dois catafilos observados eram pontiagudos e rígidos (Figura 5H), como previamente mencionado por Aguiar e Mendonça (2002).

Além do mais, verificou-se aos 60 dias que todos os eventos supracitados a partir do 20º dia foram visualizados (Figura 5I), o que evidencia a heterogeneidade/assincronia do processo germinativo de *E. precatória* Mart.. Essa heterogeneidade pode estar associada à origem do lote de sementes, geralmente, formado a partir de mistura de progênies (GENTIL; FERREIRA, 2005), ou ainda, devido a variação do grau de maturação entre as sementes (OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Por volta dos 80 dias, as plântulas apresentaram-se bem vigorosas, com eófilo esverdeado evidente (Figura 5J) e sistema radicular bem desenvolvido.

Com relação as dimensões das plântulas durante período de 20 a 60 dias após semeadura das sementes, foram observados acréscimos para todas as estruturas analisadas, com aumentos mais expressivos para o comprimento das raízes primárias e adventícias com 54,1 e 23,2 mm, e parte aérea de 19,8 mm, respectivamente (Figura 7A), e diâmetro do haustório com 3,7 mm (Figura 7B). Essas observações também coincidem com o constato na morfologia e anatomia das plântulas neste período, com alongamento

das regiões caulinar e radicular e aumento do volume do haustório para absorção das reservas do endosperma.



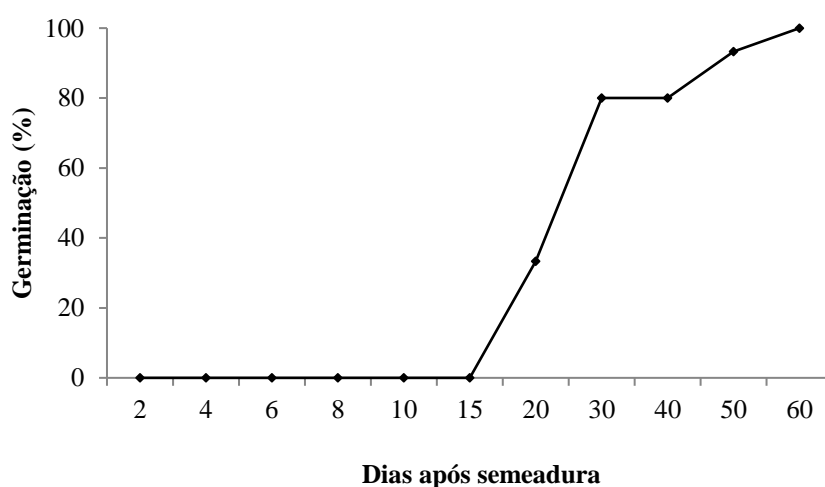
**FIGURA 7.** Comprimento (A) e diâmetro (B) médio (mm) de diferentes estruturas de plântulas de *Euterpe precatoria* Mart. no período de 20 a 60 dias, após a semeadura.

A germinação das sementes de *E. precatoria* Mart. é classificada como criptocotiledonar, hipógea e adjacente ligular, a qual tem sido comum nos gêneros da subfamília Arecoideae (PINHEIRO, 2001). Nessa categoria de germinação, segundo Aguiar e Mendonça (2002), o pecíolo cotiledonar cessa seu alongamento quando o eixo embrionário emerge da semente fazendo com que a plântula se desenvolva próxima à mesma, ou seja, sem alongamento expressivo do pecíolo cotiledonar. Por outro lado,

Oliveira, Mendonça e Araújo (2010) afirmam que, nessa categoria de germinação não ocorre o alongamento do pecíolo cotiledonar. Uma estrutura chamada lígula é formada, da qual a plúmula se projeta (PINHEIRO, 2001; OLIVEIRA; MENDONÇA; ARAÚJO, 2010). A germinação de outras palmeiras como *A. aculeatum* G. Meyer (GENTIL; FERREIRA, 2005), *Oenocarpus minor* Mart. (OLIVEIRA; MENDONÇA; ARAÚJO, 2010) e *Mauritia flexuosa* L. f. (SILVA *et al.*, 2015) também é classificada como adjacente ligular.

Esse tipo de germinação é típico de ambientes úmidos, uma vez que, nesses ambientes não há a necessidade de enterramento do eixo embrionário mediante alongamento do cotilédone para evitar dessecação, uma vez que, não representa uma vantagem ecológica (PINHEIRO, 2001; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Essas observações corroboram com a distribuição geográfica da palmeira em estudo, que ocorre em ambientes de terra firme e de várzea, porém, sem inundação permanente (ROCHA, 2004; GALOTTA; BOAVENTURA; LIMA, 2008).

Como foi considerado critério tecnológico (BRASIL, 2009) para germinação de *E. precatoria* Mart., com protrusão da raiz e emissão da lígula, apenas aos 20 dias após sementeira foi observado plântulas com essas duas estruturas (33,33%). Contudo, os percentuais de germinação foram acrescidos de acordo com aumento dos dias após sementeira das sementes em vermiculita, mas máxima germinação (100%) só foi verificada aos 60 dias (Figura 8), caracterizando assim, uma germinação relativamente lenta e heterogênea.



**FIGURA 8.** Percentual de germinação de sementes em função dos dias após sementeira de *Euterpe precatoria* Mart. em vermiculita. Critério de germinação: emissão de raiz e lígula.

Outros estudos com *E. precatória* Mart. confirmam essa lenta germinação das sementes como Lorenzi *et al.* (2004), que relatam ser necessários entre 30 a 90 dias, e Carvalho e Nascimento (2018), que observaram germinação entre 40 a 88 dias após cultivo. Os últimos autores sugerem a possibilidade de existência de algum mecanismo de dormência que controla a germinação. Bernardes (2010) concluiu que a germinação do *E. precatória* Mart., é consideravelmente mais lenta e desuniforme que a do *E. oleracea* Mart. e relaciona essa diferença a maior resistência imposta pelo endosperma do *E. precatória* Mart., que é volumoso, homogêneo, sólido e duro (AGUIAR e MENDONÇA 2003). Segundo esses autores, as características do endosperma podem influenciar a absorção de água e substâncias de reservas, o que reflete na necessidade de maior tempo para germinação.

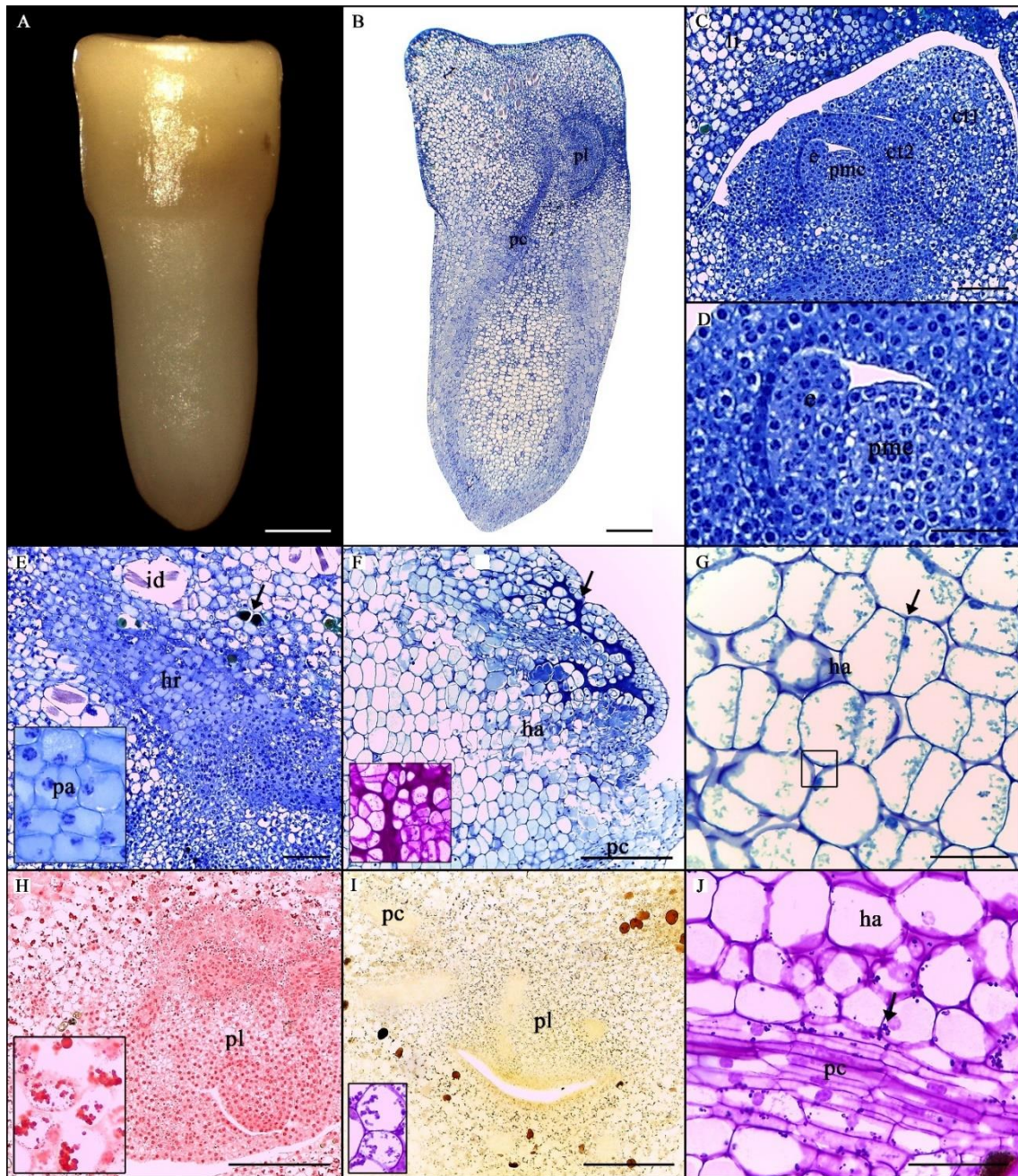
Baskin e Baskin (2014) ao analisar uma revisão de informações sobre o tempo de germinação em palmeiras realizada por Orozco-Segovia *et al.* (2003), sem especificação da unidade de germinação, do critério para definir a germinação e o tempo de germinação, que incluiu 1281 registros publicados em 457 espécies, copilaram os seguintes dados: em cerca de 10% das observações, as sementes germinaram em 30 dias, e para os outros 90%, o tempo de germinação variou entre 31 a 40 dias. De acordo com Baskin e Baskin (2014), o fato da maioria delas necessitarem de mais de 30 dias para germinar e por apresentarem embriões pouco desenvolvidos são indicativos de que a dormência morfológica é a mais comum entre as palmeiras, o que certamente não ocorre com *E. precatória* Mart.. Na espécie em estudo, considerando o critério de germinação a protrusão da raiz primária e emissão lígula (primeira estrutura da parte aérea da espécie), o processo germinativo se inicia aos 20 dias em vermiculita (Figura 8).

Estudos morfoanatômicos e histoquímicos do processo germinativo de palmeiras são escassos apesar da significativa importância ecológica e econômica da família, da sua diversidade e complexidade. Para a *Euterpe precatória* Mart. limita-se a Aguiar e Mendonça (2002), que investigaram somente aspectos histológicos, sem acompanhamento da evolução morfológica do processo, o que foi realizado nesse trabalho, como descrito abaixo.

Em termos anatômicos, as análises realizadas aos 4 dias revelaram o início da diferenciação dos dois catafilos caracterizado pelo aumento do volume celular (Figura 9C) e o surgimento do primeiro eófilo (Figura 9C, D). Já a partir de 8 dias de cultivo, observaram-se incremento no volume de células do meristema fundamental do eixo hipocótilo-radícula, o que caracteriza princípio de diferenciação do parênquima (Figura



9E) e início de divisões mitóticas na extremidade distal do haustório, com surgimento de espaços intercelulares (Figura 9F, G) e de uma matriz polissacarídica entre algumas células em divisão (Figura 9F).

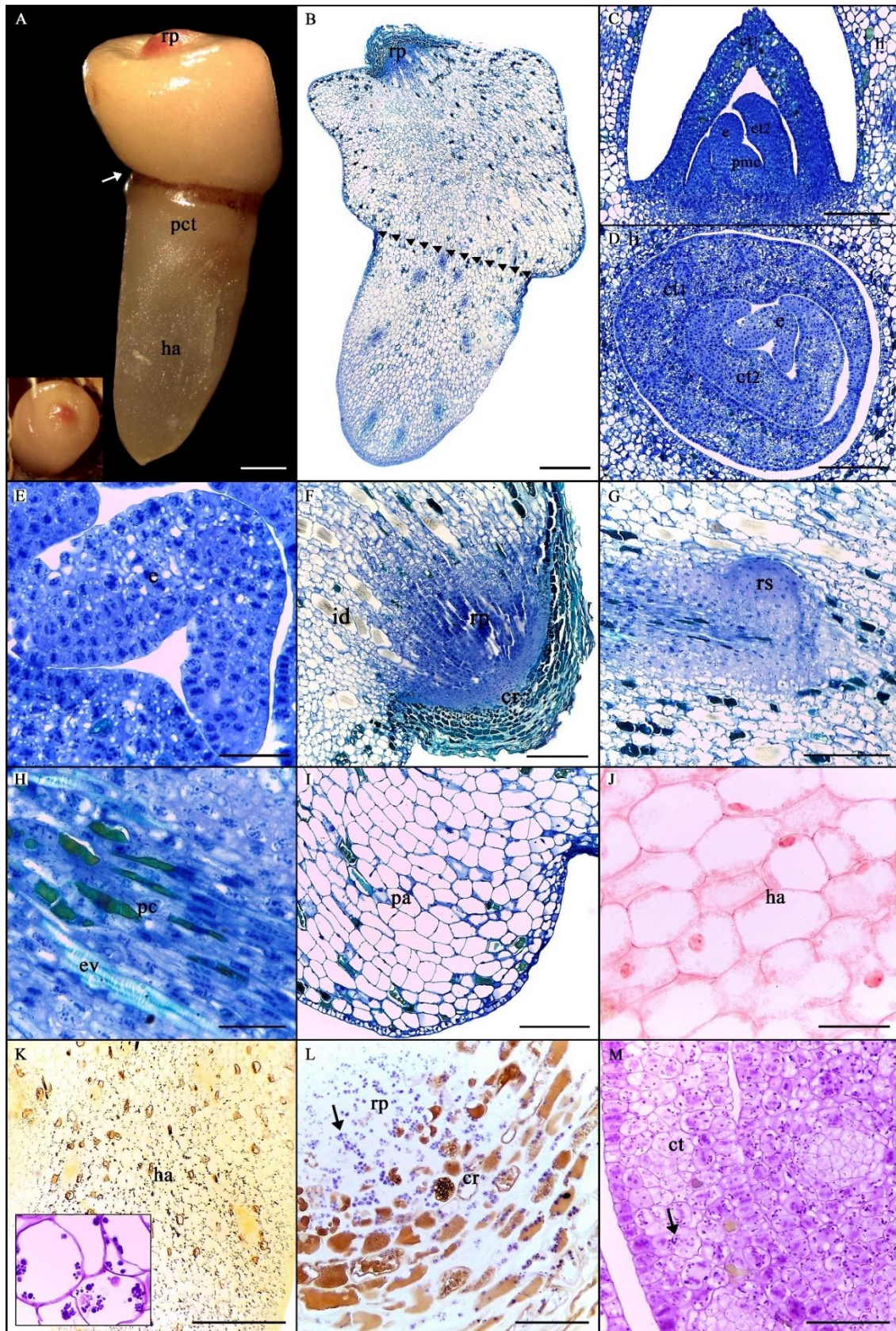


**FIGURA 9.** Aspectos anatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. observados aos 4 (A-D) e 8 dias (E-J) de cultivo em vermiculita. A: Embrião zigótico. B: Secção longitudinal de embrião zigótico. C: Plúmula com dois catafilos em desenvolvimento e surgimento do eófilo. D: Detalhe do eófilo e promeristema caular. E: Eixo hipocótilo-radícula com princípio de diferenciação de parênquima. F: Células da região haustorial em divisão celular; notar matriz polissacarídica (quadrado lateral – reação com *Periodic Acid Schiff*, PAS). G: Células

parenquimáticas haustoriais em divisão celular; observar espaços intercelulares (quadrado). H: Início de consumo de reservas proteicas nas proximidades da plúmula, conforme corante *Xylidine Ponceau*. I: Grãos de amido na plúmula e suas vizinhanças corados com Lugol e PAS (retângulo lateral). J: Grãos de amido corados com PAS em células parenquimáticas do haustório próximas a cordões procambiais. Abreviações: (ct) catafilo, (e) eófilo, (ha) haustório, (hr) eixo hipocótilo-radícula, (id) idioblasto, (li) lígula, (pa) parênquima, (pc) procâmbio, (pl) plúmula e (pmc) promeristema caulinar. Barras: A, B = 500  $\mu\text{m}$ ; I: 200  $\mu\text{m}$ ; C, F, H: 100  $\mu\text{m}$  e D, G, J: 50  $\mu\text{m}$ .

Em termos histoquímicos, verificou-se que a partir do quarto dia, houve leve consumo de proteínas (corpos proteicos com dimensões reduzidas) nas proximidades do eixo embrionário e na região central do haustório, conforme reação positiva com *Xylidine Ponceau*. Esse consumo gerou vacúolos contendo resquícios de proteína (Figura 9I). Nos 8 primeiros dias, além de início de mobilização de reservas proteicas, observou-se incremento na quantidade de grãos de amido no eixo embrionário e suas proximidades (Figura 9J) e na extremidade distal, sobretudo, nas vizinhanças dos cordões procambiais (Figura 9J), de acordo com *Periodic Acid Schiff* e Lugol.

Já aos 15 dias, os eventos anatômicos associados ao processo germinativo tornaram-se mais pronunciados, tais como: i) catafilos e primeiro eófilo mais definidos, com tecidos vasculares em diferenciação (Figura 10C, D, E); ii) início de protusão da raiz principal com idioblastos alongados (Figura 10F) e da formação de raízes secundárias oriundas do periciclo da raiz primária (Figura 10G); protusão radicular favorecida pelo acúmulo em uma camada adjacente de compostos fenólicos, caracterizando a capa da raiz ou coifa (Figura 10F); iii) intensa divisão celular nas células procambiais e diferenciação de elementos de vaso (Figura 10H); iv) alongamento e diferenciação de células parenquimáticas na região proximal, caracterizadas pela presença de vacúolos proeminentes; algumas delas em divisão celular, além da marcação do início do pecíolo cotiledonar (Figura 10I) e, v) diferenciação de células parenquimáticas na região haustorial, células vacuoladas e alongadas (Figura 10B, J).



**FIGURA 10.** Aspectos anatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart. observados aos 15 dias de cultivo em vermiculita. A: Embrião zigótico com região proximal intumescida e haustorial alongada; observar marcação entre região proximal e início do pecíolo cotiledonar. B: Secção longitudinal do embrião zigótico

especificado na letra A; observar marcação anteriormente mencionada. C, D: Lígula, catafilos e eófilo em expansão; secção longitudinal e transversal, respetivamente. E: Detalhe do primeiro eófilo. F: Emissão de raiz; notar a capa radicular rica em compostos fenólicos e idioblastos alongados. G: Raiz secundária em formação. H: Diferenciação vascular na região haustorial. I: Detalhe de células parenquimáticas na região proximal. J: Células do haustório desprovidas de conteúdo proteico, de acordo com corante *Xylidine Ponceau*. K: Haustório com inúmeros grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff*, PAS (detalhe lateral). L: Grãos de amido corados com Lugol na raiz. M: Grãos de amido corados com PAS nos catafilos. Abreviações: (cr) capa da raiz, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ha) haustório, (ev) elemento de vaso, (id) idioblasto, (li) lígula, (pa) parênquima, (pc) procâmbio, (pmc) promeristema caulinar, (r) raiz primária e (rs) raiz secundária. Barras: A, B, K = 500 µm; C, D, F, G, I = 200 µm e E, H, J, L, M = 50 µm.

Os eventos *i* e *iv* foram associados à emergência da porção proximal do embrião através do poro germinativo e ao início da formação do botão germinativo (Figuras 5C e 10A), o evento *ii* foi associado à formação de uma protuberância arroxeadada na extremidade proximal (Figuras 5C e 10A), enquanto o evento *v* foi relacionado ao alongamento da região haustorial (Figuras 5C e 10A). Emergência precoce do sistema radicular (evento *ii*) de embriões de *E. precatória* Mart. corroboram com o relato de Aguiar e Mendonça (2002).

A emergência da porção proximal através do poro germinativo é considerada por vários autores indicativo do processo germinativo e está associado ao alongamento do pecíolo cotiledonar (OLIVEIRA; MENDONÇA; ARAÚJO, 2010; RIBEIRO, OLIVEIRA; GARCIA, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2013; NASCIMENTO E SOUZA; RIBEIRO; MERCADANTE-SIMÕES, 2017; VIANA *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2018).

Apesar da emergência da porção proximal, o crescimento do pecíolo cotiledonar se manteve limitado, dada às características típicas da germinação adjacente ligular (Figura 10A). A extrusão do eixo embrionário de *E. precatória* Mart. para fora da semente aparenta ser consequência de uma ação conjunta dos eventos anatômicos ocorridos na região proximal (Figura 10B, I), com aqueles ocorridos na região do pecíolo cotiledonar e haustorial (Figura 10B). Salienta-se ainda, que na literatura não há um consenso com relação aos termos região proximal e pecíolo cotiledonar. Ribeiro, Oliveira e Garcia (2012) e Magalhães *et al.* (2012) dividem o pecíolo cotiledonar de embriões de *A. aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. e *B. capitata* Mart., respectivamente, em região proximal (onde o eixo embrionário se encontra) e mediana (que se alonga). Por outro lado, Henderson (2006) considera o termo pecíolo cotiledonar como sinônimo de porção mediana do cotilédone ou, ainda, como apocole ou hiperfilo e, de acordo com esse autor, tal região é

muito curta em palmeiras com germinação adjacente. Já Tillich (2007) não concorda com o termo pecíolo e sugere como mais apropriado o termo apocole, o qual se aplicaria, exclusivamente, para palmeiras com germinação remota. Viji *et al.* (2015), assim como Tillich (2007), chamam a porção proximal do embrião zigótico de bainha cotiledonar, onde o eixo embrionário se encontra. Essa variabilidade de termos e tipos específicos de germinação inerentes à família Arecaceae, além dos diferentes comprimentos do chamado pecíolo cotiledonar entre as espécies, dificultam o estabelecimento de critérios anatômicos relacionados ao pecíolo cotiledonar como indicativo do processo germinativo. Nesse trabalho, com base nas análises anatômicas, considera-se como marcador morfológico da germinação a extrusão da região proximal e não do pecíolo cotiledonar (Figuras 5B, C e 10A). Essa região, que emerge primeiro, é chamada por alguns autores de botão germinativo (GENTIL; FERREIRA, 2005; OLIVEIRA; MENDONÇA; ARAÚJO, 2010; BASKIN; BASKIN, 2014).

Aos 15 dias, com o início da protusão radicular, as reservas proteicas foram quase que totalmente consumidas, o que resultou na vacuolização celular (Figura 10J). Concomitantemente ao consumo de proteínas, observou-se o surgimento de grãos de amido nas células parenquimáticas da região distal (haustório) (Figura 10K), na região cortical e da coifa da raiz primária em formação (Figura 10L). Observou-se uma capa radicular glicoproteica mediante reação positiva com *Xylidine Ponceau* e *Periodic Acid Schiff*. Verificou-se também grãos de amido localizados nos catafilos subsidiando o seu crescimento (Figura 10M).

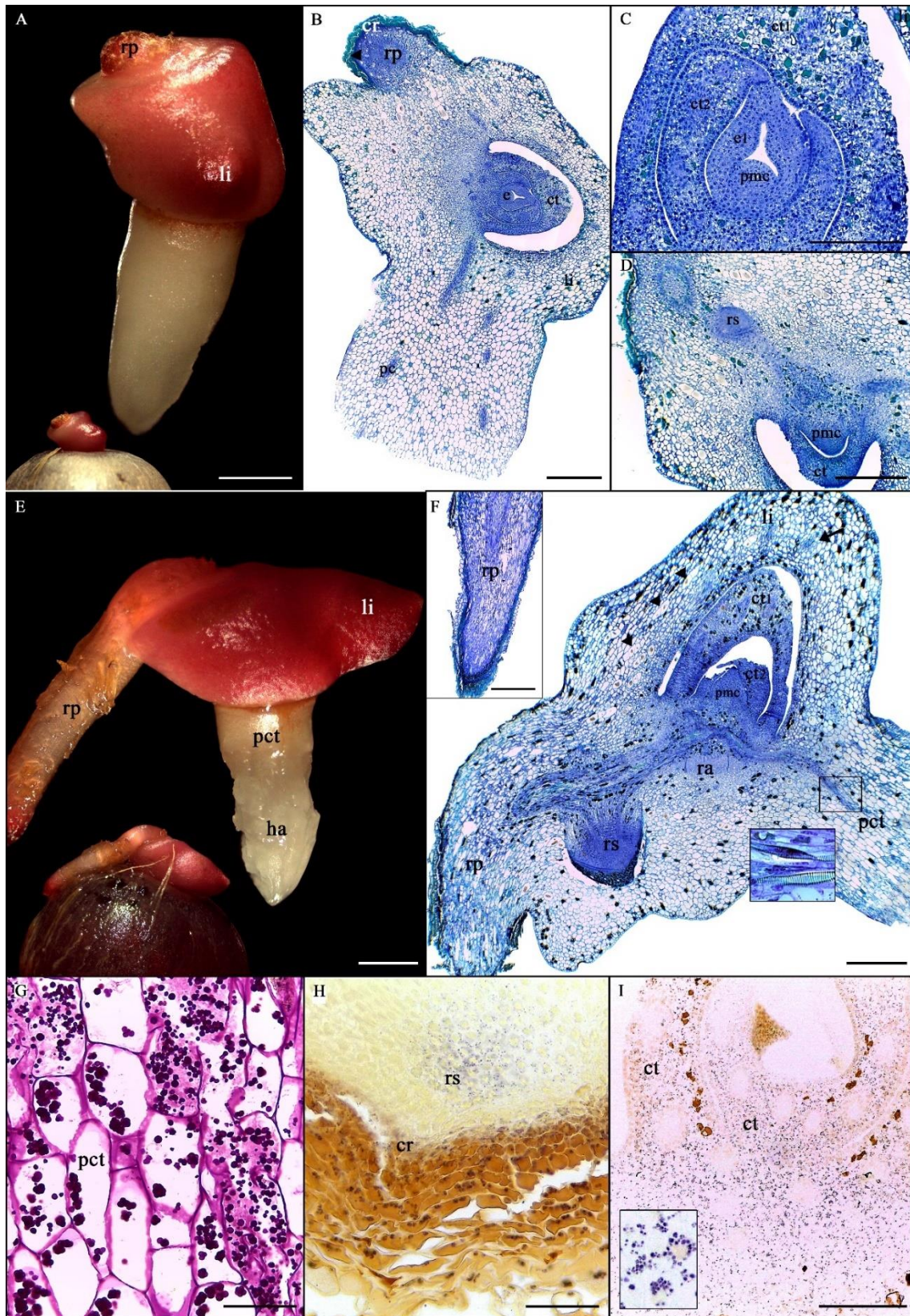
O padrão de consumo proteico caracterizado pela formação de vacúolos também foi verificado durante o processo germinativo de *P. dactylifera* L. (DEMASON, 1985), *W. filifera* (Linden ex André) H. Wendel (DEMASON, 1988b), *B. capitata* Mart. (DIAS *et al.*, 2018) e de espécies de outras famílias botânicas, como *Pinus taeda* L. (STONE; GIFFORD, 1997) e *Olea europaea* L. (ZIENKIEWICZ *et al.*, 2011). Pós hidrólise proteica, corpos proteicos vazios são fundidos, gerando, dessa forma, grandes vacúolos (PERNOLLET, 1978). Os aminoácidos que são gerados podem ser utilizados como fonte de energia e na biossíntese (TAN-WILSON; WILSON, 2011), essenciais para o desenvolvimento do eixo embrionário, considerado o maior sítio de biossíntese de proteínas da semente em processo germinativo (MÜNTZ, 1996). O esgotamento das reservas proteicas observado entre 10 e 15 dias coincide com a diferenciação vascular (Figura 10H), o que certamente intensificou o processo de mobilização, que até o 8º dia foi limitado a uma leve floculação proteica nas laterais do eixo embrionário (Figura 9H)

e, provavelmente, dependente do transporte célula a célula. O surgimento de grãos de amido na região haustorial concomitantemente ao consumo de proteína e à protusão da raiz também foi notificado em *P. dactylifera* L. por DeMason (1985) e em *B. capitata* Mart. (Becc) por Dias *et al.* (2018) e, provavelmente, marca o início de mobilização de reversas do endosperma para o embrião.

Os 20 dias foram marcados histologicamente pela expansão da lígula que altera o posicionamento do eixo embrionário com relação ao haustório (Figura 11C, E, F), início de diferenciação do segundo eófilo (Figura 11B, C) e ruptura radicular completa (Figuras 11B, E, F). Alguns embriões exibiram também desenvolvimento mais pronunciado de raízes secundárias (Figura 11D, F), algumas, inclusive, com coifa definida circundada por compostos fenólicos (Figura 11F) e princípio de raiz adventícia (Figura 11F). A lígula exibia células vacuoladas com formatos variados, intercaladas por feixes vasculares em diferenciação, além de idioblastos ricos em compostos fenólicos e ráfides, os quais também foram observados nos catafilos e na raiz primária (Figura 11F). Visualizou-se também conexão vascular (diferenciação de elementos de vaso) do eixo embrionário com o haustório em desenvolvimento via pecíolo cotiledonar (Figura 11F), o qual não apresentou alongamento expressivo dadas as características da germinação do tipo ligular adjacente. Já a região do pecíolo cotiledonar apresentava células alongadas e vacuoladas, com núcleos pouco volumosos e laterais (Figura 11F).

Aos 20 dias, reservas proteicas foram completamente consumidas e grãos de amido conspícuos foram observados em células do pecíolo cotiledonar (Figura 11G) e haustório, na raiz primária (Figura 11H), na lígula e nos catafilos em desenvolvimento (Figura 11I). O acúmulo de grãos de amido na região haustorial aumentou conforme incremento das suas dimensões, que se tornou mais visível, embora ainda discreto, a partir do 30º dia (Figura 12D).

O acúmulo de grãos de amido na região haustorial de palmeiras tem sido associado a conversão de lipídeos, provavelmente via ciclo de glioxilato, em sacarose (BORNMAN *et al.*, 2003; GRAHAM, 2008), que pode ser armazenada temporariamente como amido e, então, transportado para o eixo embrionário em crescimento (ALANG *et al.*, 1988; SUGIMUMA; MURAKAMI, 1990; VIJI *et al.*, 2015; MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2017).



**FIGURA 11.** Aspectos anatômicos e histoquímicos de plântulas de *Euterpe precatoria* Mart. observados aos 20 dias de cultivo em vermiculita. A: Plântula; notar raiz e lígula. B: Secção longitudinal da plântula da letra A; expansão da lígula, catafilos e eófilo e emissão da raiz primária com idioblastos. C: Meristema apical com eófilo em crescimento. D: Raiz secundária em formação. E: Plântula com lígula e raiz desenvolvidos. F: Secção longitudinal da plântula da letra D; notar expansão da lígula

com feixes vasculares em diferenciação (seta), raiz primária (detalhe na lateral), raiz secundária, início de raiz adventícia, diferenciação vascular no pecíolo cotiledonar (retângulos), idioblastos (cabeças de setas) e compostos fenólicos. G: Pecíolo cotiledonar com conspícuos grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff*. H: Grãos de amido corados com Lugol nos primórdios foliares e suas proximidades. I: Grãos de amido na plúmula e suas vizinhanças corados com Lugol. Abreviações: (cr) capa da raiz, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ha) haustório, (li) lígula, (pc) procâmbio, (pct) pecíolo cotiledonar, (pmc) promeristema caulinar, (ra) raiz adventícia, (rp) raiz primária e (rs) raiz secundária. Barras: A = 2 mm; E = 1mm; B, D, F = 500 µm; C = 250 µm; I = 200 µm e G, H = 50 µm.

De acordo com Mazzottini-dos-Santos, Ribeiro e Oliveira (2017), o haustório tem papel relevante na conversão de compostos de reserva do endosperma em açúcares e o consequente transporte para o eixo embrionário. Em concordância com esses autores, Dias *et al.* (2018) associaram o incremento no crescimento de plântulas de *B. capitata* Mart. (Becc) com a degradação de reservas lipídicas do endosperma concomitantemente ao acúmulo transiente de amido no haustório. Segundo Gugimuma e Murakami (1990), essa conversão em açúcares está relacionada às células epidérmicas e subepidérmicas do haustório que são metabolicamente ativas.

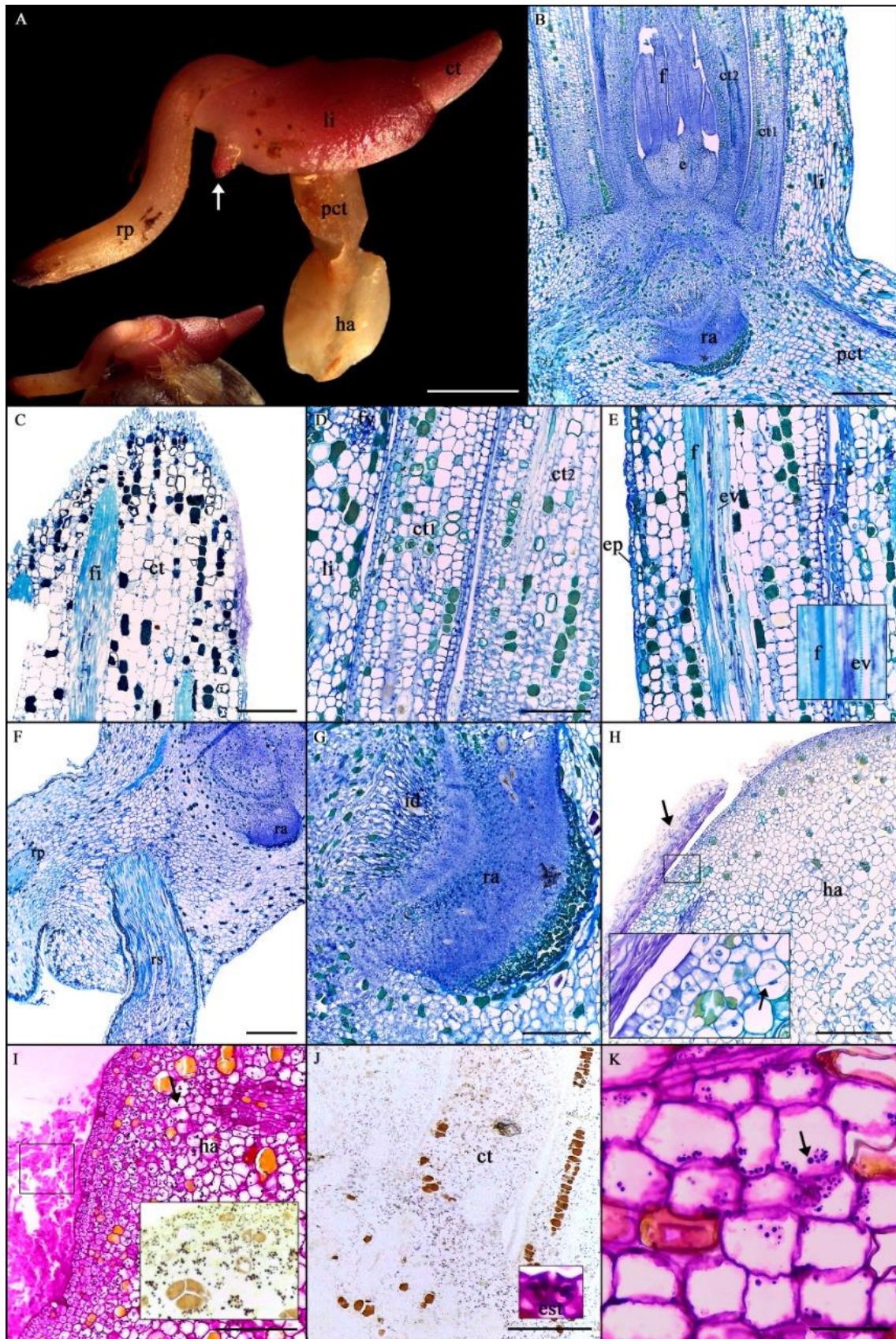
Aos 30 dias de cultivo, foram observados os seguintes eventos: a abertura da lígula e consequente exposição do primeiro catafilo tubular e pontiagudo (Figuras 5F e 12A, C), com evidente diferenciação de fibras associadas aos feixes vasculares, sobretudo no seu ápice (Figura 12C). De acordo com Robertson (1983), isso confere resistência mecânica e auxilia na sua saída por meio da fenda cotiledonar, bem como, na posterior penetração no solo; desenvolvimento do primeiro eófilo com folíolos individualizados, com forma pinada típica (Figura 12B) e formação de raízes secundárias a partir do periciclo da raiz primária e desenvolvimento mais pronunciado da raiz adventícia, a partir de cordões vasculares do hipocótilo (Figura 12A, B, F), ambas com ráfides e compostos fenólicos na capa radicular. Notou-se também, expansão mais visível da região haustorial (Figura 12A, H).

Aguiar e Mendonça (2002) optaram por classificar as raízes de *E. precatória* Mart., além da principal, como secundárias, uma vez que, segundo esses autores, tais raízes foram visualizadas a partir do periciclo da raiz primária. Contudo, nesse trabalho, além das raízes secundárias, observou-se formação de raiz adventícia proveniente de cordões vasculares do hipocótilo (Figura 12B, F), em concordância com os relatos de Henderson (2006). De acordo com esse último autor, *E. precatória* Mart. apresenta raiz adventícia (“shoot-borne root”) que, posteriormente, assume a função da raiz principal, a qual é classificada como efêmera.



Os catafilos exibiam epiderme uniestratificada composta por células de tamanho homogêneo e justapostas, com núcleos evidentes e formato variando entre quadrado a retangular (Figura 12D, E), além de estômatos (Figura 12E). O mesofilo foi caracterizado por células com formato variando entre quadrangular a retangular, dispostas em fileiras paralelas, algumas ricas em idioblastos com compostos fenólicos e ráfides (Figura 12B, D, E), os quais também foram observados na lígula (Figura 12B, C, D). Feixes vasculares envoltos por uma bainha esclerenquimática foram visualizados no mesofilo (Figura 12E). O haustório exibia células vacuoladas, algumas em divisão, espaços intercelulares conspícuos e epiderme envolvida em alguns pontos por uma camada polissacarídica (Figura 12J, K).

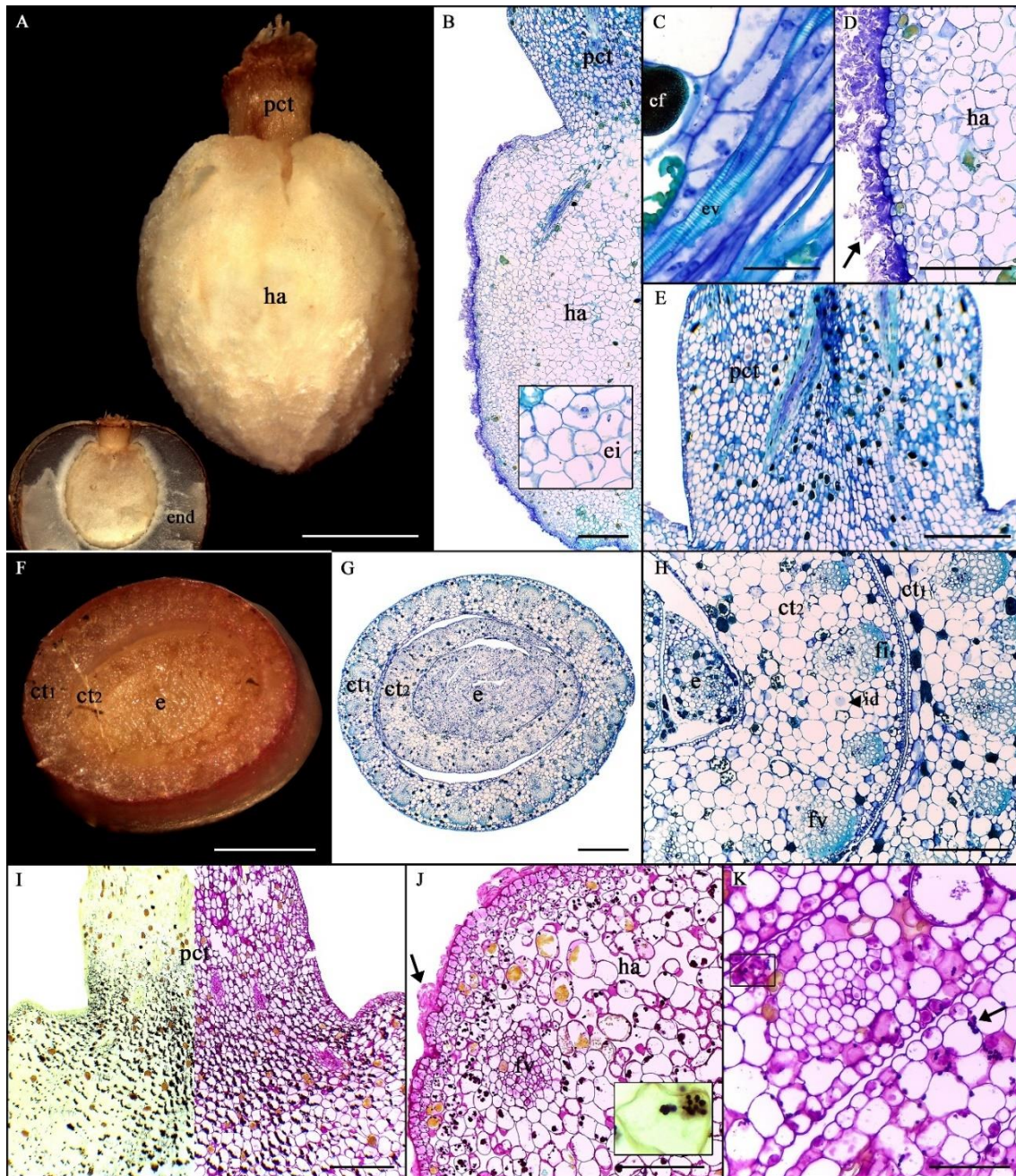
Aos 30 dias, verificou-se incremento significativo do número e volume de grãos de amido no pecíolo cotiledonar e no haustório, principalmente, na sua epiderme e subepiderme (Figura 12K), nos catafilos, inclusive, em células guardas dos estômatos (Figura 12L, M), na lígula e na coifa da raiz adventícia.



**FIGURA 12.** Aspectos anatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. observados aos 30 dias de cultivo em vermiculita. A: Plântula; notar catafilo exposto. B: Secção longitudinal da plântula da letra A; observar folíolos em crescimento e raiz adventícia. C: Extremidade distal do catafilo com fibras e compostos

fenólicos. D: Lígulas e catafilos; observar fileira de compostos fenólicos. E: Catafilo com fibras próximas aos feixes vasculares em diferenciação; notar estômato (quadrado). F: Raiz principal, secundária e adventícia. G: Detalhe de raiz adventícia. H: Haustório com camada polissacarídica lateral (seta) e células em divisão (retângulo lateral). I: Células do haustório com grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) e Lugol (retângulo lateral); observar camada polissacarídica. J: Grãos de amido corados com Lugol nos primórdios foliares e suas proximidades; detalhe lateral de estômato com grãos de amido corados com PAS. K: Detalhe de células parenquimáticas do catafilo com grãos de amido corados com PAS. Abreviações: (cr) capa da raiz, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ep) epiderme, (est) estômato, (ev) elementos vasculares, (f) folíolo, (fi) fibra, (fv) feixe vascular, (ha) haustório, (id) idioblasto, (li) lígula, (pc) procâmbio, (pct) pecíolo cotiledonar, (pmc) promeristema caulinar, (ra) raiz adventícia, (rp) raiz primária e (rs) raiz secundária. Barras: A = 2 mm; B, H, F = 500 µm; C, D, E, G, I, J = 200 µm e K = 50 µm.

Os 60 dias foram caracterizados pelo desenvolvimento mais significativo do haustório, com consumo gradativo do endosperma e delimitação bem clara do pecíolo cotiledonar (Figuras 5H e 13A, B, E, I). O pecíolo cotiledonar exibia células parenquimáticas vacuoladas e com paredes aparentemente mais espessas ao longo de toda sua extensão, algumas delas alongadas, sistema vascular diferenciado (Figura 13A, B, C, E) e inúmeros compostos fenólicos. O tecido parenquimático do haustório apresentava três regiões distintas: uma central com sinais de desorganização, células maiores, vacuoladas, com formatos irregulares e grandes espaços intercelulares; uma camada epidérmica formada por células com características meristemáticas (pequenas, com núcleos visíveis e com citoplasmas densos) envolvida por uma matriz polissacarídica em algumas regiões e uma camada subepidérmica com células, em sua grande maioria, redondas e com tamanho intermediário (Figura 13B, D, J).



**FIGURA 13.** Aspectos anatômicos e histoquímicos do haustório e segmento foliar de plântula de *Euterpe precatoria* Mart. aos 60 dias de cultivo em vermiculita. A: Haustório. B: Secção longitudinal do haustório. C: Detalhe de feixe vascular da região hasutorial. D: Detalhe da região periférica do haustório (seta apontando matriz polissacarídica). E: Pecíolo cotiledonar. F: Segmento foliar. G: Secção transversal do segmento foliar. H: Segmento foliar caracterizado por catafilos com feixes fibrovasculares. I: Pecíolo cotiledonar com grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff* (PAS). J: Região haustorial com grãos de amido corados com PAS e Lugol (detalhe lateral) (seta apontando matriz polissacarídica). K: Eófilo com grãos de amido corados com PAS; notar estômato (cabeça de seta) com grãos de amido. Abreviações: (cf) composto fenólico, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ei) espaços interelulares, (ep) epiderme, (ev) elemento de vaso, (fi) fibra, (fv) feixe vascular, (ha) haustório, (id) idioblasto e (pct) pecíolo cotiledonar. Barras: A = 2 mm; F = 1 mm; B, E, G, I = 500  $\mu$ m; D, H, J = 200  $\mu$ m e C, K = 50  $\mu$ m.

Conforme DeMason (1984, 1988b), o incremento nas dimensões do haustório de embriões zigóticos de *P. dactylifera* L. e *W. filifera* (Linden ex André) H. Wendel, respectivamente, foi relacionado ao aumento no volume de espaços intercelulares, assim como constatado nesse trabalho. Ainda segundo DeMason (1988a), os espaços intercelulares no interior do haustório são preenchidos com ar, cuja provável função consiste no fornecimento de oxigênio para a degradação do endosperma. Mais recentemente, Dias *et al.* (2018) relataram que a formação de aerênquima e consequente aumento da difusão de oxigênio na região do haustório de *B. capitata* Mart. (Becc) associado a outros fatores fisiológicos induzem o estabelecimento de uma zona de digestão do endosperma e a translocação de reservas para a região haustorial.

Quanto a camada epidérmica com características meristemáticas do haustório, DeMason (1988b) lista as suas possíveis funções, a saber: absorção das reservas do endosperma (produtos da sua degradação), sinalização e secreção de enzimas para o endosperma e atuação como sítios primários do metabolismo de lipídeos no haustório. Já a camada polissacarídica nas proximidades do haustório também foi notificada por Ribeiro, Oliveira e Garcia (2012) durante a germinação *in vitro* de *A. aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. e, certamente, deve estar relacionada a mobilização de reservas do endosperma ou ainda secreção de enzimas, o que precisa ser futuramente investigado.

No haustório foi possível notar também feixes vasculares mais próximos à periferia e invaginações discretas (Figura 13B, D, J), assim como previamente descrito por Aguiar e Mendonça (2002). O posicionamento dos feixes vasculares nas proximidades do endosperma está relacionado provavelmente ao papel de absorção do haustório (DEMASON, 1984). Sugimuma e Murakami (1990) sugerem que o posicionamento dos feixes vasculares mais próximos das células epidérmicas, local de acúmulo de amido, favorece o transporte de amido via tecidos vasculares para a plântula em crescimento até aquisição de autonomia fotossintética.

A ocorrência de pequenas invaginações, por sua vez, é associada ao incremento da área de contato entre o haustório e o endosperma (ROBERTSON, 1983; DEMASON, 1985), facilitando, dessa forma, os processos de secreção e absorção (DEMASON, 1985). Vale salientar que, as invaginações observadas no haustório de *E. precatória* Mart. são mais discretas do que aquelas reportadas em outras palmeiras como *Jubaeopsis caffra* Becc (ROBERTSON, 1983), *C. nucifera* L. (SUGIMUMA; MURAKAMI, 1990), *A. vivipar* Zona (NEVES *et al.*, 2013) e *A. aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. (MOURA; VENTRELLA; MOTOIKE, 2010; RIBEIRO, OLIVEIRA; GARCIA, 2012;

MAZZOTTINI-DOS-SANTOS; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2017).

Conforme as análises de secções longitudinais da parte aérea, os catafilos e eófilo possuem feixes fibrovasculares (Figura 13G, H, K) intercalados por células parenquimáticas circulares com espaços intercelulares (Figura 13G, H, K). O sistema vascular é colateral, com feixes de maior calibre intercalados com feixes de menor calibre e o mesofilo não apresenta distinção de parênquima paliçádico e lacunoso.

Aos 60 dias, verificou-se uma alta concentração de grãos de amido na região do pecíolo cotiledonar (Figura 13I), na extremidade distal do haustório próximo aos feixes vasculares, na protoderme e subprotoderme haustorial (Figura 13J). Esse acúmulo na região do pecíolo cotiledonar está relacionado provavelmente ao transporte de grãos de amido em direção a plântula em formação. Alguns grãos de amido foram observados em algumas células centrais do haustório (Figura 13J), no parênquima do segundo catafilo e nos eofilos em formação (Figura 13K).

Em termos de eventos histológicos, o processo germinativo de *E. precatória* Mart. é relativamente mais lento do que o observado em outras palmeiras, como *B. capitata* Mart. (Becc) (MAGALHÃES *et al.*, 2012), *A. aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. (RIBEIRO, OLIVEIRA; GARCIA, 2012) e *M. flexuosa* L. f. (SILVA *et al.*, 2014). Ressalta-se, contudo, que as análises do processo germinativo dessas duas primeiras foram realizadas em condição *in vitro*, o que certamente modifica os parâmetros relacionados ao processo. Por outro lado, os intervalos de tempo associados aos eventos histológicos marcadores do processo germinativo são similares àqueles descritos por Oliveira *et al.* (2010), em *O. minor* Mart.. Nesse contexto, além dos efeitos inerentes à própria espécie no comportamento temporal dos eventos anatômicos relacionados à germinação, os efeitos dos aspectos relacionados à colheita das sementes, manipulação pós colheita, armazenamento e condições experimentais não podem ser desconsiderados.

Eventos histoquímicos relacionados à mobilização de reservas semelhantes aos supracitados também foram mencionados por Ribeiro, Oliveira e Garcia (2012) em *A. aculeata* (Jacq.) Lood. ex Mart. e por Silva *et al.* (2014) em *M. flexuosa* L. f., porém, com maior precocidade comparativamente a *E. precatória* Mart.. Salienta-se que estudos de mobilização de reservas durante os estágios iniciais de desenvolvimento do eixo embrionário durante o processo germinativo de palmeiras, apesar da relevância, ainda são escassos na literatura, considerando sobretudo o alto número de espécies que compõem a família Arecaceae (cerca de 2600 espécies) (BAKER; DRANSFIELD, 2016).

Observações morfoanatômicas e histoquímicas realizadas nesta pesquisa, como frutos com casca fina, germinação adjacente ligular, alto teor de umidade das sementes (33%) quando dispersas da planta mãe, presença de compostos fenólicos, vacúolos e amido (fonte adicional de energia) em embriões zigóticos, como também menos corpos proteicos na região central do haustório, são indícios importantes para caracterização do comportamento recalcitrante de *E. precatória* Mart..

#### 4. CONCLUSÕES

- Poucas variações biométricas e morfológicas são observadas nos frutos, sementes, e embriões de *E. precatória* Mart.;
- A germinação das sementes de *E. precatória* Mart. é lenta e desuniforme, sendo necessários entre 20 e 60 dias após semeadura;
- A saída da região proximal do embrião do interior da semente por meio do levantamento do opérculo é um indicativo morfológico de sucesso no processo germinativo de *E. precatória* Mart.;
- As observações aqui levantadas com relação às estruturas dos embriões zigóticos e plântulas de *E. precatória* Mart. corroboram com o mencionado para outras palmeiras. Todavia, destacam-se algumas peculiaridades da espécie, como: presença de alta concentração de compostos fenólicos e de idioblastos previamente e durante todo o processo germinativo; grãos de amido localizados no eixo embrionário e; marcação evidente do pecíolo cotiledonar durante os estágios iniciais da germinação;
- Apesar do eixo hipocótilo-radícula dos embriões zigóticos de *E. precatória* Mart. ser anatomicamente menos diferenciado do que a plúmula, isso não se constitui uma limitação ao processo germinativo, uma vez que a emissão radicular ocorre previamente à projeção da lígula e emissão dos catafilos;
- O consumo de reservas proteicas do embrião está relacionado ao fornecimento de energia necessário à protusão radicular;



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, M.O.; MENDONÇA, M.S. Aspectos morfo-anatômicos do embrião de *Euterpe precatoria* Mart. durante o processo germinativo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 241-249, 2002.
- AGUIAR, M.O.; MENDONÇA, M.S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* Mart. (Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, p. 37-42, 2003.
- ALANG, Z. C.; MOIR, G. F. J.; JONES, L. H. 1988. Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis*). *Annals of Botany*, v. 61, p. 261–268.
- ARAÚJO, M. G. P.; LEITÃO, A. M.; MENDONÇA, M. S. Morfologia do fruto e da semente de inajá (*Attalea maripa* (Aubl.) Mart.) – Palmae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 31-38, 2000.
- BAKER, W. J.; DRANSFIELD, J. Beyond Genera Palmarum: progress and prospects in palm systematics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 182, p. 207-233, 2016.
- BASKIN, M. B.; BASKIN, C.C. What Kind of Seed Dormancy Might Palms Have? **Seed Science Research**, v. 24, n. 1, p. 17-22, 2014.
- BERNARDES, R. S. A. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe precatoria* Mart.) submetidas ao aumento da temperatura**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas). INPA, Manaus, Brasil.
- BORNMAN, C. H.; DICKENS, O. S. P.; MERWE, C. F. VAN DER; COETZEE, J.; BOTHA, A. M. Somatic embryos of *Picea abies* behave like isolated zygotic embryos in vitro but with greatly reduced physiological vigour. **South African Journal of Botany**, v. 69, n. 2, p. 176-185, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA - ACS, 2009. 395 p.
- CAREY, A. N.; MILLER, M. G.; FISHER, D. R.; BIELINSKI, D. F.; GILMAN, C. K.; POULOSE, S. M.; SHUKITT-HALE, B. Dietary supplementation with the polyphenol-rich açaí pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 238 – 245, 2015.
- CARDOSO, I.M.A.S. **Embriogênese somática de gueroba [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.] com ênfase em aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais**. 2018, 359 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais), Universidade de Brasília, Brasília.
- CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Technological innovations in the propagation of Açaí palm and Bacuri. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 1, p. 664 -679, 2018.

- COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. The Chemistry of Seeds. In: COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. **Principles of Seed Science and Technology**. Boston: Springer, 1999. p. 40-58.
- CRUZ, E. D.; MARTINS, F. O.; CARVALHO, J. U. Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke, Leguminosae - Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 2, p. 161-165, 2001.
- DEMASON, D. A. Embryo structure and storage reserve histochemistry in the palm *Washingtonia filifera*. **American Journal of Botany**, v. 75, n. 3, p. 330-337, 1988a.
- DEMASON, D. A. Seedling development in *Washingtonia filifera* (Arecaceae). **Botanical Gazette**, v. 149, n. 1, p. 45-56, 1988b.
- DEMASON, D. A. Growth parameters in the cotyledon of date seedlings. **Botanical Gazette**, v. 145, p. 2, p. 176-183, 1984.
- DEMASON, D. A. Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera* L.). **Protoplasma**, v. 126, p. 168-177, 1985.
- DIAS, D. S.; RIBEIRO, L. M.; LOPES, P. S. N.; MELO, G. A.; MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Haustorium–endosperm relationships and the integration between developmental pathways during reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae) seeds. **Annals of Botany**, v. 122, n. 2, p. 267-277, 2018.
- GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; LIMA, L. A. R. S. Antioxidant and cytotoxic activities of ‘açai’ (*Euterpe precatoria* Mart.). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1427-1430, 2008.
- GENTIL, D.F.O.; FERREIRA, S.A.N. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 337-342, 2005.
- GENOVESE-MARCOMINI, P. R.; MENDONÇA, M. S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Embryonic development of *Syagrus inajai* (Spruce) Becc. (Arecaceae, Arecoideae), an Amazonian. **Australian Journal of Botany**, v. 61, p. 611-621, 2013.
- GONÇALVES, L. G. V.; ANDRADE, F. R.; MARIMON JUNIOR, B. H.; SCHOSSLER, T. R.; LENZA, E.; MARIMON, B. S. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n.1, p. 31 – 40, 2013.
- GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, n. 59, p. 115-142, 2008.
- HENDERSON, F. Morphology and anatomy of palm seedlings. **The Botanical Review**, v.72, n. 4, 273-329, 2006.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE – Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura – 2017. Disponível em:

<<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2017>>. Acesso em: 28 de novembro de 2018.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.

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

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart.. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 671 – 677, 2012.

LAIBACH, N.; POST, J.; TWYMAN, R. M.; GRONOVER, S. C; PRÜFER, D. The characteristics and potential applications of structural lipiddroplet proteins in plants. **Journal of Biotechnology**, v. 201, p. 15-27, 2015.

LIMA, M. JR.; HONG, T. D.; ARRUDA Y.M.B.C.; MENDES, A.M.S.; ELLIS. R.H. Classification of seed storage behaviour of 67 Amazonian tree species. **Seed Science and Technology**, v. 42, p. 363-392, 2014.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; COSTA, J. T. M.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, Plantarum, 2004.

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**, v. 27, p. 273-283, 2012.

MATOS, F. S.; NUNES, Y. R. F.; SILVA, M. A. P.; OLIVEIRA, I. S. Variação biométrica de diásporos de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f. – Arecaceae) em veredas em diferentes estágios de conservação. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 833-842, 2014.

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

MENDONÇA, M.S.; OLIVEIRA, A. B.; GRACIMAR, M.; ARAÚJO, P.; ARAÚJO, L. M. Morfo-anatomia do fruto e semente de *Oenocarpus minor* Mart. (Arecaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 90-95, 2008.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v. 67, p. 399-407, 2010.

NASCIMENTO, W. M. O.; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D. L. C. CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1 p. 024 - 033, 2010.

NASCIMENTO E SOUZA, J.; RIBEIRO, L. M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O. Ontogenesis and functions of saxophone stem in *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Annals of Botany**, v. 119, n. 3, p. 353-365, 2017.

- NAZÁRIO, P.; FERREIRA, S. A. N.; LIMA E BORGES, E. E.; GENOVESE-MARCOMINI, P. R.; MENDONÇA, M. S. Anatomical and histochemical aspects of the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) seed. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p. 171-178, 2013.
- 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.
- MAZZOTTINI-DOS-SANTOS, H.C.; RIBEIRO, L.M.; OLIVEIRA, D.M.T. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. **Protoplasma**, v. 254, n. 4, p. 1563-1578, 2017.
- MÜNTZ, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 298, p. 605-622, 1996.
- O'BRIEN T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCYLLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, A.B.; MENDONÇA, M.S.; PACHECO, M.G. Aspectos anatômicos do embrião e desenvolvimento inicial de *Oenocarpus minor* Mart.: uma palmeira da Amazônia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 20-24, 2010.
- 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**, v. 27, p. 1633-1645, 2013.
- OROZCO-SEGOVIA, A.; BATIS, A.I.; ROJAS-ARECHIGA, M.; MENDOZA, A. Seed biology of palms. **Palms**, v. 47, n. 2, 79–94, 2003.
- PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MALDONADO, S. Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 145, p. 445-453, 2004.
- PACHECO-PALENCIA, E. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199 – 1205, 2009.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill, 1972.
- PERNOLLET, J.-C. Protein bodies of seeds: Ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1473-1480, 1978.
- PEIXOTO, H.; ROXO, M.; KRSTIN, S.; RÖHRIG, T.; RICHLING, E.; WINK, M. An

Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 6, p. 1283–1290, 2016.

PINHEIRO, C.U.B. Germination strategies of palms: the case of *Schippia concolor* Burret in Belize. **Brittonia**, v. 53, p. 519-527, 2001.

PONTES, M. S.; SANTIAGO, E. F.; NOBREGA, M. A. S.; FREITAS, V. M. B. Caracterização morfológica usando dimensões lineares sobre os atributos biométricos em sementes de *Annona reticulata* (L.) Vell. (Annonaceae). **Ciência Florestal**, v. 28, n. 2, p. 696-707, 2018.

QUIROGA, Y. M. C.; GÓMEZ, M. S. H.; MARY, L. Componentes Bioactivos del Asai (*Euterpe oleracea* Mart. y *Euterpe precatoria* Mart.) y su efecto sobre la salud. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v. 36, n. 3, p. 58 - 66, 2017.

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**, v. 26, p. 851-863, 2012.

ROBERTSON, B. L. Developmental anatomy of the seedling of *Jubaeopsis caffra*. **South African Journal of Botany**, v. 2, n. 2, p. 152-161, 1983.

RODRIGUES, J.K.; MENDONÇA, M.S.; GENTIL, D.F.O. Aspectos biométricos, morfoanatômicos e histoquímicos do pirênio de *Bactris maraja* (Arecaceae). **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, p. 075-085, 2015.

ROCHA, E. Potencial ecológico para o manejo de frutos de açazeiro (*Euterpe precatoria* Mart.) em áreas extrativistas no Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, n 2, p. 237 – 250, 2004.

SANTOS-MOURA, S. S. **Morfologia de frutos, diásporos, plântulas, mudas e cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.** 2013, 73 f. Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns.

SHARMA, A.; KUMAR, D.; KUMAR, S.; RAMPURIA, S.; REDDY, A. R.; KIRTI, P.B. Ectopic Expression of an atypical hydrophobic group 5 LEA protein from wild peanut, *Arachis diogeni* confers abiotic stress tolerance in tobacco. **Plos one**, v. 11, n. 3, p. 1-31, 2016.

SILVA, R.S.; RIBEIRO, L.M.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O.; NUNES, Y.R.F.; LOPES, P.S.N. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*) - the swamp palm. **Flora**, v. 209, n. 11, p. 674-685, 2014.

SILVA, A. C. D.; SMIDERLE, O. J.; OLIVEIRA, J. M. F.; SILVA, T. J. Tamanho da semente e substratos na produção de mudas de açaí. **Advances in Forestry Science**, v. 4, n. 4, p. 151-156, 2017.

STONE, S. L.; GIFFORD, D. J. Structural and biochemical changes in loblolly pine

(*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early-seedling growth. I Storage protein reserves. **International Journal of Plant Sciences**, v. 158, n. 6, p. 727-737, 1997.

SUGIMUMA, Y.; MURAKAMI, T. Structure and function of the haustorium in germinating coconut palm seed. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 24, p. 1-14, 1990.

TAN-WILSON, A.L.; WILSON, K. Mobilization of seed protein reserves. **Physiol Plantarum**, v. 145, p. 140-153, 2011.

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

TOMLINSON, P.B. **The structural biology of Palms**. New York: Clarendon Press Oxford, 1990. 477p.

VERDEIL, J.L.; HOCHER, V. Digestion and absorption of food in plants: a plant stomach. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 6, p. 280-281, 2002.

VELOSO, V.H.S.; RIBEIRO, L.M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y.R.F. Cytological aspects of recalcitrance in dormant seeds of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 171, p. 1-12, 2016.

VIANA, F.A.P; COSTA, A.P.; MORO, F.V.; PIVETTA, K.F.L. Morpho-anatomical characterization of diaspores and seedlings of *Livistona rotundifolia*. **Ornamental Horticulture**, v. 22, n. 3, p. 249-255, 2016.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochemie**, v. 15, p. 289-296, 1970.

UMARANI, R; AADHAVAN, E. K.; FAISAL, M. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. **Current science**, v. 108, n. 11, p. 2023-2034, 2015.

VJI, V.; CHANDRA, R.; SALIM, P. N.; PUTHUR, J. T. Germination-associated morphological and anatomical changes in *Corypha umbraculifera* L. seeds. **Phytomorphology**, v. 65, n. 12, p. 11-17, 2015.

ZIENKIEWICZ, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. C.; ZIENKIEWICZ, K.; ALCHÉ, J. D.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. I. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. **Protoplasma**, v. 248, p. 751-765, 2011.

ZONA, S. Raphides in palm embryos and their systematic distribution. **Annals of Botany**, v. 93, p. 415-421, 2004.

WESLEY-SMITH, J.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C.W. Ultrastructural evidence for the effects of freezing in embryonic axes of *Pisum sativum* L. at various water contentes. **Annals of Botany**, v. 76, n. 1, p. 59-64, 1995.

YAMAGUCHI, K.K.L.; PEREIRA, L.F.R.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E.S.; VEIGA-

JUNIOR, V.F. Review Amazon acai: chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137-151, 2015.

### CAPÍTULO III

#### DESSECAÇÃO E CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE SEMENTES DE *Euterpe precatoria*

#### Mart. - ARECACEAE

#### RESUMO

O *Euterpe precatoria* Mart. é uma espécie nativa da Floresta Amazônica com significativo potencial de uso. A utilização racional dessa palmeira requer estudos de vários aspectos relacionados à fisiologia de suas sementes, especialmente, por não perfilhar. Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da dessecação e conservação das sementes de açaí solteiro na qualidade fisiológica das sementes e embriões. Para isso, frutos foram coletados de plantas matrizes no município de Plácido de Castro, Estado do Acre, Brasil. Para avaliar a tolerância à dessecação das sementes, as mesmas foram dessecadas artificialmente por sete períodos: 0, 24, 48, 96, 120, 168 e 216 horas. Para conservação, as sementes e embriões foram armazenadas em diferentes condições: 6, 25, -20 e -196 °C (nitrogênio líquido). Foi também realizada a caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões zigóticos oriundos de sementes dessecadas. As sementes de *E. precatoria* manifestaram sensibilidade à dessecação, com valores críticos de germinação e vigor obtidos ao atingirem a umidade de 16,88%. Já as umidades de 12,02 e 8,97% proporcionaram efeitos letais à germinação. Para o IVG os maiores valores foram obtidos quando as sementes não foram dessecadas (28,41% de umidade), com valores máximos de 2,8 para germinação convencional e 4,27 para germinação *in vitro*. Em nível anatômico foram observados danos na plúmula de embriões com 8,97% de umidade e embriões com 8,33% de umidade criopreservados. Portanto, conclui-se que as sementes e embriões zigóticos de *E. precatoria* Mart. mostram-se sensíveis à dessecação e nenhuma das temperaturas de conservação testadas é eficiente na manutenção da qualidade fisiológicas das sementes. Estes parâmetros confirmam o comportamento recalcitrante desta espécie e indicam que outras técnicas necessitam sere desenvolvidas para que se consiga a conservação *ex situ* de germoplasma da espécie.

**Palavras chave:** Arecaceae; fisiologia de sementes; palmeira açaí; recalcitrancia; conservação de sementes; teor de umidade.



## 1. INTRODUÇÃO

A família Arecaceae, na qual as palmeiras fazem parte, engloba parte do grupo das monocotiledôneas e é considerada uma das mais antigas famílias de angiospermas no mundo. Essa família de plantas é uma das mais conhecidas e importantes pela diversidade de espécies, em razão da ocorrência em diferentes habitats e por fazer parte da cultura e da economia dos seres humanos. As palmeiras se destacam ainda pela variedade de usos, como produtos, alimentos e paisagismo (MARTINS; FILGUEIRAS; ALBUQUERQUE, 2014; CHIDURUPPA; AHMAD; PANDIAN, 2018).

O gênero *Euterpe* se sobressai entre as palmeiras, pois concentra aproximadamente 28 espécies com ocorrência nas Américas Central e do Sul, distribuindo-se por toda bacia Amazônica (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005). No Brasil, as espécies mais conhecidas popularmente são *Euterpe oleracea* Mart., *E. edulis* Mart. e *E. precatoria* Mart.. *E. precatoria* Mart. é uma palmeira nativa da região Amazônica conhecida como açaí-do-amazonas, açaí-solitário ou solteiro, pelo fato de apresentar um estipe solitário (AGUIAR; MENDONÇA, 2003; BENTES-GAMA *et al.*, 2005; YAMAGUCHI *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2018), sendo a semente a única maneira para propagação natural da espécie.

O *Euterpe precatoria* Mart. é uma das espécies nativas amazônicas com significativo potencial produtivo e econômico, dada a sua multiplicidade de usos, com destaque para os frutos utilizados na alimentação humana, com crescente demanda no mercado (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005; PINTO, 2018). Seus frutos têm chamado a atenção da comunidade científica pelas propriedades medicinais, dentre as quais se destacam ações anticancerígenas, cardioprotetoras (QUIROGA; GÓMEZ; LARES, 2017) e antioxidantes (MARTINOT; PERREIRA; SILVA, 2017). Um estudo realizado com os frutos desta espécie em diferentes ecossistemas amazônicos comprovou que os mesmos detêm características essenciais para a nutrição humana, como fonte de energia, fibra alimentar, antocianinas, minerais, particularmente, cálcio e potássio, e os ácidos graxos oleico e linoleico (YUYAMA *et al.*, 2011).

No entanto, mesmo com o aumento na demanda pelos frutos de *E. precatoria* Mart., de acordo com Pinto (2018), existe uma série de fatores que dificulta a sua produção em escala comercial, entre os quais citam-se a rusticidade dos atuais sistemas de produção, as pequenas áreas de cultivo, a sazonalidade e limitações do processo de extrativismo e a domesticação incipiente da espécie. Dentro dessa conjuntura, visando

atender de forma sustentável os programas de plantios, melhoramento e conservação *ex situ* da espécie são necessários mais estudos para solucionar tais gargalos. Porém, apesar da importância ecológica e econômica dessa espécie, a literatura ainda é limitada nos diferentes aspectos, principalmente, no que se refere a sua propagação, sensibilidade à dessecação e conservação de suas sementes.

De fato, a utilização racional de qualquer espécie exige o conhecimento de vários aspectos relacionados à fisiologia das sementes, como germinação e tolerância à dessecação. As informações sobre os teores de umidade crítico e letal das sementes são importantes para o planejamento e a execução da secagem, definição da tecnologia mais adequada de armazenamento e produção de mudas (MARTINS; NAKAGAWA; BOVI, 1999; NASCIMENTO; NOVEMBRE; CICERO, 2007; JOSÉ, ERASMO; COUTINHO, 2012).

Porém, é totalmente variável entre as espécies a capacidade fisiológica das sementes quanto à sensibilidade a dessecação pós-colheita (FONSECA; FREIRE, 2003). Dentro de gênero e mesmo dentro da espécie essa sensibilidade pode variar, sendo necessários estudos específicos. Essa variação, em grande parte das espécies recalcitrantes, pode estar associada a diminuição do teor de umidade das sementes durante a fase final do desenvolvimento, que é acompanhada por aumento da tolerância à dessecação (PAMMENTER; BERJAK, 1999). Para Félix *et al.* (2017), em palmeiras, essa variação ocorre, principalmente, devido as diferentes condições climáticas nos ambientes de ocorrência natural das espécies.

De acordo com Roberts (1973), as espécies que não toleram à dessecação das suas sementes são chamadas de recalcitrantes. As sementes dessas espécies apresentam baixa longevidade, por serem sensíveis a redução do teor de umidade inferior a 23% (ANDRÉO; NAKAGAWA; BARBEDO, 2006) e, portanto, devido a rápida deterioração. Esta condição de recalcitrância das sementes requer cuidados adicionais de conservação da diversidade genética de espécies de plantas *ex situ* (WALTERS *et al.*, 2013), pois o armazenamento de sementes com altos teores de umidade e temperaturas acelera o metabolismo causando uma rápida deterioração, ocasionando a germinação antecipada ou aumentando a ação dos microorganismos. Além do mais, se armazenadas à baixas temperaturas pode haver a formação de cristais de gelo, causando a ruptura das paredes celulares, com a perda da viabilidade. Por outro lado, dessecar as sementes até níveis muito baixos de teores de umidade pode também levar a perda do poder germinativo, antes mesmo de armazená-las. Assim, torna-se essencial conhecer o teor de umidade

crítico para cada espécie.

Além dos aspectos já mencionados, estudos anatômicos e histoquímicos durante a secagem das sementes são importantes para que se compreenda a perda da viabilidade nas espécies recalcitrantes, promovendo conhecimentos sobre o que ocorre internamente nos embriões e quais tipos de danos, regiões e membranas estão sendo afetadas e, por consequência, o comportamento das reservas nutricionais. As respostas desses questionamentos podem contribuir para escolha das tecnologias de secagem e conservação mais adequadas ou então, para que se tenha melhor entendimento do comportamento recalcitrante.

Estudos conduzidos durante os últimos anos estabeleceram o comportamento recalcitrante das sementes das espécies do gênero *Euterpe*, incluindo *E. espiritosantensis* Mart. (MARTINS; NAKAGAWA; BOVI, 1999), *E. edulis* Mart. (REIS *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2009) e *E. oleracea* Mart. (NASCIMENTO; SILVA 2005; NASCIMENTO; NOVEMBRE; CICERO, 2007). Contudo com relação a *E. precatoria* Mart. as pesquisas são ainda bastante limitadas e carecendo de informações quanto à tolerância à dessecação de suas sementes, teores críticos de umidade, tecnologia e temperaturas mais apropriadas para conservação das sementes, como também os danos ocasionados por essas técnicas.

Diante do exposto, este estudo levanta a hipótese, que, assim como as outras espécies do gênero *Euterpe* acima mencionadas, as sementes de *E. precatoria* Mart. são sensíveis à dessecação e se enquadram na categoria de espécies recalcitrantes. Tendo como objetivos avaliar o efeito da dessecação e conservação das sementes de *E. precatoria* Mart. na qualidade fisiológica e vigor de sementes e embriões de, bem como, caracterizar os possíveis danos aos embriões zigóticos a nível anatômico e histoquímico.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de coleta e beneficiamentos dos frutos**

Foram coletados frutos de *Euterpe precatoria* Mart. de plantas matrizes adultas de populações naturais no município de Plácido de Castro, localizado no Estado do Acre, Brasil. Após a coleta, o beneficiamento dos frutos ocorreu pela manutenção em água em temperatura de aproximadamente 40 °C por cerca de 40 minutos, seguido da remoção da polpa em despulpadora mecânica. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em saco de rafe e caixa de isopor identificada e transportadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos II da EMPRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) em Brasília-DF, onde permaneceram em condições de laboratório até o momento de realização dos testes.

### **2.2 Efeito da dessecação na germinação convencional e *in vitro***

Para avaliar a tolerância à dessecação das sementes, as mesmas foram dessecadas artificialmente por sete períodos: 0, 24, 48, 96, 120, 168 e 216 horas. Para isso, as sementes foram colocadas em placas de *Petri* (20 x 100 mm) acondicionadas dentro de dessecadores de vidro, contendo sílica gel e lacrados com plástico filme para evitar a troca de umidade com o ambiente. Após cada período de dessecação foram retiradas sementes para avaliar o teor de umidade e germinação, que ocorreu de forma convencional via sementes em papel *germitest* e via embriões isolados *in vitro*. O teor de umidade foi determinado pelo método de estufa a  $105\pm 3$  °C durante 24 horas, conforme as Regras para Análise de Sementes-RAS (BRASIL, 2009), utilizando-se três amostras de 10 sementes por tratamento.

Para germinação, após serem retiradas do dessecador, as sementes passaram por um processo de assepsia, onde permaneceram imersas por três minutos em álcool etílico 70%, seguidos de 30 minutos em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% de concentração, acrescido de três gotas de Tween 20 para cada 100 ml de hipoclorito. Passados os 30 minutos, as sementes foram lavadas em água destilada e autoclavada por três vezes.

A germinação convencional via sementes foi conduzida em caixas plásticas tipo gerbox, contendo como substrato papel *germitest* autoclavado, previamente umedecido com água destilada e autoclavada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Em seguida

as caixas plásticas foram acondicionadas em câmara de germinação tipo BOD, com temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas.

Para germinação *in vitro* dos embriões zigóticos, após assepsia das sementes, os mesmos foram extraídos em câmara de fluxo laminar, com auxílio de pinças, lâminas de bisturi e alicates. Imediatamente após a extração, os embriões foram inoculados em tubos de ensaio com meio de cultura Y3, formulado por Eeuwens (1976), contendo Fe-EDTA, vitaminas, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de *Phytigel*. Após inoculação, os tubos selados com filme policloreto de polivinila (PVC) transparente e com cerca de 10 ml de meio de cultura cada, foram armazenados em sala de crescimento à temperatura de 25° ± 2 °C, luminosidade de 100 µm.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas onde permaneceram por todo período de avaliação.

Para ambas as formas de germinação foram realizadas observações sobre a germinação a cada dois dias por um período de até 60 dias. Foram consideradas germinadas as sementes e embriões que apresentaram emissão de sistema radicular e expansão da lígula.

As demais repostas das sementes e embriões zigóticos foram categorizadas em cinco classes sendo: i) inviáveis - sementes ou embriões zigóticos indiferentes ao cultivo, exceto pela ocorrência de oxidação na região proximal para os embriões; ii) contaminados - quando sementes e embriões zigóticos apresentavam fungos e/ou bactérias; iii) intumescidos - embriões zigóticos com região distal (haustório) intumescida, essa variável não foi considerada para germinação convencional via sementes; iv) emissão apenas de sistema radicular; v) emissão apenas de parte aérea e iv) plântula completa, com sistema radicular e parte aérea perfeitamente formadas. Outra variável avaliada foi o Índice de Velocidade de Germinação (IVG), obtido segundo a fórmula proposta por Maguire (1962), a partir do próprio teste de germinação, computando-se em dias o número de sementes germinadas.

Para avaliar a tolerância a dessecação adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, cada uma formada por 10 sementes e 10 embriões zigóticos. Os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, uma vez atendido o pressuposto avaliado, foram submetidos à análise variância a 5% de significância e ao teste de médias de Scott-Knott. A análise de regressão polinomial foi realizada apenas para as variáveis germinação e IVG, tanto para germinação convencional quanto para germinação *in vitro*. Para a escolha do melhor

modelo, foram adotados os critérios regressão significativa e  $R^2$ . Para todas as análises utilizou-se o software estatístico R.

### 2.3 Conservação de sementes e criopreservação de embriões zigóticos

Após a coleta das sementes foram determinados o teor de umidade inicial (33%), germinação e IVG, caracterizando assim o controle. Para análise da conservação das sementes foram então estabelecidos três teores de umidade: 21, 17 e 12%. Para isso, as sementes foram colocadas em dessecadores de vidro, contendo sílica gel e lacrados com plástico filme, com acompanhamento da umidade para os teores estabelecidos.

Posteriormente, parte das sementes foram utilizadas para avaliação da germinação e IVG antes do armazenamento, e as demais acondicionadas em embalagens trifoliadas aluminizadas, fechadas em seladora elétrica, e então armazenadas em diferentes temperaturas: 6, 25, -20 °C por 30 e 90 dias e -196 °C (nitrogênio líquido) por 30 dias. Para o armazenamento à -196 °C as embalagens com as sementes foram colocadas em cilindros de alumínio e acondicionadas em botijões com nitrogênio líquido.

Passado os períodos de armazenamento, as embalagens contendo as sementes de todas as umidades estabelecidas foram retiradas das temperaturas de conservação, sendo analisadas a qualidade fisiológica e vigor das sementes. Em seguida as sementes foram desinfestadas conforme a metodologia já descrita (Item 2.2) e inoculadas em caixa gerbox, contendo como substrato 35g de vermiculita (super fina) e umedecida com 120ml de água destilada e autoclavada. Apenas para as sementes conservadas à -196 °C foram extraídos os embriões zigóticos e inoculados em meio de cultura de MS, conforme Murashige e Skoog (1962), complementado com Fe-EDTA, vitaminas, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de *Phytigel*.

As sementes conservadas nas temperaturas de -20 e -196 °C foram descongeladas em banho-maria à 40 °C por 15 minutos após conservação (LUIS, 2013), desinfestadas e inoculadas, como previamente mencionado.

Foram realizadas as seguintes avaliações: determinação do teor de umidade, germinação e IVG (conforme já descrito anteriormente).

Para avaliar o efeito da conservação das sementes adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições de 10 sementes cada. Os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, uma

vez atendido o pressuposto avaliado, foram submetidos à análise variância a 5% de significância e ao teste de médias de Scott-Knott, com auxílio do software estatístico R.

Para criopreservação dos embriões zigóticos, sementes foram desinfestadas conforme já citado anteriormente e, em câmara de fluxo laminar, os embriões foram extraídos manualmente com auxílio de pinças, bisturis cirúrgicos e alicates dentários. Após extração, os mesmos permaneceram na câmara de fluxo laminar em placas de *Petri* por 12 horas para secagem, até atingirem o teor de umidade de 8,33%. Em seguida, foram acondicionados em criotubos e colocados em cilindros de alumínio, os quais foram armazenados em botijões com nitrogênio líquido à -196 °C, onde permaneceram por 48 horas.

Após as 48 horas, os embriões zigóticos foram descongelados dentro dos criotubos em banho-maria à 40 °C por 90 segundos (LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2017), transferidos para câmara de fluxo laminar e inoculados em tubos de ensaio com meio de cultura Y3 (EEUWENS, 1976), contendo Fe-EDTA, vitaminas, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de *Phytigel*. Após inoculação os tubos foram armazenados em sala de crescimento à temperatura de 25° ± 2 °C, luminosidade de 100 µm.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 60 dias para avaliação da germinação.

#### **2.4 Caracterização morfoanatômica e histoquímica de embriões zigóticos**

Para as análises anatômicas, embriões zigóticos com umidade 8,97% após 60 dias *in vitro*, com umidades de 33%, 17% e 12% após 60 dias, e com umidade de 8,33% após 90 dias *in vitro*, foram submetidos às etapas de fixação, desidratação e emblocamento, conforme o seguinte protocolo: fixação em solução de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), por um período de 24 horas (sob vácuo durante a primeira hora), seguida de três lavagens em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por um período de 1 hora cada (sob vácuo); logo após, desidratação em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70% - 100%, 100%) por uma hora cada (sob vácuo) e infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), segundo as especificações do fabricante. Posteriormente, cortes longitudinais e transversais (3-7 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C.

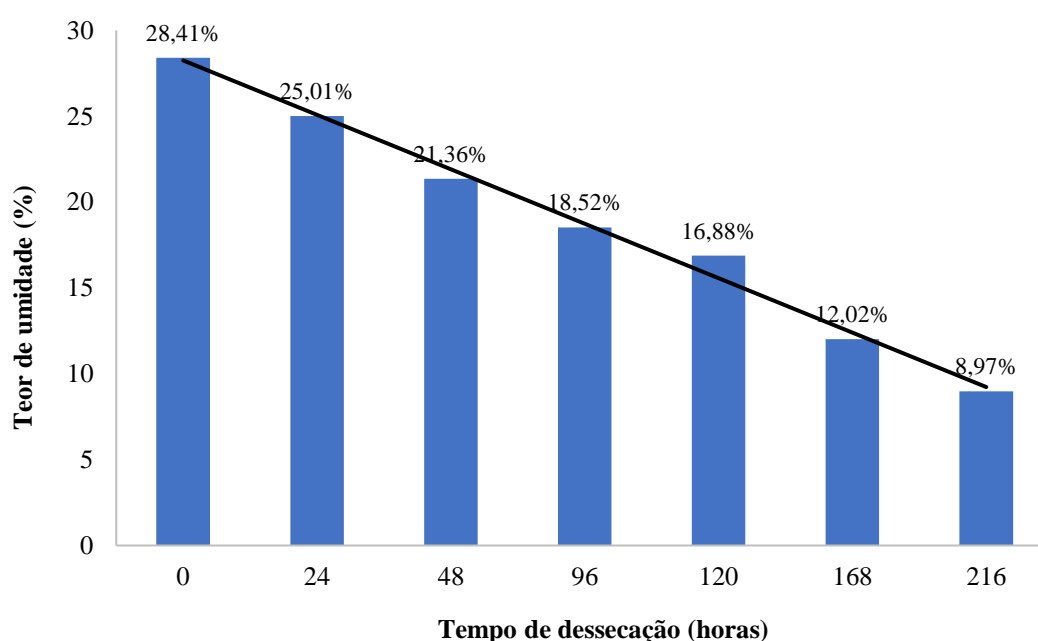
As secções obtidas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos (O'BRIEN *et al.*, 1964). As secções obtidas a partir do material embocado também foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: *Xylidine Ponceau* – XP utilizado para visualização de proteínas (VIDAL, 1970); *Periodic Acid Schiff* – PAS (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) usado para identificar polissacarídeos neutros; Lugol (JOHANSEN, 1940) para detecção de grãos de amido e Sudan IV (PEARSE, 1972) para visualização de lipídeos totais. A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Tolerância à dessecação de sementes

A metodologia para secagem das sementes de *Euterpe precatoria* Mart. foi ser considerada eficiente, com diminuição progressiva do teor de umidade em decorrência do aumento do tempo de exposição à sílica gel (Figura 1). Dessa forma, foi possível avaliar o efeito da dessecação das sementes com relação à qualidade fisiológica, vigor e danos celulares.



**FIGURA 1.** Percentuais de umidade em função do tempo dessecação em horas de sementes de *Euterpe precatoria* Mart. expostas à sílica gel.

Os resultados relacionados ao Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e percentual de germinação convencional (semente) e *in vitro* (embrião zigótico) da palmeira *E. precatoria* Mart. em função dos teores de umidade obtidos pela dessecação artificial das sementes foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Conforme o teste de médias de Scott-Knott, quando se utiliza a germinação convencional, o percentual de germinação e IVG são superiores e iguais entre si nos quatro primeiros tratamentos, os quais correspondem às sementes com os maiores teores de umidades. Esses resultados são semelhantes quando foi realizada a germinação *in vitro* com uso do embrião zigótico (Tabela 1).

**TABELA 1.** Comportamento de sementes e embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. em virtude da dessecação artificial de sementes

Variáveis	Teor de umidade das sementes (%)							Erro Padrão	CV (%)
	28,41	25,01	21,36	18,52	16,88	12,02	8,97		
Germinação convencional (sementes)									
Germinação (%)	83,33 a	93,33 a	83,33 a	76,67 a	30,0 b	0,0 c	0,0 c	8,99	30,04
Índice de velocidade de germinação (IVG)	2,80 a	2,60 a	2,66 a	2,03 a	0,83 b	0,0 b	0,0 b	0,28	39,54
Inviáveis (%)	16,67 b	6,67 b	13,33 b	16,67 b	13,33 b	100,0 a	100,0a	8,60	68,61
Apenas parte aérea (%)	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b	6,67 a	0,0 b	0,0 b	0,66	229,13
Apenas sistema radicular (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Contaminação %	0,0 c	0,0 c	0,0 c	0,0 c	10,0 b	100,0 a	100,0a	9,93	0,0
Germinação <i>in vitro</i> (embriões zigóticos)									
Germinação (%)	60,0 a	63,33 a	46,67 a	36,67 a	20,0 b	16,67 b	0,0 b	5,84	50,22
Índice de velocidade de germinação (IVG)	4,27a	4,27a	3,30a	2,43a	1,50b	1,11b	0,0 b	0,39	46,55
Inviáveis (%)	0,0 b	3,33 b	10,0 b	13,33 b	16,67 b	16,67 b	96,67a	7,13	43,6
Apenas parte aérea (%)	16,67ns	6,67 ns	16,67ns	23,33ns	23,33ns	23,33ns	0,0 ns	2,63	63,64
Apenas sistema radicular (%)	3,33 ns	10,0 ns	3,33 ns	0,0 ns	3,33 ns	3,33 ns	0,0 ns	1,26	173,21
Apenas intumescimento do haustório (%)	16,67ns	16,67ns	16,67ns	16,67ns	20,0 ns	20,0 ns	0,0 ns	2,72	83,5
Contaminação %	3,33 ns	0,0 ns	0,0 ns	3,33 ns	16,67ns	20,0 ns	3,33 ns	2,42	142,68

Médias seguidas de letras iguais na linha não difererem estatisticamente a ( $p < 0,05$ ) de significância. ns = não significativo.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que os percentuais de germinação e valores IVG foram estatisticamente iguais entre os teores de umidades de 28,41 a 18,52. Mas observa-se que os maiores percentuais de germinação ocorreram quando as sementes se encontravam com 25,01% de umidade, 93,33% na germinação convencional e 63,33% na germinação *in vitro*. Contudo, esses valores foram reduzidos à medida que sementes foram dessecadas por intervalos de tempo maiores. Quando atingiu o teor de umidade de 16,88%, os percentuais caíram para apenas 30,0% na germinação convencional e 20,0% na germinação *in vitro*. Entre os limites de 12,02 a 8,97% de umidade a germinação foi praticamente, nula.

Em estudo recente desenvolvido por Costa *et al.* (2018), com a mesma espécie estudada e em relação à tolerância à dessecação de sementes, constatou-se que o percentual de germinação foi considerado alto, independentemente da secagem, com

valor mínimo de 69% em sementes com 11% de umidade. Segundo os autores, não foram encontrados valores críticos ou letais. Essas diferenças nas respostas podem ser atribuídas a uma série de fatores que podem determinar a sensibilidade e padrão de tolerância à dessecação de sementes, mesmo dentro da mesma espécie, como, por exemplo, local de origem, época do ano de produção dos frutos, método de secagem utilizado, ou até mesmo as características dos lotes de sementes. No entanto, mesmo com as possíveis justificativas quanto à tolerância a dessecação entre os dois estudos com *E. precatória* Mart. é necessária cautela em qualquer comparação, visto que, na literatura não foi encontrado outros trabalhos que confirmem um ou outro comportamento.

De maneira geral, sementes de *E. precatória* Mart. manifestaram-se sensíveis à dessecação, com valores críticos de germinação e vigor com 16,88% e letais de 12,02 de umidade. Segundo Martins *et al.* (2009), conhecer os teores crítico e letal de umidade das sementes de uma determinada espécie é importante para o planejamento e execução da secagem, armazenamento e conservação.

A existência de uma faixa e não de um valor único para os teores críticos e letais de umidade, pode ser atribuída às sensibilidades diferenciadas na tolerância à perda de água observada dentro de uma mesma espécie, de acordo com o habitat de origem e à diversidade genética (MARTINS; BOVI; NAKAGAWA, 2007).

Em pesquisas conduzidas com outras espécies de palmeiras do gênero *Euterpe*, alguns autores verificaram resultados semelhantes aos observados neste estudo ao analisarem os efeitos da secagem das sementes. Alguns desses autores, inclusive, enfatizaram o comportamento recalcitrante de sementes, por exemplo, de *Euterpe espirosantensis* Fernandes, popularmente conhecido como palmito-vermelho. Segundo análises, a secagem parcial reduziu os percentuais de germinação, vigor e a longevidade das sementes e, abaixo de 15,8% de umidade, obteve-se a total perda de viabilidade das sementes (MARTINS; NAKAGAWA; BOVI, 1999; MARTINS; BOVI; NAKAGAWA, 2007).

Para *E. oleracea* Mart. foi observado que a diminuição abaixo de 30,3% umidade ocasionou queda na germinação e vigor das sementes e ao atingirem 15,1% umidade, o desempenho fisiológico foi totalmente anulado (NASCIMENTO; SILVA 2005; NASCIMENTO; NOVEMBRE; CICERO, 2007). Com relação ao *E. edulis* Mart., os autores ressaltam que o processo germinativo e vigor das sementes são afetados de maneira negativa à medida que as sementes são desseçadas, sendo que com 20% ou

menos de umidade os prejuízos nessas variáveis são drásticos (REIS *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2009).

Almeida *et al.* (2018) observaram que as sementes da palmeira *Mauritia flexuosa* L.f., conhecida comumente como buriti, também se mostraram sensíveis à dessecação, com maior percentual de germinação (91%) obtido no momento da colheita quando as sementes apresentavam um teor de água de 51%, e diminuição da viabilidade de acordo com a perda de umidade das sementes. Contudo, nem todas as espécies de palmeiras possuem sensibilidade à dessecação tão acentuada. Dias *et al.* (2015), ao estudarem a tolerância à dessecação de sementes da palmeira *Butia capitata* (Mart.) Becc., concluíram que a desidratação para umidade de 10 e 5% não afetou a viabilidade e vigor das sementes, com resultados negativos observado apenas quando elas foram desidratadas a um teor de 3,5% de umidade. Este comportamento foi também verificado por Saleh, Luis e Scherwinski-Pereira (2017) para o babaçu (*Attalea speciosa* Mart.), onde a dessecação das sementes abaixo de 5% de umidade não comprometeu a qualidade fisiológica das mesmas.

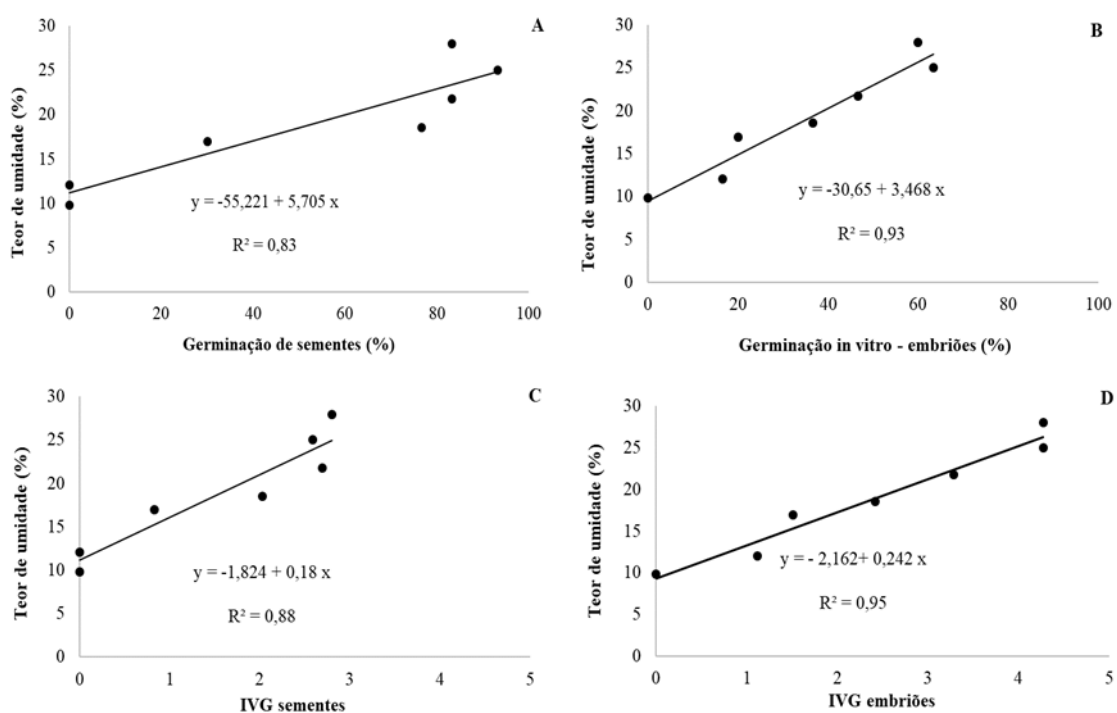
Para o parâmetro vigor das sementes dessecadas, avaliado por meio do Índice de Velocidade de Germinação (IVG), também foi observado decréscimo em função do aumento da dessecação, ou seja, da redução da umidade (Tabela 1). Para essa variável, foram observados os maiores valores quando as sementes não foram dessecadas, com teor de 28,41% de umidade, com valores máximos de IVG de 2,8 para germinação convencional e 4,27 para germinação *in vitro*.

Considerando o fato da germinação *in vitro* ter ocorrido de forma mais rápida quando comparada à germinação convencional, possivelmente, pode não estar associado apenas ao vigor. Isso pode ser explicado pelo embrião estar diretamente em contato com meio de cultura, o que facilita a absorção de água de maneira mais acelerada, enquanto que a semente tem o tegumento e endosperma espesso, que pode ser responsável pela maior demora em absorver água, retardando assim a germinação. Talvez, esse teste de vigor não seja o mais indicado para esse tipo de situação, pois de acordo com Santana e Ranal (2004), o IVG é adequado para comparações apenas quando as amostras ou tratamentos possuem o mesmo número de sementes germinadas, que não é o caso.

É natural que não seja encontrado valores muito elevados de IVG para essa palmeira, considerando que a germinação das sementes é lenta e desuniforme, provavelmente, pela dificuldade imposta pelo endosperma na absorção de água e substâncias de reservas, que de acordo com Aguiar e Mendonça (2003) o endosperma é

volumoso, homogêneo, sólido, duro. Bernardes (2010) salienta que as características morfoanatômicas do endosperma das sementes de *E. oleracea* Mart. e *E. precatoria* Mart. são diferentes, sendo que desta última, o endosperma é mais resistente, fato que pode influenciar na necessidade de mais tempo para completar o processo germinativo dessa espécie e refletir na menor velocidade e uniformidade na germinação quando comparada a *E. oleracea* Mart. Carvalho e Nascimento (2018) compartilham da mesma opinião que as sementes de *E. precatoria* Mart. exibem germinação, consideravelmente, mais lenta que as sementes de *E. oleracea* Mart.. Tais autores sugerem a possibilidade da existência de algum mecanismo de dormência que controla a germinação. Contudo, até o momento, nada foi publicado a respeito dessa possibilidade.

Na análise de regressão polinomial, houve ajustes significativos para o modelo linear tanto para o percentual de germinação convencional e *in vitro* (Figura 2A; 2B), quanto para o IVG convencional e *in vitro* (Figura 2C; 2D), cujos valores diminuíram em função da perda de água das sementes. Os maiores valores de  $R^2$  foram obtidos para germinação ( $R^2 = 0,93$ ) e IVG ( $R^2 = 0,95$ ) *in vitro*, devido possivelmente a maior uniformidade proporcionado pelo cultivo *in vitro* dos embriões, como já discutido anteriormente.



**FIGURA 2.** Variação no percentual de germinação convencional (A) e *in vitro* (B) e do Índice de Velocidade de germinação - IVG convencional (C) e *in vitro* (D) em função teor de umidade de sementes de *Euterpe precatoria* Mart.

Quanto ao percentual de sementes e embriões inviáveis (Figura 3A), esse foi maior nos tratamentos onde as sementes foram submetidas a um maior tempo de dessecação (Tabela 1), com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os dois tipos de germinação, evidenciando que o processo de dessecação das sementes realmente provocou a deterioração das mesmas.



**FIGURA 3.** Diferentes comportamentos de embriões zigóticos de *Euterpe precatória* Mart. inoculados em meio de germinação *in vitro*. A: Embrião zigótico indiferente ao cultivo *in vitro* (inviável), exceto pela ocorrência de oxidação na região proximal. B: Embrião zigótico contaminado com bactéria (seta). C: Embrião zigótico com região distal (haustório) intumescida; notar região proximal oxidada (seta). D: Emissão de sistema radicular. E: Emissão de parte aérea. F: Planta completa. Abreviações: (ct) catafilo, (eo) eofilo, (ez) embrião zigótico e (ha) haustório. Escalas = A, B: 0,5 mm; C: 1 mm; D-F: 5 mm.

Quanto a variável contaminação (Figura 3B), o teste de médias mostrou-se significativo ( $p < 0,05$ ) para germinação convencional, com 100% de contaminação para os tratamentos onde a desidratação das sementes foi mais intensa (12,02 e 8,97%) (Tabela 1). Entretanto, essa alta contaminação pode estar relacionada à total perda de viabilidade das mesmas durante o processo de perda de água. Para germinação *in vitro*, não foram

verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, ou seja, a contaminação ocorreu ou não independe do teor de umidade das sementes.

Com relação as demais variáveis (Figura 3), de acordo com análises dos dados apresentados na Tabela 1, de modo geral e independentemente dos teores de umidade alcançados, irregularidades no processo germinativo, como ocorrência de apenas intumescimento do haustório (Figura 3C) e emissão de somente um dos meristemas (Figura 3D, E), foram mais comuns sob condições de cultivo *in vitro*. Assim, a germinação convencional via sementes inteiras proporcionou maior percentual de plântulas uniformes e normais (Figura 3F). Possivelmente, as irregularidades observadas estão mais relacionadas às condições inerentes ao cultivo *in vitro* do que propriamente aos teores de umidades alcançados.

Assim como para germinação, a emissão das estruturas das plântulas *in vitro* não foi influenciada significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teor de umidade das sementes. É possível associar esse maior número de plântulas anormais a outros fatores, como, ao tipo de meio de cultura, concentração de sacarose e/ou sais presentes no meio de cultura Y3, presença de luz, possíveis injúrias na extração dos embriões, acúmulo de gases no interior dos tubos, entre outros, o que carece de investigações futuras.

Como na literatura não existem estudos que abordem este tema para *E. precatória* Mart., foi necessário recorrer a trabalhos similares com outras espécies de palmeiras para tentar entender os resultados obtidos sob condições *in vitro*. Ribeiro *et al.* (2011) estudaram a germinação de embriões zigóticos de *B. capitata* Mart. Becc. e concluíram que há tendência de diminuição na emissão de raízes, em função da concentração de sais no meio de MS, especialmente na concentração de 100% de sais. De acordo com esses autores, 75% da concentração original do meio de MS é o ideal para essa espécie, o que sugere que a maior disponibilidade de nutrientes inibiu o desenvolvimento do sistema radicular. Para Fermino Junior e Scherwinski-Pereira (2012), na germinação *in vitro*, a concentração de sais no meio de cultura tem influência na adsorção de água durante a fase inicial de embebição da semente.

Lédo *et al.* (2007) analisaram, entre outros fatores, o efeito da concentração de sacarose na germinação de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L., e notaram que a concentração de 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou a maior taxa de formação de plântulas normais (83,33%) e o maior desenvolvimento de parte aérea, com percentuais decrescentes com aumento da concentração.

Os carboidratos desempenham papel importante no cultivo *in vitro*, notadamente, na manutenção de uma osmolaridade adequada e como fonte de energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais como celulose e todos os compostos orgânicos necessários promoção do crescimento embrionário (HU; FERREIRA, 1998; MENDES *et al.*, 2015).

Outro fator que não pode ser negligenciado consiste no acúmulo de etileno no interior dos recipientes utilizados durante o cultivo *in vitro*, em função do sistema de vedação utilizado para evitar contaminações e desidratação. De acordo com Rodrigues *et al.* (2012), a utilização de membranas porosas nas tampas dos recipientes pode influenciar positivamente no cultivo *in vitro*, sugerindo que as trocas gasosas podem favorecer a formação de brotos, o alongamento do ápice da parte aérea e enraizamento.

Alguns autores mencionam inúmeras vantagens quanto à técnica de cultura de embriões zigóticos *in vitro*. Entre outros benefícios, Jesus *et al.* (2003) salientam a superação de dormência de sementes. Souza *et al.* (2012) relatam o menor período necessário para se obter um novo indivíduo e elevado percentual de germinação. Bandeira *et al.* (2013) citam o potencial dessa técnica em viabilizar a produção de mudas em espécies de palmeiras em que, naturalmente, ocorrem problemas na germinação via sementes. Para Ebert *et al.* (2014), é possível produzir plantas com características superiores e com ausência de fitopatógenos, dando suporte para programas de melhoramento genético e conservação das espécies, e por consequência, proporcionar ganhos econômicos. Dadas as vantagens mencionadas, estudos posteriores são necessários para otimizar os parâmetros relacionados ao cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *E. precatória* Mart.

### **3.2 Conservação de sementes e embriões zigóticos**

As sementes recém coletadas, com teor de umidade de 33,0% (controle), exibiram o valor máximo de germinação (100%), como também o maior vigor (3,73), parâmetro este retratado através do IVG, conforme Tabela 2. Estes dois parâmetros foram estatisticamente superiores e diferentes ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos valores provenientes dos demais teores de umidade avaliados. A germinação e IVG das sementes dessecadas até 21 e 17% de teor de umidade foram estatisticamente iguais, com germinação média de 43,33% e IVG de 1,26. Com relação às sementes desidratadas até 12% de umidade, as mesmas não apresentaram indícios de viabilidade, mesmo antes de



serem armazenadas (Tabela 2), confirmando, assim, o efeito nocivo da dessecação na qualidade fisiológica das sementes dessa espécie.

**TABELA 2.** Valores médios de percentual de germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Euterpe precatoria* Mart. com diferentes teores de umidade submetidas a variadas condições de armazenamento

Condições de armazenamento	Teor de umidade (%)	Dias de armazenamento					
		0			30		
		90			90		
		Germinação (%)			IVG		
Controle	33	100,0 a	-	-	3,73 a	-	-
	21	46,67 b	-	-	1,25 b	-	-
	17	40,0 b	-	-	1,27 b	-	-
Sem armazenamento	12	0,0 c	-	-	0,0 c	-	-
	21	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	17	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
- 196 °C/Nitrogênio Líquido	12	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	21	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	17	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
- 20 °C	12	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	21	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	17	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
6 °C	12	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	21	-	0,0	0,0	-	0,03	0,0
	17	-	3,33	0,0	-	0,0	0,0
25 °C	12	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	21	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	17	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	12	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0

Médias seguidas de letras iguais na coluna não difererem estatisticamente a ( $p < 0,05$ ) de significância.

Já aos 30 e 90 dias armazenamento, a germinação foi praticamente nula, independente dos teores de umidades das sementes e temperaturas de armazenamento, (Tabela 2). Dessa forma, pode-se sugerir que, de acordo com os dados obtidos que a ocorrência de deterioração das sementes e que os danos causados pela dessecação e armazenamento foram irreversíveis, o que corrobora com o previamente apresentado na seção 3.1.

Os resultados encontrados neste estudo com relação à conservação de sementes, estão de acordo com outros estudos para o gênero *Euterpe* publicados na literatura. Nascimento, Cicero e Novembre (2010), em estudo semelhante com *E. oleracea* Mart. concluíram que, independentemente da temperatura de armazenamento, as sementes com 21,0% ou menos de água não germinam, e que as sementes com 43,4% de teor de umidade

e armazenadas a 20°C de temperatura podem ser conservadas por até 270 dias. Também para *E. oleracea* Mart., Oliveira *et al.* (2015) recomendam para conservação de sementes, reduzir o teor de água entre 37,0 e 43,0%, acondicioná-las em recipientes de polietileno e mantê-las à temperatura de 20 °C. Para essa mesma espécie, Lima *et al.* (2018) concluíram que 30% foi o teor de umidade mais adequado para conservação das sementes e que o armazenamento por mais de 120 dias reduziu a germinação para valores abaixo de 50%.

Resultados similares foram também observados para *E. edulis* Mart. por Andrade e Pereira (1997), de modo que não houve germinação em nenhuma das temperaturas de armazenamento testadas quando as sementes foram desidratadas à 15% de umidade; mesmo em sementes com teores de umidades maiores, como 30 e 46%, os percentuais de germinação foram significativamente menores em temperatura negativa (-5 °C), em 120 horas de armazenamento. Ainda para *E. edulis* Mart., Andrade (2001) constatou a ocorrência de germinação das sementes armazenadas por 12 meses sob temperaturas de 12 e 15°C e 40% de umidade, sendo indicado pelo autor esse teor de umidade para conservação das sementes da espécie em questão.

Não era esperada a germinação das sementes conservadas com teor de umidade de 12,0% em nenhuma das temperaturas de armazenamento e períodos testados, visto que, já havia sido constatada a total perda de viabilidade das sementes pelo teste de germinação no tempo 0 (zero), ou seja, sem armazenamento.

Não foi observado germinação das sementes em nenhum dos teores de umidades e períodos testados para temperaturas negativas de -196 °C (nitrogênio líquido) e -20 °C. Esse resultado indica que estas temperaturas não foram eficientes para manter viabilidade das mesmas, provavelmente, pela formação de cristais de gelo, devido aos altos teores de umidades das sementes, ausência de crioprotetores e a velocidade de congelamento, assim como reportados por Walters *et al.* (2008). Esses autores salientam que as sementes recalcitrantes devem ser armazenadas sob condições que impeçam a formação de gelo, que é comum em amostras com altos conteúdos de água.

Também não foi registrado germinação para embriões zigóticos dessecados a 8,33% de umidade e criopreservados em nitrogênio líquido a -196 °C, pois, de acordo com os resultados acima discutidos, é possível que os mesmos tenham perdido a viabilidade antes mesmo de serem criopreservados.

A pressuposição de que só existem os congeladores como alternativa de armazenamento, faz com que haja uma percepção equivocada de que sementes

recalcitrantes não podem ser armazenadas (WALTERS *et al.* 2013). A criopreservação tem se mostrado como a técnica mais promissora e prática para armazenar sementes recalcitrantes, por oferecer as vantagens de necessitar de espaço mínimo e baixa manutenção, requisitos fundamentais para o armazenamento a longo prazo (PAMMENTER; BERJAK, 1999; NORZIHA *et al.*, 2017). No entanto, as estratégias utilizadas durante as etapas de criopreservação dependem dos atributos físicos, fisiológicos e genéticos dos diferentes tecidos para manter a viabilidade e integridade genética do germoplasma armazenado (WALTERS *et al.* 2008). Segundo Orozco-Segovia *et al.* (2003), para as palmeiras a criopreservação de embriões, pelas técnicas de encapsulamento ou vitrificação, podem ser opções para sanar as dificuldades da conservação de germoplasma.

Os resultados obtidos com relação à tolerância à dessecação e conservação de sementes de *E. precatória* Mart., sugerem que as suas sementes apresentam comportamento recalcitrante. Lima *et al.* (2014) classificaram o comportamento de armazenamento de sementes de 67 espécies de árvores amazônicas, na qual, a mesma é listada como recalcitrante. Previamente, Orozco-Segovia *et al.* (2003) também listaram *E. precatória* Mart. como recalcitrante.

A categorização quanto ao comportamento das sementes foi, inicialmente, proposta por Roberts (1973), que classificou as sementes como sendo ortodoxas e recalcitrantes. Segundo esse autor, sementes ortodoxas toleram dessecação a baixos níveis de umidade, em torno de 5%, e podem ser armazenadas às baixas temperaturas, o que possibilita a manutenção da viabilidade por um longo período. Além do mais, sementes ortodoxas exibem menor atividade metabólica quando dispersas da planta matriz e possuem baixo conteúdo de água, inferior a 15% de umidade. Já sementes recalcitrantes não toleram ser dessecadas a estas condições e apresentam, portanto, dificuldades de armazenamento.

Bonner (1999, 2008) sugere que as espécies com sementes recalcitrantes sejam classificadas em recalcitrantes temperadas, aquelas que não suportam dessecação, mas toleram armazenamento a baixas temperaturas, ou recalcitrantes tropicais, sendo aquelas que não suportam dessecação a baixos teores de umidade e armazenamentos às baixas temperaturas. O autor sugere conservar em faixas de temperatura entre 12 e 20 °C, embora seja muito variante em função da espécie. Nesse contexto, a baixa tolerância às temperaturas de 6 e 25 °C e aos baixos teores de umidades corroboram com a classificação de *E. precatória* Mart. como recalcitrante tropical. Em concordância ao mencionado pelo

autor, é provável que a temperatura de 6° C tenha sido baixa o suficiente para não manter a viabilidade das mesmas, e a temperatura de 25 °C muito alta, propiciando acelerada atividade metabólica, com aumento da deterioração e a proliferação de fungos e bactérias, como foi observado neste estudo.

De acordo com Fonseca e Freire (2003) identificar corretamente o comportamento de armazenamento de uma espécie é importante para definição da melhor estratégia de conservação e o teor de umidade das sementes é uma questão indispensável neste processo. Diante dos resultados aqui expostos, novos estudos sobre os mecanismos fisiológicos relacionados à dessecação e temperaturas de armazenamento necessitam ser realizados para o açaí solteiro (*E. precatoria* Mart.), tanto para esclarecer o teor de umidade mais adequado das sementes e embriões, como para determinar a faixa de temperatura e método de conservação. A manutenção da baixa temperatura de armazenamento é considerada por Umarani, Aadhavan, Faisal (2015), como a maneira mais eficiente de conter danos que podem ocorrer em sementes com comportamento recalcitrante, danos esses responsáveis pela perda de viabilidade. Além do mais, segundo esses autores, a baixa temperatura também minimiza a ação da microflora associada à semente.

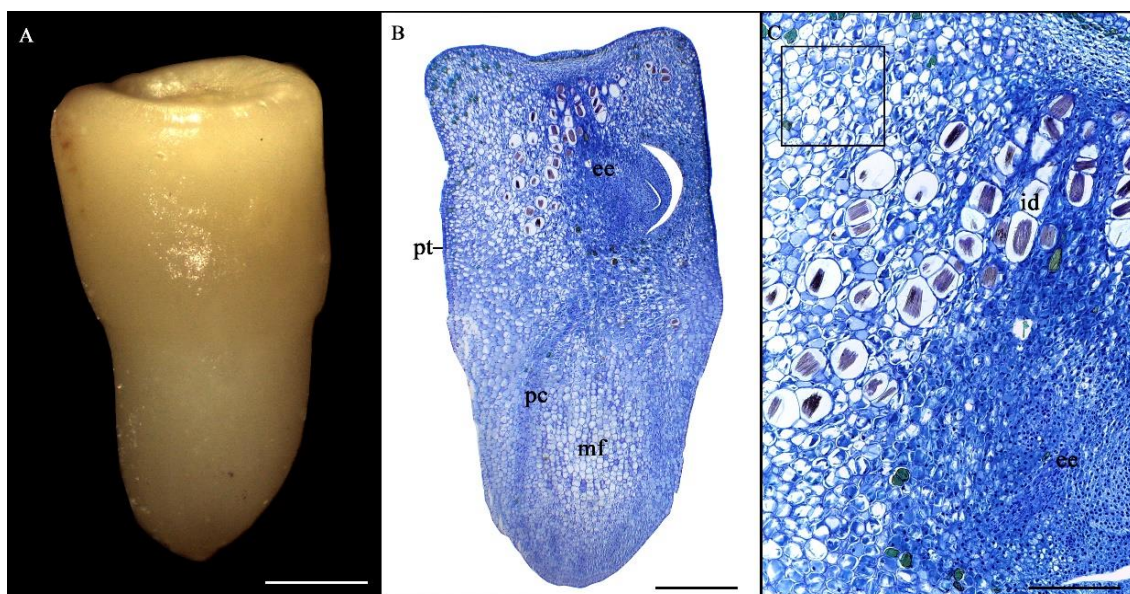
Sementes com comportamento recalcitrante, comportamento esse hipotetizado para *E. precatoria* Mart., representam significantes desafios para a conservação *ex situ*, em função do alto conteúdo de água quando são dispersas da planta matriz, a alta atividade metabólica e baixo potencial de armazenamento (UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015).

Nesse contexto, desenvolver uma estratégia de conservação viável da espécie em questão, torna-se necessário. Para isso, novos estudos precisam ser realizados testando diferentes condições de armazenamento, sobretudo, entre a faixa de temperatura de 10 a 20 °C e teores de umidades acima de 30,0%. Quando o objetivo for o armazenamento a longo prazo, a criopreservação parece ser a alternativa mais promissora, sendo preciso, portanto, o desenvolvimento de protocolos com uso de crioprotetores.

### **3.3 Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos**

De acordo com as análises anatômicas, o embrião zigótico *E. precatoria* Mart. é composto por eixo embrionário, localizado na região proximal, e cotilédone, localizado na região distal (Figura 4). O cotilédone é simples e apresenta protoderme, meristema

fundamental e procâmbio distinguíveis por meio dos formatos e posições de suas células. No eixo embrionário, as células são menores e com arranjo mais compacto em comparação com as demais células do embrião (Figura 4C). Observa-se também abundância de idioblastos com ráfides inclusas e compostos fenólicos (Figura 4B, C), principalmente nas vizinhanças do eixo embrionário, além de células vacuoladas (Figura 4D). A abundância de compostos fenólicos e de células vacuoladas, de acordo com Panza, Láinez e Maldonado (2004) e Veloso *et al.* (2016), é associada com o comportamento recalcitrante.

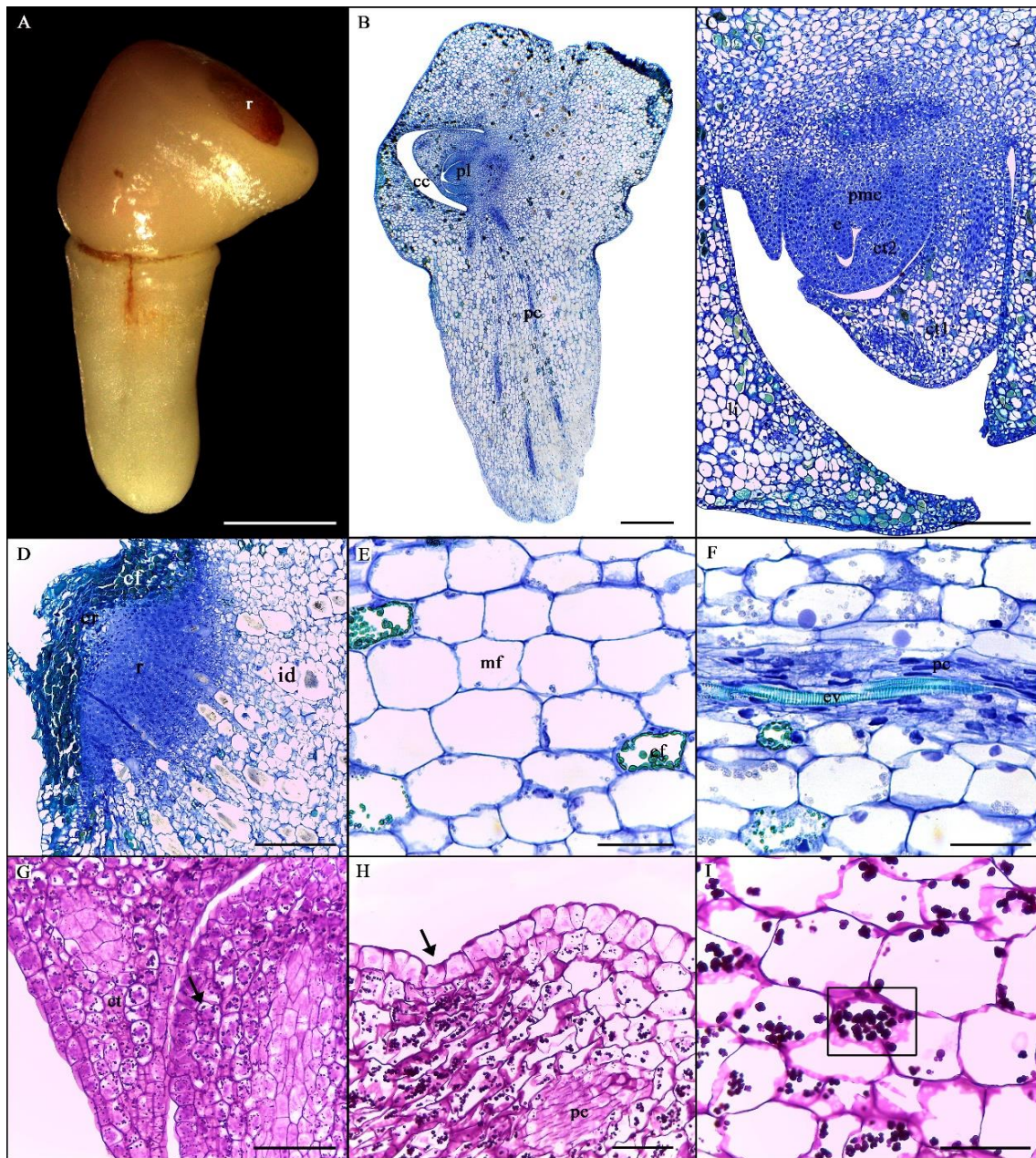


**FIGURA 4.** Embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart.. A: Secção longitudinal de embrião zigótico. B: Detalhe da região proximal; notar células vacuoladas (quadrado). Abreviações: (ee) eixo embrionário; (rd) região distal e (rp) região proximal. Barras = A: 0,5 mm, B: 500  $\mu$ m e C: 200  $\mu$ m.

Os embriões zigóticos provenientes de sementes de *E. precatoria* Mart. com 33% (Figura 5), 17% (Figura 6) e 12% (Figura 7) de umidade, não apresentaram sinais anatômicos de danos ocasionados pelo processo de dessecação, embora, tenha sido notificada germinação somente em amostras com os dois primeiros teores de umidade, o que indica comportamento recalcitrante da espécie.

Embriões zigóticos provenientes de sementes com 33% de umidade, com 15 dias de cultivo em vermiculita analisados anatomicamente exibiram sinais morfológicos evidentes de germinação, como o intumescimento da extremidade proximal caracterizando a formação do botão germinativo (GENTIL; FERREIRA, 2005; BASKIN; BASKIN, 2014), início de protusão radicular e alongamento da região distal do embrião (Figura 5A). Anatomicamente exibiam diferenciação dos dois catafilos, caracterizado

pelo aumento do volume celular e da atividade mitótica (Figura 5B, C); início da diferenciação do primeiro eófilo (Figura 5C); protusão da raiz principal (Figura 5D); diferenciação de células parenquimáticas (células vacuoladas e retangulares) na região haustorial (Figura 5E) e diferenciação de elementos de vaso nos cordões procambiais da região haustorial (Figura 5F), todos indicativos de viabilidade germinativa.

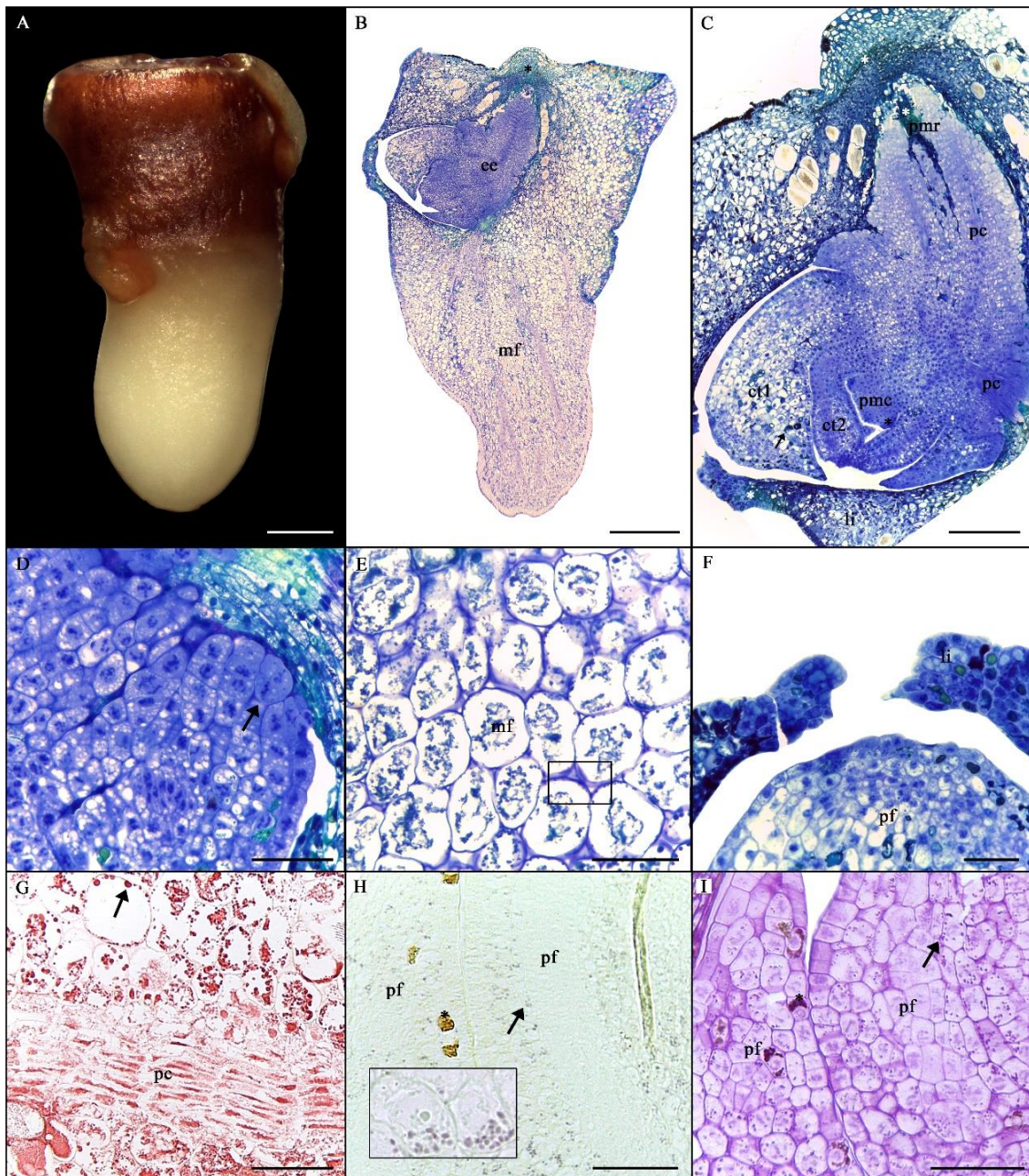


**FIGURA 5.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart., proveniente de semente com 33% de teor de umidade, sem dessecação em sílica e cultivado em vermiculita para germinação. A: Embrião zigótico em processo germinativo; notar lígula e emissão de raiz. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico com primórdios foliares desenvolvidos (A). C: Embrião zigótico em germinação; notar eófilo em desenvolvimento e abertura da fenda cotiledonar. D: Raiz. E: Células do

meristema fundamental da região haustorial. F: Elementos de vaso em diferenciação. G: Grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) em células da plúmula. H, I: Grãos de amido corados com PAS em células da região haustorial; notar invaginações. Abreviações: (cc) cavidade cotiledonar, (cf) composto fenólico, (cr) capa da raiz, (ct) catafilo, (e) eófilo, (ev) elemento de vaso, (id) idioblasto, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar e (r) raiz. Barras = A: 2 mm, B: 500 µm, C, D: 200 µm e E-J: 50 µm.

Indicativos anatômicos do processo germinativo também foram observados em embriões zigóticos com 17% de umidade (Figura 6), tais como: diferenciação dos dois catafilos e início de diferenciação do primeiro eófilo (Figura 6B, C); diferenciação de parênquima no meristema fundamental do eixo hipocótilo-radícula (Figura 6B, C); intensa atividade mitótica ao longo de todo eixo embrionário, sobretudo, nas proximidades do promeristema radicular (Figura 6B, C, D) e vacuolização de células haustoriais (Figura 6F), com formação de nítidos espaços intercelulares.

O conjunto de características anatômicas mencionadas aqui coincidem com aquelas reportadas por autores durante o processo germinativo de diferentes palmeiras como *B. capitata* (Mart.) Becc. (MAGALHÃES *et al.*, 2013), *A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) (RIBEIRO; OLIVEIRA; GARCIA, 2012) e *M. flexuosa* L. f. (SILVA *et al.*, 2014).



**FIGURA 6.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart., proveniente de sementes com 17% de teor de umidade, pós dessecação em sílica e cultivado em vermiculita para germinação. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada e início de germinação (abertura lateral da fenda cotiledonar). B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico com primórdios foliares desenvolvidos (A); observar compostos fenólicos (\*). C: Eixo embrionário em intensa divisão celular; notar catafilos, início de eófilo (\*) e abertura da fenda cotiledonar. D: Intensa divisão celular na periferia do eixo. E: Células do meristema fundamental da porção de transição entre a região proximal e distal com espaços intercelulares. F: Detalhe da abertura da fenda cotiledonar. G: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células próximas aos cordões procambiais saindo da plúmula. H, I: Grãos de amido corados e compostos fenólicos (\*) corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff*, respectivamente, em células da plúmula. Abreviações: (ee) eixo embrionário, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pmc) promeristema



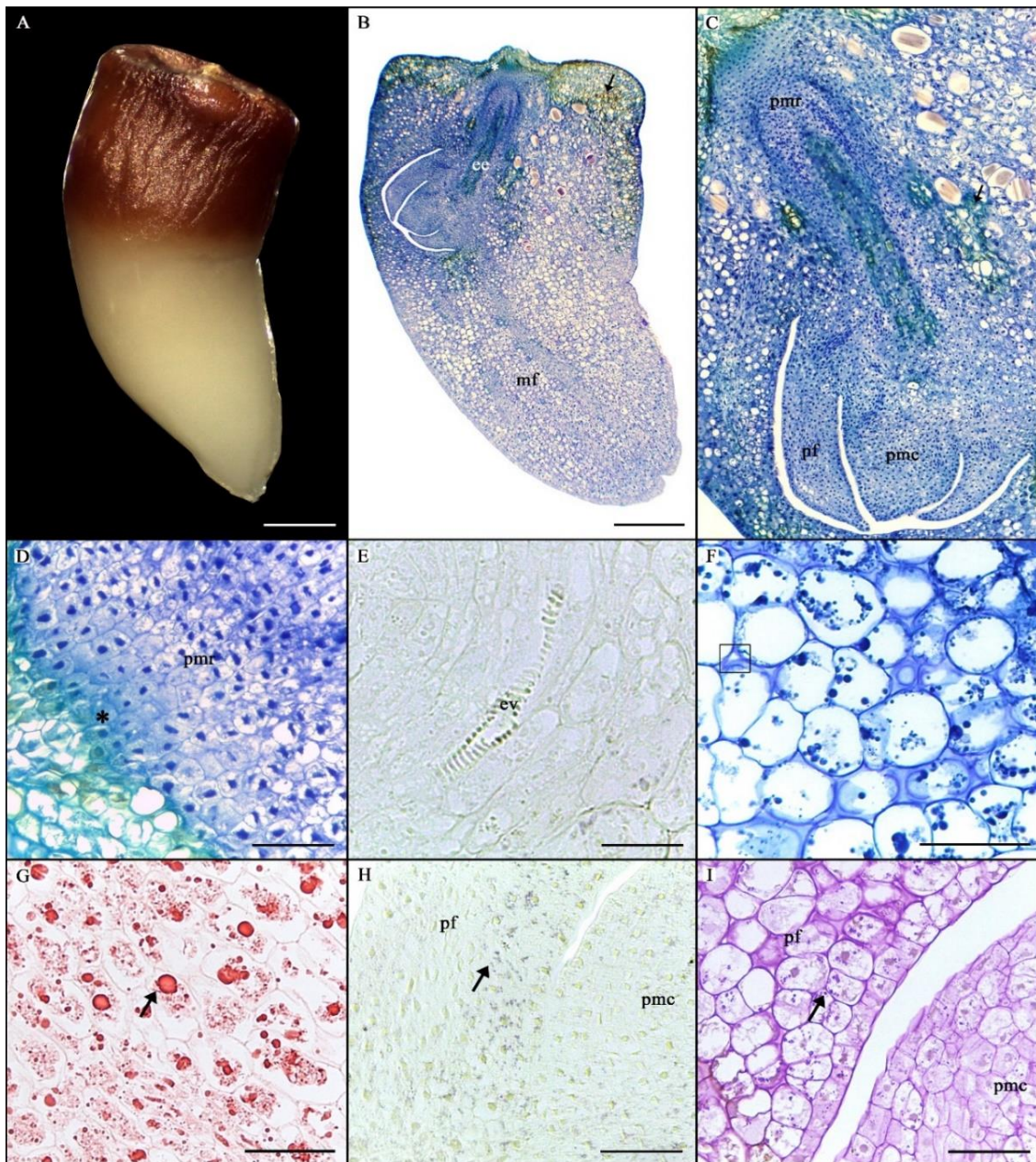
caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500  $\mu$ m, C: 200  $\mu$ m e D-J: 50  $\mu$ m.

Apesar da ausência de germinação, as análises anatômicas revelaram indícios de viabilidade para germinação. Em alguns embriões zigóticos provenientes de sementes com umidade de 12%, foi observada a diferenciação de parênquima no meristema fundamental do eixo hipocótilo-radícula (Figura 7B, C), diferenciação de elementos de vaso no procâmbio do eixo hipocótilo-radícula (Figura 7E), além de vacuolização de células parenquimáticas e formação de espaços intercelulares na região cotiledonar (Figura 7F). No entanto, o processo germinativo não foi completado, mesmo que algumas dessas características, conforme Oliveira *et al.* (2013), indicam viabilidade dos embriões.

De acordo com Umarani, Aadhavan, Faisal (2015), a perda de viabilidade de sementes recalcitrantes está associada a três categorias de danos: estruturais/mecânicos a nível de vacúolos, citoesqueleto e membranas; metabolismo desbalanceado e desnaturação macromolecular. As análises anatômicas realizadas em amostras de embriões zigóticos com 12% de umidade não revelaram danos mecânicos visíveis (Figura 7). Contudo, não se descarta a hipótese de ocorrência de danos relacionados ao desbalanceamento metabólico e/ou à desnaturação macromolecular, o que explicaria, dessa forma, a perda de viabilidade das amostras.

Salienta-se que, no contexto da desidratação e hidratação, danos estruturais sofridos por estruturas macromoleculares não devem ser confundidos com danos macromoleculares associados com a perda de metabolismo celular (desnaturação macromolecular). Os primeiros são considerados danos físicos e os últimos danos fisiológicos (UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Nessa conjuntura, análises limitadas a histologia não são suficientes para identificar danos associados à desnaturação macromolecular.

Já o metabolismo desbalanceado está associado às falhas no sistema antioxidante das células, o que conduz à descontrolada produção de radicais livres e à produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (ROACH *et al.*, 2010), que são responsáveis por danos as proteínas, DNA e membranas celulares e, portanto, associados a perda de viabilidade (HENDRY *et al.*, 1992; VARGHESE *et al.*, 2011; SAHU *et al.*, 2017; CHANDRA; KESHAVKANT, 2018). Dessa forma, estudos posteriores são necessários para a identificação ou não dessas duas categorias de danos em embriões zigóticos de *E. precatória* Mart. com umidade igual ou inferior a 12%.



**FIGURA 7.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart., proveniente de semente com 12% de teor de umidade, pós dessecação em sílica e cultivado em vermiculita para germinação. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A); observar compostos fenólicos (seta e \*). C: Eixo embrionário; notar compostos fenólicos (seta). D: Detalhes da extremidade do promeristema radicular com compostos fenólicos (\*). E: Elemento de vaso visualizado no eixo hipocótilo-radícula. F: Células do meristema fundamental da porção de transição entre a região proximal e distal com espaços intercelulares (quadrado). G: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células do meristema fundamental da região distal. H, I: Grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff*, respectivamente, em células da plúmula. Abreviações: (ee) eixo embrionário, (ev) elemento de vaso), (mf) meristema fundamental, (pf) primórdio foliar,

(pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500  $\mu$ m, C: 200  $\mu$ m, D, F, G-I: 50  $\mu$ m e E: 20  $\mu$ m.

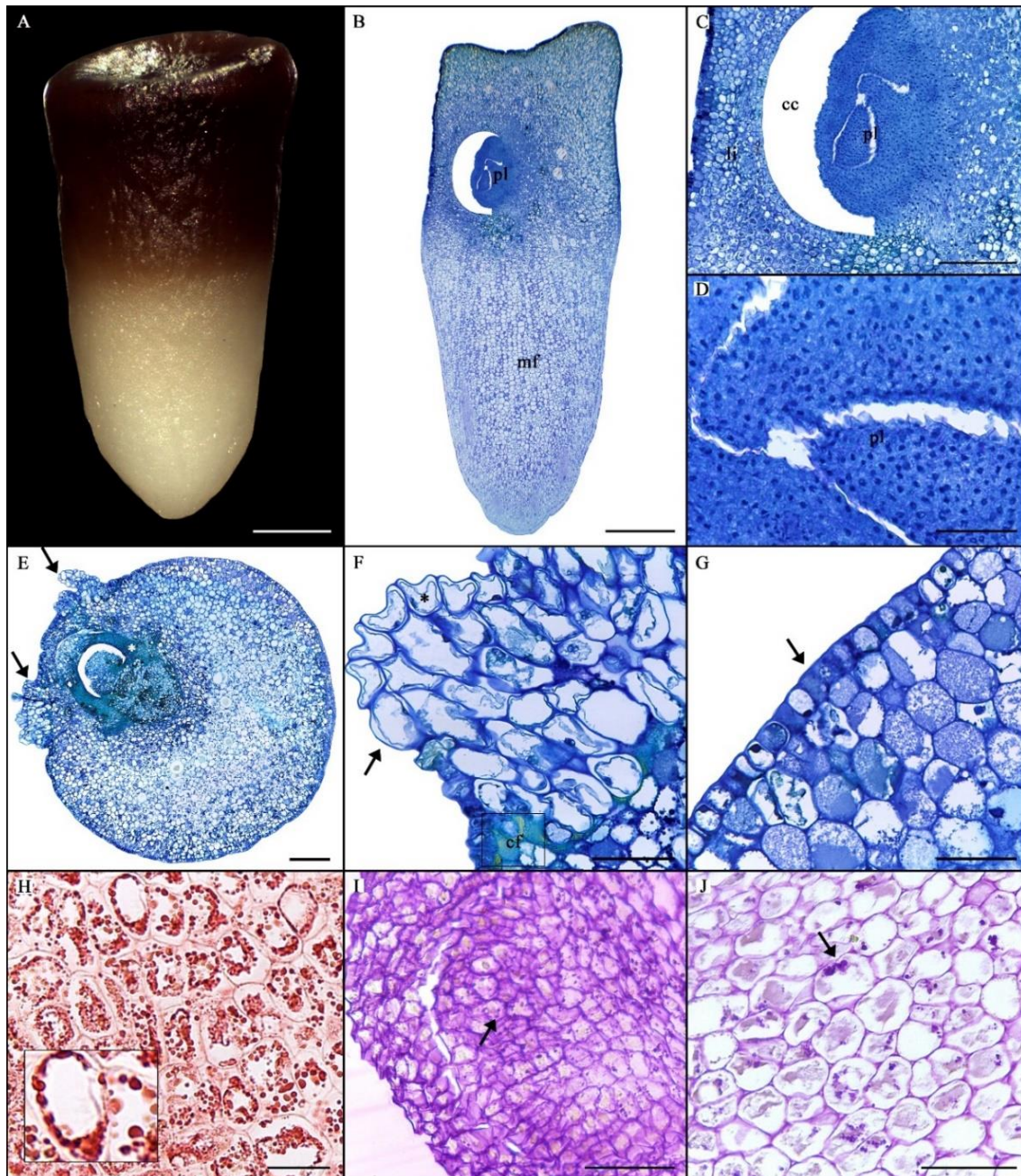
Já as análises anatômicas de embriões oriundos de sementes dessecadas até 8,97% de umidade e estabelecidos *in vitro*, revelaram a ocorrência de danos em células da plúmula (Figura 8B-D) e em células protodérmicas e subprotodérmicas (Figura 8E, F). Os danos visualizados nas células meristemáticas da plúmula (promeristema apical caulinar e dos primórdios foliares) foram caracterizados por irregularidades/deformidades nas membranas, provavelmente, por lise celular (Figura 8B-D). Além do mais, notaram-se nessas células núcleos com cromatina altamente condensada (Figura 8D), indicativo de ausência de atividade nuclear. Já com relação as células protodérmicas e subprotodérmicas, algumas exibiam paredes irregulares, nitidamente plasmolisadas, com citoplasma retraído e vacúolos aparentemente colapsados (Figura 8E, F). Danos semelhantes foram observados na plúmula de embriões com 8,97% de umidade assim como observados em alguns embriões com 8,33% de umidade submetidos à criopreservação, como visualizado na Figura 10.

Incremento da compactação da cromatina também foi observado por Panza *et al.* (2007), em células de embriões zigóticos de *E. edulis* Mart.. De acordo com esses autores, baseados em relatos de Pammenter e Berjak (1999), as sementes ortodoxas diferentemente das recalcitrantes, exibem um mecanismo reversível que provem estabilidade à cromatina, de tal modo que, são capazes de reverter a condensação da cromatina sob condições de reidratação. Ainda de acordo com Pammenter e Berjak (1999), sementes recalcitrantes apresentam durante o processo de desidratação progressiva degradação das membranas, considerada por Umarani, Aadhavan, Faisal (2015) como uma das principais causas da perda de viabilidade.

Outro dano comumente associado a baixa viabilidade de sementes recalcitrantes consiste no colapso de vacúolos (BERJAK; PAMMENTER, 2013) e, geralmente, os embriões de espécies recalcitrantes exibem muitos vacúolos (UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Nesse contexto, Farrant *et al.* (1997) levantaram a hipótese de que o incremento da sensibilidade à dessecação está relacionado a vacuolização. Embriões zigóticos de *E. precatoria* Mart. possuem vacúolos proeminentes localizados principalmente na região proximal, nas proximidades do eixo embrionário, e na região central do haustório, como observado na Figura 4. Diante do exposto, não se pode descartar a hipótese de associação entre danos a nível de vacúolos (Figura 7E, F) e perda de viabilidade em embriões de *E. precatoria* Mart. com umidades

consideravelmente baixas (inferiores a 9%). A relação do grau de vacuolização e a recalcitrância também foi previamente reportada por Panza, Láinez e Maldonado (2004) em *E. edulis* Mart. e Veloso *et al.* (2016) em *M. flexuosa* L. f.. Mais recentemente, Sershen *et al.* (2016) classificaram o grau de vacuolização celular como um biomarcador do estresse da dessecação em embriões zigóticos de espécies recalcitrantes.

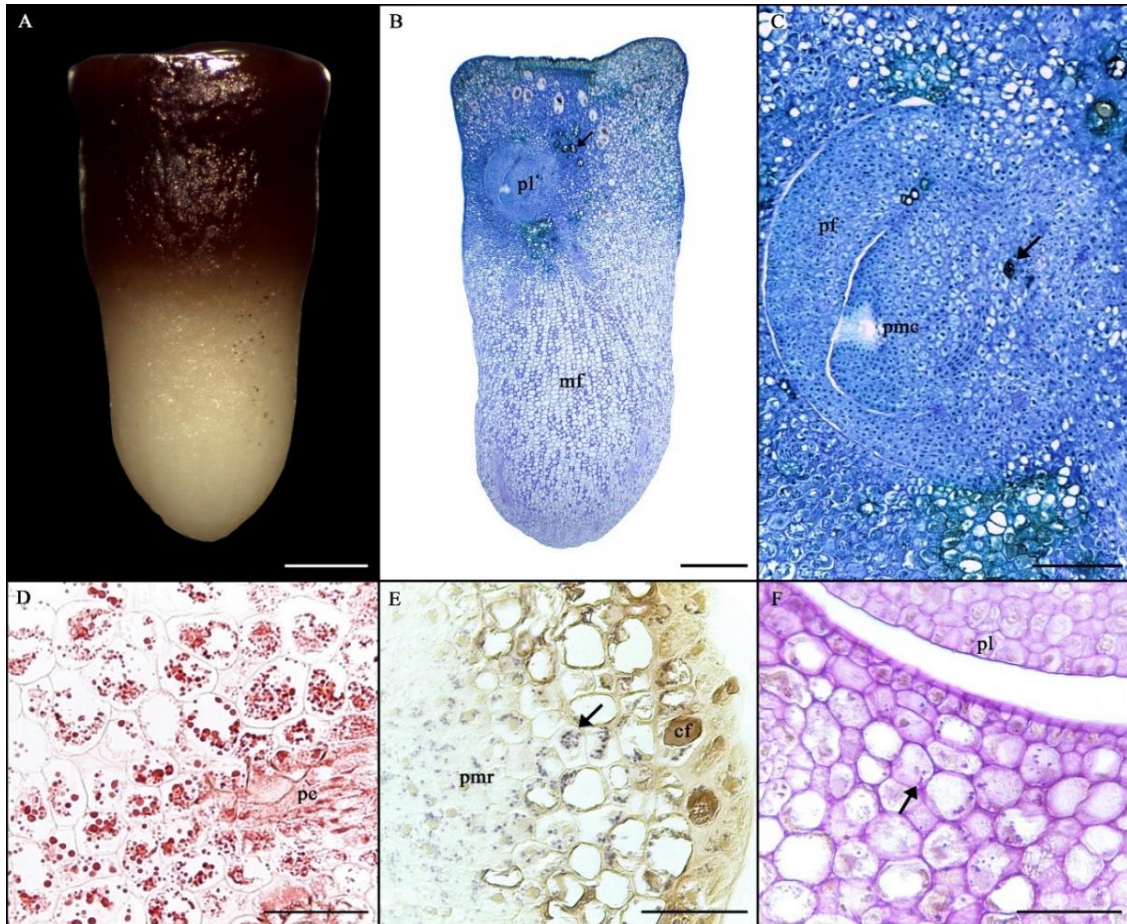
Comportamentos similares aos observados aqui foram considerados por N'Nan *et al.* (2014), em plúmulas de *C. nucifera* L. também submetidas à dessecação, como irreversíveis e associados à morte celular. Vale ressaltar que, os danos observados em plúmula de *E. precatória* Mart., certamente, estão mais relacionados ao processo de dessecação do que ao processo de congelamento, dada ocorrência do mesmo perfil de danos em amostras submetidas ou não à temperatura de -196°C (nitrogênio líquido), porém submetidas ao mesmo processo de dessecação e com teores de umidade inferiores a 9%. Relatos de danos celulares associados à dessecação também foram mencionados por Steinmacher *et al.* (2007) em *B. gasipaes* Kunth e por Panza *et al.* (2007) em *E. edulis* Mart..



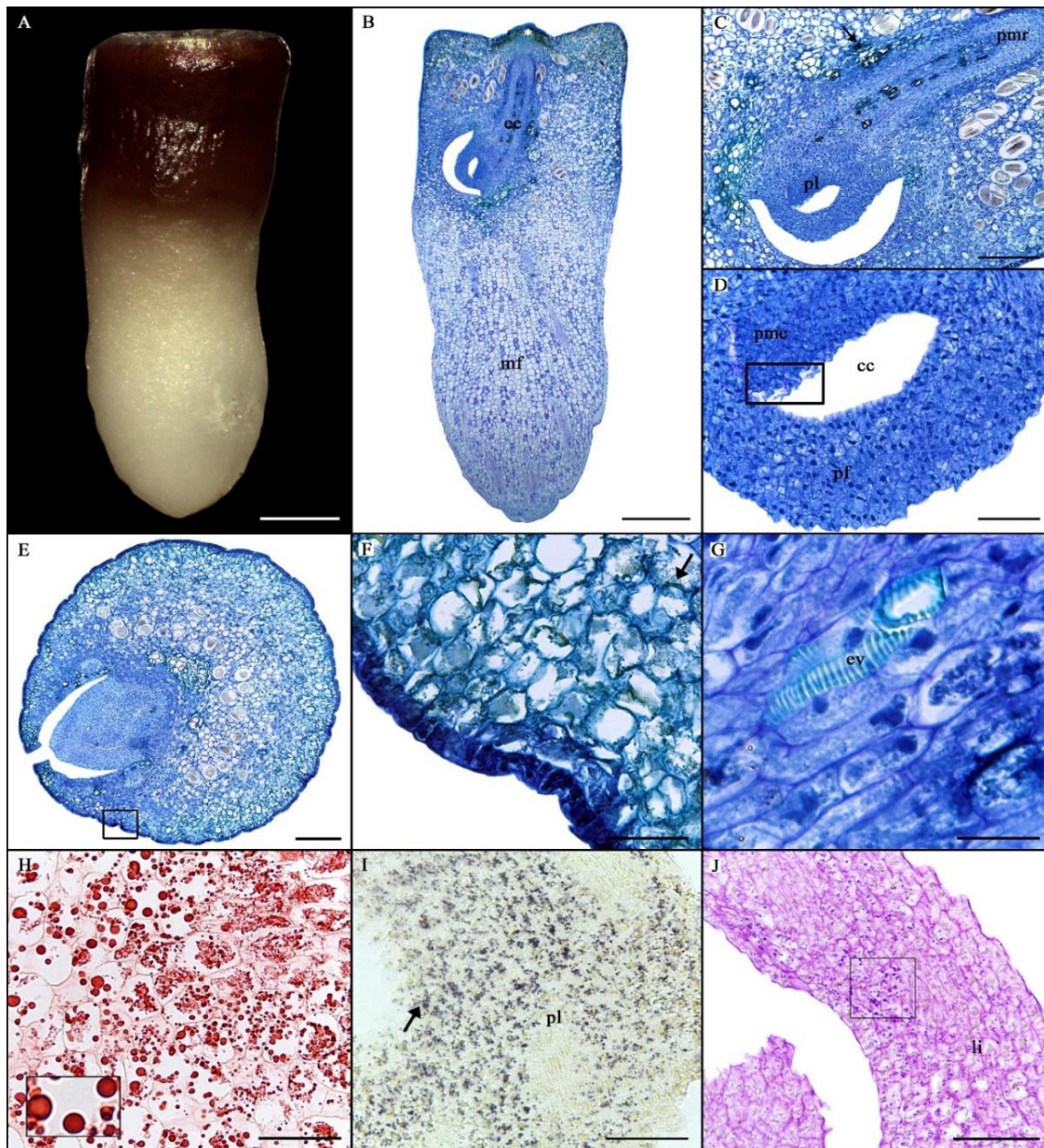
**FIGURA 8.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart., provenientes de sementes com 8,97% de umidade, pós dessecação em sílica e cultivados *in vitro* para germinação, com danos celulares. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A). C, D: Plúmula com células danificadas. E, F: Secção anatômica transversal de embrião zigótico com células danificadas (setas e \*); notar compostos fenólicos na região plumular (\*) e em células subprotodérmicas (quadrado). G: Região da secção da letra E com protoderme e subprotoderme intactas. H: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células da região distal. I: Diminutos grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) em células danificadas da plúmula. J: Grãos de amido corados com PAS em células próximas a plúmula. Abreviações: (cc) cavidade cotiledonar, (ee) eixo embrionário, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm, C, E: 200 µm e D-J: 50 µm.

Os danos constatados aqui assemelham-se também àqueles relatados por Sajini *et al.* (2011) ao testar o efeito de diferentes crioprotetores e de concentrações de sacarose durante o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de embriões zigóticos de *C. nucifera* L.. N'Nan *et al.* (2014) também identificaram, em nível ultraestrutural, danos em células da plúmula de *C. nucifera* L. submetidas ao processo de desidratação para fins de criopreservação, tais como, ruptura nuclear e/ou do citoplasma e lise de membranas celulares, alguns similares aos observados em *E. precatória* Mart. neste estudo. De acordo com N'Nan *et al.* (2014), que identificaram diferentes categorias de danos celulares relacionados à dessecação e/ou criopreservação, a dessecação se configura, na maioria dos casos, como principal responsável pelos danos celulares observados.

N'Nan *et al.* (2014) salientam a relevância da recuperação da integridade dos componentes celulares da plúmula após a desidratação, para garantir a recuperação do material. Ressalta-se, porém, que nem todo embrião proveniente de sementes com 8,97% e 8,33% de teor de umidade exibiu danos tão drásticos a nível de plúmula (Figuras 9B, C e 11B, C), o que leva a concluir que outros fatores combinados ou não aos efeitos da dessecação (desnaturação de macromoléculas e ao desbalanceamento metabólico) podem estar relacionados à perda da viabilidade nas amostras com umidade inferior a 9%. Dentre esses outros fatores citam-se aqueles relacionados às condições tipicamente estressantes do cultivo *in vitro*.

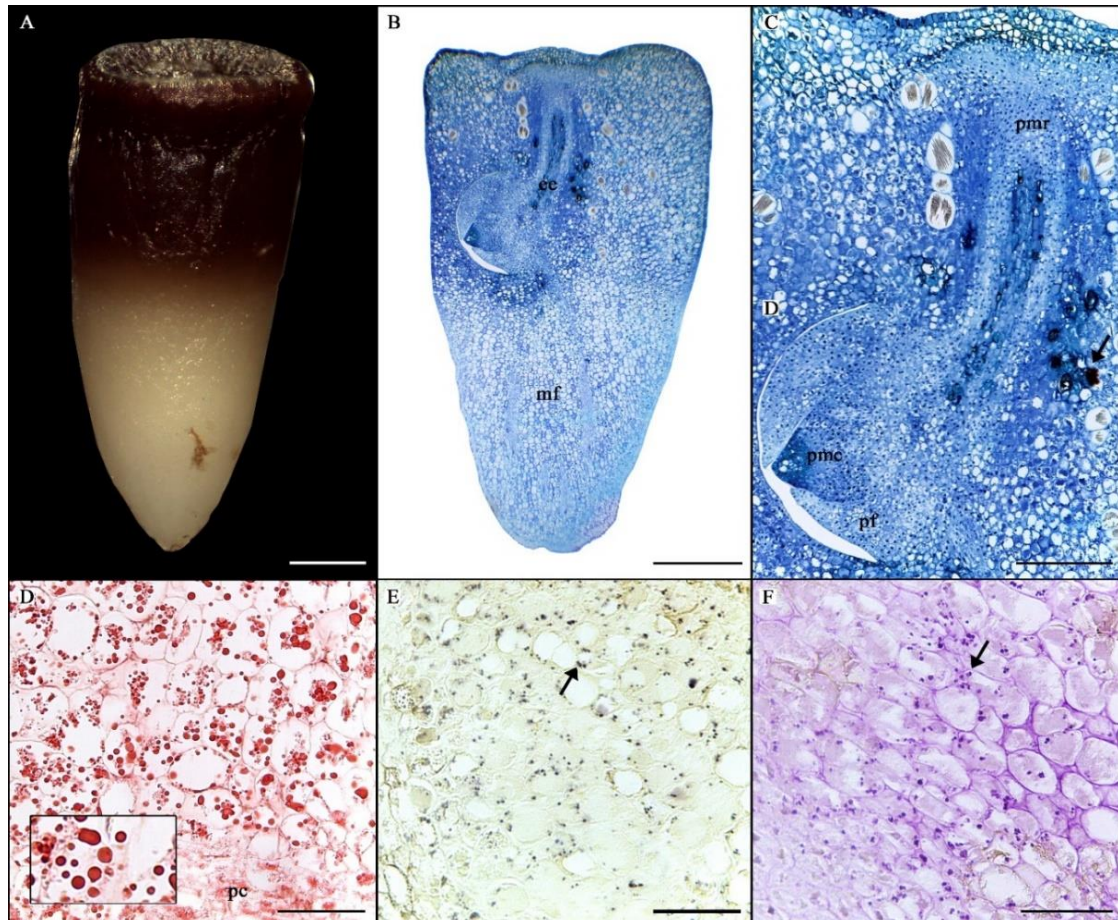


**FIGURA 9.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatória* Mart., proveniente de semente com 8,97% de teor de umidade, pós dessecação em sílica e cultivado *in vitro* para germinação. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A); observar compostos fenólicos (seta). C: Plúmula; notar compostos fenólicos (seta). D: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células próximas aos cordões procambiais saindo da plúmula. E: Grãos de amido corados com Lugol nas proximidades do promeristema radicular e em células do promeristema radicular. F: Grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* em células próximas a plúmula. Abreviações: (cf) composto fenólico, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500  $\mu$ m, C: 200  $\mu$ m e E-G: 50  $\mu$ m.



**FIGURA 10.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart., provenientes de sementes com 8,33% de teor de umidade, pós dessecação em sílica, criopreservados e cultivados *in vitro* para germinação, com danos celulares. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A). C, D: Plúmula com células danificadas. E, F: Secção anatômica transversal de embrião zigótico com células danificadas (seta); notar acúmulo de compostos fenólicos na região protodérmica. G: Elemento de vaso visualizado no eixo hipocótilo-radícula. H: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células da região distal. I: Grãos de amido corados com Lugol em células danificadas da plúmula. J: Grãos de amido corados com *Periodic Acid Schiff* (PAS) em células próximas a plúmula. Abreviações: (cc) cavidade cotiledonar, (ee) eixo embrionário, (ev) elemento de vaso, (li) lígula, (mf) meristema fundamental, (pf) primórdio foliar, (pl) plúmula, (pmc) primórdio foliar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500 µm, C, E: 200 µm, D, F, H-J: 50 µm e G: 20 µm.





**FIGURA 11.** Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos de embrião zigótico de *Euterpe precatoria* Mart., proveniente de semente com 8,33% de teor de umidade, pós dessecação em sílica, criopreservados e cultivado *in vitro* para germinação. A: Embrião zigótico com região proximal oxidada. B: Secção anatômica longitudinal de embrião zigótico (A). C: Eixo embrionário; notar compostos fenólicos (seta). D: Corpos proteicos corados com *Xylidine Ponceau* em células da região distal. E, F: Grãos de amido corados com Lugol e *Periodic Acid Schiff*, respectivamente, nas proximidades da plúmula. Abreviações: (ee) eixo embrionário, (mf) meristema fundamental, (pc) procâmbio, (pf) primórdio foliar, (pmc) promeristema caulinar e (pmr) promeristema radicular. Barras = A: 0,5 mm, B: 500  $\mu$ m, C: 200  $\mu$ m e D-F: 50  $\mu$ m.

De modo geral, independentemente do conteúdo de água nos embriões zigóticos pós dessecação e das condições de cultivo, verificaram-se alto conteúdo de compostos fenólicos (coloração esverdeada ou escura em Azul de Toluidina e dourada em Lugol), principalmente, nas adjacências do eixo embrionário (Figuras 5B, D, 6B, C, D, H, 7B, C, 8E e 9B, C, E). A oxidação do conteúdo fenólico abundante na região proximal é a responsável pela coloração escura observada na totalidade dos embriões manipulados (Figuras 6A-9A), exceto naqueles não submetidos à dessecação (33%). Nesse contexto, não se pode descartar a possibilidade da ocorrência de estresse oxidativo associado à perda de viabilidade daqueles embriões com umidades inferiores à 12%, como

previamente relatado em espécies com comportamento recalcitrante (ROACH *et al.*, 2010; CHANDRA; KESHAVKANT, 2018), o que exige investigações futuras, como já mencionado.

Observou-se também consumo de reservas proteicas, reduzidas a gotículas diminutas no interior de vacúolos e restritas às proximidades do eixo embrionário e dos cordões procambiais saindo da plúmula (Figuras 6G e 9D) e em algumas células do meristema fundamental da região distal (Figuras 7G e 8H). O consumo de reservas proteicas, especificamente daqueles embriões que não germinaram (12%, 8,97% e 8,33%), pode ser um indicativo da intensa atividade metabólica típica de sementes recalcitrantes e que está associada à vacuolização e, conseqüentemente, ao aumento da vulnerabilidade aos efeitos da dessecação (UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Veloso *et al.* (2016) também identificaram vacúolos com reservas proteicas em células de embriões de *M. flexuosa* L., considerada recalcitrante, que segundo os autores, são provavelmente consumidas durante os processos de desidratação e armazenamento. Esses autores chamam atenção, no contexto da modulação da recalcitrância, para a possibilidade de presença de proteínas LEA relacionadas à preservação de membranas celulares mediante proteção contra estresse oxidativo (SHARMA *et al.*, 2016). Poucos grãos de amido também foram observados na maioria das amostras nas proximidades dos meristemas apicais e/ou neles, sobretudo, na plúmula (Figuras 4G, 6H, I, 7H, I, 8I, J e 9F).

#### 4. CONCLUSÕES

- Sementes e embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* Mart. mostram-se sensíveis à dessecação, com diminuição progressiva da germinação e vigor à medida que são reduzidos os teores de umidade;
- Com os teores de umidades das sementes testados, neste trabalho nenhuma das temperaturas de conservação é eficiente na manutenção da qualidade fisiológicas das sementes de *Euterpe precatoria* Mart.;
- Nas condições do experimento, a germinação convencional é mais eficiente que a germinação *in vitro*, quando considerado o percentual de plântulas normais;
- A dessecação de sementes a teores de umidades inferiores a 9% provocam, conforme análises anatômicas, danos mecânicos na região da plúmula de alguns embriões zigóticos;
- Histoquímicamente, verifica-se consumo de proteínas e, conseqüentemente, aumento no número de vacúolos, mas não foram encontradas associações com teores de umidades específicos;
- Considerando a sensibilidade à dessecação e a não tolerância à conservação a baixas temperaturas observado neste estudo, confirma-se o comportamento recalcitrante das sementes de *E. precatoria* Mart..

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. O.; MENDONÇA, M. S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* Mart. (Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 1, p. 37 - 42, 2003.

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

ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v32, n.10, p937-991, 1997.

ANDRÉO, Y.; NAKAGAWA, J.; BARBEDO, C. J. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Pennington). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 2, p. 309 - 318, 2006.

ALMEIDA, L. C. P.; PIVETTA, K. F. L.; GIMENES, R.; ROMANI, G. N.; FERRAZ, M. V.; MAZZINI-GUEDES, R. B. Temperature, light, and desiccation tolerance in seed germination of *Mauritia flexuosa* L.F. **Revista Árvore**, v. 42, n. 3, 2018.

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; LANI, E. R. G.; OTONI, W. C. Germinação in vitro de embriões zigóticos maduros de macaúba influenciada por temperaturas de armazenamento dos frutos e concentrações de sacarose. **Revista Árvore**, v. 37, n. 4, p. 691 - 700, 2013.

BASKIN, M. B.; BASKIN, C.C. What Kind of Seed Dormancy Might Palms Have? **Seed Science Research**, v. 24, n. 1, p. 17-22, 2014.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. M. Implication of lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-9, 2013.

BENTES-GAMA, M. M.; RIBEIRO, G. D.; FERNANDES, C. F.; MEDEIROS, I. M. **Açaí (*Euterpe spp.*): características, formação de mudas e plantio para a produção de frutos**. Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, 2005. 06 p. Circular Técnica, 80.

BERNARDES, R. S. A. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe precatoria* Mart.) submetidas ao aumento da temperatura**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado Ciências Biológicas). INPA, Manaus, Brasil.

BONNER, F. T. Storage of seeds: Potential and limitations for germplasm conservation. **Forest Ecology and Management**, v. 35, p. 35 - 43, 1990.

BONNER, F.T. Storage of seeds. In: BONNER, F. T, KARRFALT, R. P. (ed). **Woody Plant Seed Manual**. (US Department of Agriculture Forest Service, Washington, DC), Agriculture Handbook, 2008, Chapter 4, p. 85 - 96.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA - ACS, 2009. 395 p.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. Technological innovations in the propagation of açai palm and Bacuri. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 1, p. e- 679, 2018.

COSTA, C. R. X.; PIVETTA, K. F. L.; SOUZA, G. R. B.; MAZZINI-GUEDES, R. B.; PEREIRA, S. T. S.; NOGUEIRA, M. R. Effects of temperature, light and seed moisture content on germination of *Euterpe precatoria* Palm. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 1, p. 98 – 106, 2018.

CHANDRA, C.; KESHAVKANT, S. Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant *Madhuca latifolia* seeds. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 1, p. 75-87, 2017.

CHIDURUPPA, M.; AHMAD, F.; PANDIAN, P. A detailed review on *Dypsis lutescens* (Arecaceae). **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 10, p. 1644 - 1650, 2018.

DIAS, D. S.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, L. A. A.; MENDES, E. V.; CARVALHO, V. S. Tolerance of desiccation and cryopreservation of *Butia capitata* palm seeds. **Seed Science & Technology**, v. 43, p. 90 - 100, 2015.

EBERT, A.; CONTINI, A. Z.; BRONDANI, G. E.; COSTA, R. B. Germinação in vitro de embriões zigóticos de *Mauritia flexuosa* sob diferentes temperaturas. **Advances in Forestry Science**, v.1, n.1, p.39 - 43, 2014.

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

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; WALTERS, C. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, v. 7, p. 135–144, 1997.

FÉLIX, F. C.; ARAÚJO, F. S.; FERRARI, C. S.; PACHECO, M. V. Dessecação e armazenamento de sementes de *Adonidia merrillii* (Becc.) Becc. **Agrária**, v.12, n.1, p.86 - 91, 2017.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 297 - 303, 2003.

FERMINO JUNIOR; P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação in vitro de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

FREITAS, E. O.; SILVA-CARDOSO, I. M. A.; FERREIRA, J. C. B.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis in açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K. (Eds.). **Step Wise Protocols for Somatic**

**Embryogenesis of Important Woody Plants, Forestry Sciences.** Switzerland: Springer International Publishing, 2018. p. 267-290.

GALOTTA, A. L. Q. DE A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart., Arecaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 610–613, 2005.

GENTIL, D.F.O.; FERREIRA, S.A.N. Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 337-342, 2005.

HENDRY, G.A.F.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.M.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, v.122, 273–279, 1992.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPq, 1998. v.1. p.371-393.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 55p. (Technical Bulletin, 1).

JESUS, A. M. S.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Cultivo in vitro de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, v. 50, n. 288, p. 183 – 189, 2003.

JOSÉ, A. C.; ERASMO, E. A. L.; COUTINHO, A. B. Germinação e tolerância à dessecação de sementes de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4 p. 651 - 657, 2012.

JOHANSEN, D. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.

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

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, M. JR.; HONG, T. D.; ARRUDA, Y. M. B. C.; MENDES, A. M. S.; ELLIS, R. H. Classification of seed storage behaviour of 67 Amazonian tree species. **Seed Science & Technology**, v. 42, p. 363 - 392, 2014.

LIMA, L. M. E.; OLIVEIRA, J. A. O.; SMIDERLE, O. J.; LOUSADO, A. V. C.; MARIA CARVALHO, L. M. Physiological performance of açaí seeds (*Euterpe oleracea* Mart.) stored with different moisture contents and treated with fungicide. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 2, p.144 - 154, 2018.

LUIZ, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A simple and efficient protocol for the cryopreservation of zygotic embryos of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.], a tropical species with a capacity for biofuel production. **Cryo Letters**, v. 38, n. 1, p. 7-16, 2017.

LUIZ, Z. G. **Estratégias para a embriogênese somática e conservação *ex situ* de germoplasma de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.)**. 2013. 136 f. Tese (doutorado) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Brasília-DF.

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**, v. 27, p. 273-283, 2013.

MARTINS, R. C.; FILGUEIRAS, T. S.; ALBUQUERQUE, A. P. Use and Diversity of Palm (Arecaceae) Resources in Central Western Brazil. **The Scientific World Journal**, v. 1, n. 1, p.1 - 14, 2014.

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

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Tolerância à dessecação de sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 3, p. 391 - 396, 1999.

MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; NAKAGAWA, J. Qualidade fisiológica de sementes de palmito-vermelho em função da desidratação e do armazenamento. **Horticultura Brasileira**, n. 25, v.2, p. 188 - 192, 2007.

MARTINOT, J. F.; PEREIRA, H. S.; SILVA, S. C. P. Coletar ou Cultivar: as escolhas dos produtores de açaí-da-mata (*Euterpe precatoria*) do Amazonas. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 55, n. 04, p. 751-766, 2017.

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

MENDES, P. S.; ARAÚJO, W. F.; ANTUNES, F.; CHAGAS, E. A.; COUCEIRO, M. A. Cultivo in vitro de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. **Revista Agro@ambiente**, v. 9, n. 2, p. 202 - 207, 2015.

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

NASCIMENTO, W. M. O.; NOVEMBRE, A. D. L. C.; CICERO, S. M. Consequências fisiológicas da dessecação em sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 38 - 43, 2007.

NASCIMENTO, W. M. O.; SILVA, W. S. Comportamento fisiológico de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) submetidas à desidratação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 349 - 351, 2005.

NASCIMENTO, W. M. O.; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D. L. C. CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1 p.024 - 033, 2010.

NORZIHA, A; MARHALIL, M; FADILA, A M; ZULKIFLI, Y; MAIZURA, I; MOHD DIN, A; RAJANAIDU, N.; KUSHAIRI, A. Long-term storage of oil palm germplasm zygotic embryo using cryopreservation. **Journal of Oil Palm Research**, v. 29, n. 4, p. 541 – 547, 2017.

N'NAN, O. A.; TIÉCOURA, K.; BI, S. G.; VERDEIL, J.; MALAURIE, B. Ultrastructural changes during cryopreservation of plumules and embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). **International Journal of Agronomy and Agricultural Research**, v. 5, n. 6, p. 103-115, 2014.

O'BRIEN T.P.; MCCYLLY, M.E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD, 1981.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCYLLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, N. C. C.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; MERCANDANTE-SIMÕES, M. O.; OLIVEIRA, L. A. A.; SILVÉRIO, F. O. Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, v. 27, p. 1633-1645, 2013.

OLIVEIRA, M. S. P.; FARIAS NETO, J. T.; MOCHIUTTI, S.; NASCIMENTO, W. M. O.; MATTIETTO, R. A.; SCHERWINSKI-PERREIRA, J. E. Açaí-do-pará. In: LOPES, R.; OLIVEIRA, M. S. P.; CAVALLARI, M. M.; BARBIERI, R. L.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. (editores técnicos). **Palmeiras nativas do Brasil**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. cap. 2, p. 37 -81.

OROZCO-SEGOVIA, A.; BATIS, A.I.; ROJAS-ARECHIGA, M.; MENDOZA, A. Seed biology of palms. **Palms**, v. 47, n. 2, p. 79 – 94, 2003.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, v. 9, p. 13 - 37, 1999.

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

PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MALDONADO, S.; MARODE, H. L. Effects of desiccation on *Euterpe edulis* Martius seeds. **BIOCELL**, v. 31, n. 3, p. 383 - 390, 2007.

PINTO, F. R. **Análise produtiva de sistemas agroextrativistas de açaí –da– mata (*Euterpe precatoria* Mart.) na amazônia central**. 2018.152 f. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill, 1972.



QUIROGA, Y. M. C.; GÓMEZ, M. S. H.; MARY, L. Componentes Bioactivos del Asai (*Euterpe oleracea* Mart. y *Euterpe precatoria* Mart.) y su efecto sobre la salud. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v. 36, n. 3, p. 58 - 66, 2017.

R CORE TEAM (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

ROACH, T.; BECKETT, R.P.; MINIBAYEVA, F.V.; COLVILLE, L.; WHITAKER, C.; CHEN, H.; BAILLY, C.; KRANNER, I. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrante *Castanea sativa* seeds. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 59–75, 2010.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, p. 499 - 514, 1973.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on in vitro propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 48, p. 67–72, 2012.

RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. C.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento in vitro de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, v. 58, n.2, p. 133-139, 2011.

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**, v. 26, p. 851-863, 2012.

REIS, A.; PAULILO, M. T. S.; NAKAZONO, E. M.; VENTURI, S. Efeito de diferentes níveis de dessecação na germinação de sementes de *Euterpe edulis* Martius Arecaceae. **Insula**, v.1, n. 28, p. 31 - 42, 1999.

SAJINI, K.K.; KARUN, A.; AMARNATH, C.H.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. **Cryo Letters**, v. 32, n. 4, p. 317-328, 2011.

SAHU, B.; SAHU, A.K.; THOMAS, V.; NAITHANI, S. C. Reactive oxygen species, lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidative enzymes in dehydrating Karanj (*Pongamia pinnata*) seeds during storage. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 383-390, 2017.

SALEH, E. O. L.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Determination of physiological and environmental conditions for the storage of babassu palm seeds (*Attalea speciosa*). **Seed Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 139 – 150, 2017.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação um enfoque estatístico**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2004. 248 p.

SERSHEN; VARGHESE, B.; NAIDOO, C.; PAMMENTER, N. W. The use of plant stress biomarkers in assessing the effects of desiccation in zygotic embryos from

recalcitrant seeds: challenges and considerations. **Plant Biology**, v. 18, p. 433-444, 2016.

SOUZA, R. A. V.; BRAGA, F. T.; AZEVEDO, P. H.; FERREIRA, J. L.; GERALDO CANÇADO, M. A. Efeito da luz na germinação in vitro de embriões zigóticos de genótipos de oliveira. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 299 - 304, 2012.

SILVA, R.S.; RIBEIRO, L.M.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O.; NUNES, Y.R.F.; LOPES, P.S.N. Seed structure and germination in buriti (*Mauritia flexuosa*) - the swamp palm. **Flora**, v. 209, n. 11, p. 674-685, 2014.

STEINMACHER, D.A; SALDANHA, C.W.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M.P. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. **Cryo Letters**, v. 28, n. 1, p. 13-22, 2007.

VARGHESE, B.; SERSHEN; BERJAK, P.; VARGHESE, D.; PAMMENTER, N.W. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 326–338. 2011.

VELOSO, V.H.S.; RIBEIRO, L.M.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; NUNES, Y.R.F. Cytological aspects of recalcitrance in dormant seeds of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 171, p. 1-12.

WALTERS, C.; WESLEY-SMITH, J.; CRANE, J.; HILL, L. M.; CHMIELARZ, P.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive seeds). In: REED, B. M. (ed). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer, New York, USA. 2008. Chapt. 18. p. 465 – 484.

WALTERS, C.; BERJAK, P.; PAMMENTER, N.; KENNEDY, K.; RAVEN, P. Preservation of recalcitrant seeds. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 915 - 916, 2013.

VIDAL, B.C. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine-Ponceau 2R. **Annales d'Histochimie**, v. 15, p. 289-296, 1970.

UMARANI, R; AADHAVAN, E. K.; FAISAL, M. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. **Current science**, v. 108, n. 11, p. 2023-2034, 2015.

YAMAGUCHI, K.K.L.; PEREIRA, L.F.R.; LAMARÃO, C.V.; LIMA, E.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Review Amazon acai: chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, n. 1 p. 137 - 151, 2015.

YUYAMA, K.; MENDES, N. B.; VALENTE, J. P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 601 - 607, 2011.