



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA
– CITA

**ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DO FRUTO E COMPOSIÇÃO
DO MEIO DE CULTURA NO DESENVOLVIMENTO DE
EMBRIÕES ZIGÓTICOS E ESTABELECIMENTO *IN*
VITRO DE *Euterpe precatoria* Mart. e *E. oleracea* Mart.**

JEYSON GARY MIRANDA MENDOZA

RIO BRANCO, AC
Abril / 2018

JEYSON GARY MIRANDA MENDOZA

**ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DO FRUTO E COMPOSIÇÃO
DO MEIO DE CULTURA NO DESENVOLVIMENTO DE
EMBRIÕES ZIGÓTICOS E ESTABELECIMENTO *IN*
VITRO DE *Euterpe precatoria* Mart. e *E. oleracea* Mart.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA (UFAC)

Co-orientador: JONNY EVERSON SCHERWINSKI-PEREIRA (EMBRAPA)

RIO BRANCO, AC
Abril / 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DO FRUTO E COMPOSIÇÃO
DO MEIO DE CULTURA NO DESENVOLVIMENTO DE
EMBRIÕES ZIGÓTICOS E ESTABELECIMENTO *IN*
***VITRO* DE *Euterpe precatoria* Mart. e *E. oleracea* Mart.**

JEYSON GARY MIRANDA MENDOZA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 23 de abril de 2018.

Dr. FREDERICO HENRIQUE DA SILVA COSTA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE - UFAC
ORIENTADOR

Dra. JANIFFE PERES DE OLIVEIRA
INSTITUTO FEDERAL DO ACRE - IFAC
MEMBRO

Dr. MARCIO DE OLIVEIRA MARTINS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE - UFAC
MEMBRO

(Dedicatória)

*A minha esposa Cecilia, minha grande
fortaleza, a meus filhos, Valentina e
Emiliano pelo amor incondicional, a meus
pais Justo, Martha, e meus irmãos que
acreditaram em mim. Para todos eles que
me deram sempre apoio emocional e
econômico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por aqueles momentos fracos que passei e foi a fé que me ajudou continuar...

A minha esposa Maria Cecilia que além de sempre brindar-me seu apoio, teve que responsabilizar das contas da casa e dos cuidados de meus filhos.

A meus filhos, Valentina e Emiliano por seu carinho e amor incondicional, carregando-me de boas energias para continuar.

A meus pais Justo, Martha por brindar-me seu apoio, colaborando-me economicamente e do cuidado de meus filhos.

Aos irmãos Darwin e Brandon que sempre estiveram presentes e cuidarem de meus filhos.

Ao meu orientador Professor Dr. Frederico Henrique Silva da Costa, por dedicar tempo e compartilhar conhecimentos de cultura de tecidos vegetais. Por orientar-me na pesquisa, desde o planejamento experimental, coleta de material vegetal em florestas, capacitação laboratorial e redação científica.

Ao Professor Dr. Altemir da Silva Braga do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET) da Universidade Federal do Acre, por dedicar tempo e compartilhar conhecimentos para realização das análises estatísticas, elaboração de tabelas, interpretação dos resultados e produção textual.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro PGPSE (Processo Nº 0353/201688887.115978/2016-01) e concessão de bolsa de Mestrado mediante a parceria entre a UFAC e o Grupo Coimbra Brasil Organización de los Estados Americanos PAEC-OEA/GCUB.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo apoio financeiro ao subprojeto (02.16.04.012.00.04) intitulado “Biologia do desenvolvimento e reprodução vegetal em *Euterpe* spp”, coordenado pelo pesquisador Jonny Everson Scherwinski-Pereira da unidade de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Ao pesquisador da Embrapa Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira pela co-orientação no planejamento experimental e demais etapas da pesquisa.

Ao Engenheiro Florestal João Bosco de Oliveira Júnior por dispor tempo e conhecimentos na capacitação quando aos procedimentos para obtenção do embrião zigótico de *Euterpe precatoria*.

Aos colegas Camilla, Janaína, Márcio Chaves, Bruna Aritana, Roger, Nadja, Clarice Sales, Janai, Matheus e Laryssa, do Laboratório de Biotecnologia e Anatomia Vegetal da UFAC.

Aos membros da banca examinadora pelas considerações e sugestões para a melhoria da qualidade do texto e discussão dos resultados do presente estudo.

A coordenadora do Curso de Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para Amazônia, Professora Dra. Clarice Maia Carvalho.

Aos amigos da minha turma do CITA: Luan, Efraím, Clemeson, Auryane, Natacha, Ana, André, Ângelo, Pedro ...

Aos amigos Yonier (Colômbia), Ricardo e Jesús (Peru) por compartilharem amizade durante o curso de Mestrado.

Aos amigos Natiely, Gabriel, Marcelo e Teresa (Italianos), Wilson (Radamés), Giordano, Bruno, Rosiney, Mailson, Rogger, entre muitos mais.

O gênio se faz com 1% de talento, e 99% de trabalho.

(Thomas Edison)

RESUMO

ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DO FRUTO E COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Euterpe precatoria* Mart. e *E. oleracea* Mart.

O cultivo de embriões zigóticos *in vitro* é uma técnica importante para a compreensão da fisiologia do desenvolvimento embrionário, reprodução assexual, intercâmbio e preservação *ex situ* de germoplasma. O presente estudo objetivou estabelecer um protocolo para o desenvolvimento de embriões zigóticos e formação de plantas *in vitro* de *Euterpe precatoria* e *E. oleracea*. Os tratamentos, dispostos em delineamento inteiramente casualizado, arranjo fatorial 2 x 12, foram representados por dois estádios de maturação do fruto (maduro e imaturo) e doze composições de meio de cultura (combinação das formulações de MS e Y3, tipos de fontes e concentrações de carboidratos). Foram avaliadas a porcentagem de embriões desenvolvidos e as características de crescimento das plantas formadas. Foi observado efeito significativo do estágio de maturação do fruto no desenvolvimento do embrião zigótico. Em ambas as espécies, maior porcentagem de embriões desenvolvidos e formação de plantas *in vitro* são obtidos de frutos imaturos. Quanto à composição do meio de cultura, a espécie *Euterpe precatoria* teve maior desenvolvimento de embriões na formulação Y3 acrescida com 87,64 mM de sacarose, enquanto maior altura e número de raízes das plantas foram obtidos com meio Y3 ou MS, adicionados de 87,64 mM ou 131,46 mM de sacarose ou glicose. Para *E. oleracea*, não houve influência significativa dos meios avaliados. O protocolo estabelecido no presente estudo é indicado para produção de plantas a partir de embriões zigóticos imaturos e como estratégia visando à preservação de recursos genéticos de *Euterpe precatoria* e *E. oleracea*.

Palavras-chave: Arecaceae. *Euterpe*. Cultura de embrião. Carboidrato. Meio de cultura.

ABSTRACT

FRUIT MATURATION AND MEDIUM COMPOSITION ON ZYGOTIC EMBRYOS DEVELOPMENT AND *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF *Euterpe precatoria* Mart. AND *E. oleracea* Mart.

In vitro culture of zygotic embryos is an important technique for understanding of physiology of embryonic development, asexual reproduction, *ex situ* interchange and preservation of germplasm. Thus, current study objectived to establish a protocol for development of zygotic embryos and *in vitro* plant formation of *Euterpe precatoria* and *E. oleracea*. Treatments, totally randomized, in 2 x 12 factorial design, were represented by two stages of fruit maturation (mature and immature) and twelve medium compositions (formulations MS and Y3, types and concentrations of carbohydrates). Were evaluated the percentage de developed embryos and growth variables in plantlets. Was observed significant effect of stage of maturity of fruit on development of zygotic embryo. In both species, highest percentage of developed embryos and better formation *in vitro* plantlets are obtained from immature fruits. Among medium used, *Euterpe precatoria* had greater embryo development in Y3 formulation supplemented with 87.64 mM sucrose, while highest plant height and number of roots were obtained with Y3 or MS medium, added with 87, 64 mM or 131.46 mM sucrose or glucose. The percentage of embryos developed for *E. oleracea* is not influenced by medium compositions evaluated. The developed protocol in this study is indicated for plantlets production from immature zygotic embryos and as strategy aiming at preservation genetic resources of *Euterpe precatoria* and *E. oleracea*.

Keywords: Arecaceae. *Euterpe*. Embryo culture. Carbon sources. Culture medium.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribuição geográfica das espécies <i>Euterpe precatoria</i> e <i>Euterpe oleracea</i> .	17
Figura 2. Planta matriz de <i>E. precatoria</i> com frutos maduros (A). Planta de <i>E. oleraceae</i> evidenciando frutos verdes e maduros (B). Aspecto dos frutos maduros (C) e imaturos (verdes) (D).	25
Figura 3. Mapa de localização das plantas matrizes. (A) <i>E. precatoria</i> Mart. e (B) <i>E. oleracea</i> Mart.	26
Figura 4. Aspecto geral dos frutos imaturos e maduros (inteiros e em secção longitudinal) e do embrião zigótico isolado. <i>E. precatoria</i> Mart (A - F) e <i>E. oleracea</i> Mart. (G - L).	28
Figura 5. Procedimentos utilizados para desinfestação das amêndoas. (A): Utensílios e materiais utilizados para extração do embrião zigótico. (B): Etapa do processo de desinfecção das amêndoas.	28
Figura 6. Critério considerado para caracterizar o desenvolvimento embrionário de (A) <i>Euterpe precatoria</i> e (B) <i>E. oleracea in vitro</i> . Barras: 10 mm.	31
Figura 7. Aspectos do desenvolvimento do embrião zigótico e plantas de <i>Euterpe precatoria</i> Mart. <i>in vitro</i> . (A) Embrião com 10 dias em meio M7 (Y3 + sacarose 87,64 mM). (B) Desenvolvimento aos 30 dias em M7. (C) Desenvolvimento aos 60 dias em meio M7 (Y3 + sacarose 87,64 mM) (D) Plantas jovens aos 60 dias em meio M10 (Y3 + glicose 87,64 mM). Barras: 10 mm.	34
Figura 8. Aspectos do desenvolvimento do embrião zigótico e plantas de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (A) Embrião com formação da plúmula aos 10 dias em meio M6 (MS + Glicose 175,28 mM); (B) Desenvolvimento aos 30 dias em meio M6 (MS + Glicose 175,28 mM) mostrando emissão das raízes, desenvolvimento do haustório, ruptura da plúmula e formação da primeira bainha foliar. (C) Plantas jovens com 60 dias em meio M10 (Y3 + Glicose 87,64 mM), com haustórios bem desenvolvidos e presença de eófilos. (D) Plantas jovens com raízes, haustório desenvolvido e eófilos em meio M7 (Y3 + Sacarose 87,64 mM). Barras: 10 mm.	36
Figura 9. Porcentagem de embriões de <i>Euterpe precatoria</i> Mart. desenvolvidos <i>in vitro</i> sob efeito do estágio de maturação do fruto, em diferentes períodos de avaliação.	37

- Figura 10. Porcentagem de embriões de *Euterpe oleracea* Mart. desenvolvidos *in vitro* sob efeito do estágio de maturação do fruto, em diferentes períodos de avaliação. 38
- Figura 11. Porcentagem de embriões de *Euterpe precatória* Mart. desenvolvidos *in vitro* sob efeito da composição do meio de cultura, em diferentes períodos de avaliação. 40
- Figura 12. Porcentagem de embriões de *Euterpe oleracea* Mart. desenvolvidos *in vitro* em função da composição do meio de cultura, em diferentes períodos de avaliação. 42

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Caracterização dos tratamentos, definidos a partir do estágio de maturação dos frutos e da composição do meio de cultura, e avaliados sobre o desenvolvimento de embriões zigóticos de <i>Euterpe precatoria</i> e <i>E. oleracea in vitro</i> .	30
Tabela 2. Estimativas das diferenças de contrastes de médias (frutos maduros Vs. frutos imaturos) da porcentagem de embriões desenvolvidos <i>in vitro</i> de <i>E. precatoria</i> , dentro de cada período de avaliação.	38
Tabela 3. Estimativas das diferenças de contrastes de médias (frutos maduros Vs. frutos imaturos) da porcentagem de embriões desenvolvidos <i>in vitro</i> de <i>E. oleracea</i> , dentro de cada período de avaliação.	39
Tabela 4. Estimativas das diferenças de contrastes de médias (composição do meio de cultura Vs. o meio M7) do desenvolvimento de embriões de <i>E. precatoria in vitro</i> , dentro de cada período de avaliação (20, 30, 40, 50 e 60 dias).	41
Tabela 5. Estimativas das diferenças de contrastes de médias (composição do meio de cultura Vs. o meio M4) do desenvolvimento de embriões de <i>E. oleracea in vitro</i> , dentro de cada período de avaliação (20, 30, 40, 50 e 60 dias).	43
Tabela 6. Agrupamento de médias para a altura de parte aérea (APA; mm) de plantas de <i>E. precatoria</i> Mart. obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos sob efeito da interação entre o estágio de maturação do fruto e a composição do meio de cultura, aos 30 dias <i>in vitro</i> .	44
Tabela 7. Agrupamento de médias para a altura de parte aérea (APA; mm) de plantas de <i>E. precatoria</i> Mart. obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos sob efeito do estágio de maturação do fruto ou da composição do meio de cultura, aos 60 dias <i>in vitro</i> .	45
Tabela 8. Agrupamento de médias para a altura de parte aérea (APA; mm) de plantas de <i>E. oleracea</i> obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos em função do estágio de maturação do fruto ou da composição do meio de cultura, aos 30 dias <i>in vitro</i> .	46

Tabela 9.	Agrupamento de médias para a altura de parte aérea (APA) de plantas de <i>E. oleracea</i> obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos em função do estágio de maturação do fruto ou da composição do meio de cultura, aos 60 dias <i>in vitro</i> .	47
Tabela 10.	Comparação das estimativas do número total de raízes (NR) de plantas de <i>Euterpe precatoria</i> Mart. obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos em função da composição do meio de cultura, aos 60 dias <i>in vitro</i> .	48
Tabela 11.	Comparação das estimativas do número total de raízes (NR) de plantas de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos em função da composição do meio de cultura, aos 60 dias <i>in vitro</i> .	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	Ácido Naftaleno Acético
ANOVA	Analysis of Variance
APA	Altura da Parte Aérea
BAP	6-Benzilaminopurina
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
EPA	Emissão de parte aérea, caracterizado pela emissão da primeira bainha foliar
ERP	Emissão da raiz primária
EZ	Embrião zigótico
MLG	Modelos Lineares Generalizados
MS	Meio de cultura de MS (Murashige & Skoog, 1962)
PC	Pecíolo cotiledonar
WPM	Meio de cultura de WPM (Lloyd e McCown, 1981)
Y3	Meio de cultura de Y ₃ (Eeuwens, 1976)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Aspectos gerais do gênero Euterpe	15
2.1.1	Distribuição geográfica e taxonomia	16
2.1.2	Morfoanatomia do fruto, da semente e plantas jovens de <i>Euterpe precatoria</i> e <i>E. oleracea</i>	17
2.2	Dormência e germinação em palmeiras	18
2.3	Métodos de reprodução em palmeiras	20
2.4	Desenvolvimento de embriões zigóticos <i>in vitro</i>	20
2.4.1	Importância do cultivo de embriões zigóticos <i>in vitro</i>	20
2.4.2	Influência da formulação do meio de cultura no desenvolvimento de embriões <i>in vitro</i>	21
2.4.3	Influência do tipo de fonte e concentrações de carboidrato no desenvolvimento de embriões <i>in vitro</i>	22
3.	OBJETIVOS	24
3.1	Geral	24
3.2	Específicos	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	Material vegetal e áreas de coleta	25
4.2	Obtenção do embrião zigótico	27
4.3	Delineamento experimental e descrição dos tratamentos	29
4.4	Condições do ambiente de cultivo	31
4.5	Análise estatística dos dados	31
5.	RESULTADOS	33
5.1	Aspectos gerais do desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões zigóticos e de plantas jovens de <i>E. precatoria</i> e <i>E. oleracea</i>	33
5.2	Desenvolvimento de embriões zigóticos e crescimento inicial de plantas de <i>E. precatoria</i> e <i>E. oleracea in vitro</i> em função da maturação do fruto e composição do meio de cultura	37
6.	DISCUSSÃO	50
7.	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICES	65
	ANEXOS ...	69

1. INTRODUÇÃO

As espécies popularmente conhecidas por palmeiras pertencem à família Arecaceae e apresentam ampla distribuição geográfica, com maior ocorrência em regiões tropicais e subtropicais (LORENZI et al., 2004). Possuem importância econômica, ornamental e ecológica inquestionáveis, como fonte de alimento à fauna silvestre e aos seres humanos, além de compor a vegetação em diversos ambientes (CLEMENT et al., 2005). Ademais, as palmeiras permitem a utilização de praticamente todos os seus órgãos, incluindo folhas maduras, folhas imaturas aclorofiladas, raízes, flores, frutos e sementes, predominando o maior interesse pelos frutos devido suas características oleaginosa e/ou alimentar (ALVES; DEMATTÊ, 1987; LORENZI et al., 2004).

Dentre as palmeiras nativas da região Amazônica, os açazeiros (*Euterpe precatoria* Mart. e *E. oleracea* Mart.) têm destacado interesse socioeconômico, cultural e ambiental. Estas espécies possuem usos variados e seus principais produtos são a polpa e o palmito de açaí, o primeiro proveniente do processamento dos frutos maduros e o segundo do estipe (caule), ambos comercializados em âmbito local, nacional e internacional (LEDO et al., 2002; SILVA et al., 2006; SANTANA; COSTA, 2008). De acordo com Schultz (2008) e Yuyama (2011) a polpa de açaí possui características essenciais à alimentação humana, como fonte de energia, fibras e nutrientes minerais. Nas últimas décadas, a tendência mundial do consumo de alimentos mais saudáveis se intensificou, com consequências sobre o mercado de açaí. Assim, tanto a coleta de frutos como a extração do palmito aumentaram, expandindo-se também o interesse de produtores brasileiros no cultivo racional dessa espécie (CEMBRANELI et al., 2009; MENEZES et al., 2011; BENTES et al., 2017).

Semelhante à maioria das palmeiras, a reprodução de *E. precatoria* e *E. oleracea* é feita a partir da germinação das sementes, embora *E. oleracea* também apresente a forma assexuada mediante o uso de perfilhos formados na base do estipe (NOGUEIRA, 1995). Essas estratégias de reprodução sexual e assexuada permitem o manejo de populações naturais densas e abundantes que ocorrem nas várzeas do estuário do rio Amazonas, tanto para produção de frutos como para extração de palmito (NOGUEIRA et al., 2005). Sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) não apresentam mecanismos de dormência, apresentando germinação desigual, provavelmente associada ao fato de que

as sementes não apresentam maturação uniforme, mesmo provenientes do mesmo cacho. Por outro lado, o açaí da Amazônia (*Euterpe precatoria* Mart.), apresenta sementes com germinação mais lenta, e neste caso, é possível inferir a existência de algum mecanismo de dormência controlando a germinação (CARVALHO; NASCIMENTO, 2018).

O crescente interesse da indústria por polpa e palmito de açaí, aliado as características reprodutivas dos açaizeiros, como o longo ciclo de vida e a inexistência de métodos eficientes de propagação vegetativa, incluindo *E. oleracea*, torna-se decisivo e estratégico estudar e compreender a biologia do desenvolvimento e a reprodução do açaizeiro, seja para fins de reprodução ou preservação.

O uso de técnicas biotecnológicas, como a cultura de embriões zigóticos e o estabelecimento de plantas jovens *in vitro*, constituem estratégias promissoras para um melhor conhecimento, domesticação e uso das espécies, com ampla utilização em estudos relacionados à fisiologia do desenvolvimento do embrião (HASLAM; YEUNG, 2011) e à reprodução vegetal. Além disso, para algumas espécies, o uso de embriões zigóticos para trabalhos *in vitro* auxilia o intercâmbio e manutenção de germoplasma, sendo uma técnica de importância como ferramenta para a preservação *ex situ* de germoplasma (LEDO et al., 2007; ENGELMANN et al., 2011; LUIS & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2017; SALEH et al., 2017), como também visando superar a dormência em palmeiras de difícil germinação, como é o caso de *E. precatoria* (PECHY AKÉ et al., 2004; TZEC-SIMÁ et al., 2006; RIBEIRO et al., 2011, 2012).

Particularmente para o gênero *Euterpe*, as aplicações da cultura de tecidos incluem o estudo da viabilidade de pólen (OLIVEIRA et al., 2001), a germinação (ou desenvolvimento) *in vitro* de embriões zigóticos (LEDO et al., 2001), estabelecimento de ráquulas (LEDO et al., 2001) e embriogênese somática (LEDO et al., 2002; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; FREITAS et al., 2014, 2016) todos com *E. oleracea*. Para *E. precatoria* é reportado apenas um estudo na literatura sobre a determinação de protocolo de assepsia a partir de embrião zigótico e segmentos foliares (BATISTA et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo para o desenvolvimento de embriões zigóticos e estabelecimento *in vitro* de *Euterpe precatoria* e *E. oleracea*. Para tanto, foram estudados o estágio de maturação dos frutos, bem como a composição do meio de cultura em função do tipo de fonte e concentração de carboidratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do gênero *Euterpe*

O gênero *Euterpe* está representado por 28 espécies distribuídas na América do Sul e América Central (UHL; DRANSFIELD, 1986). Cinco espécies são consideradas com quatro epítetos infraespecíficos, sem subespécies, com quatro variedades presentes na Amazônia brasileira, a saber: *E. oleracea* Mart., *E. precatoria* Mart. var. *precatoria*, *E. precatoria* var. *longevaginata* (Mart.) A.J.Hend, *E. catinga* Wallace var. *catinga*, *E. catinga* var. *roraimae* (Dammer) A.J.Hend. & Galeano, *E. edulis* Mart., e *E. longibracteata*. Barb. Rodr. (LEITMAN et al., 2013).

Dentre as espécies nativas do Brasil as mais importantes são *E. precatoria* Mart., *E. oleracea* Mart. e *E. edulis* Mart. em decorrência da amplitude fitogeográfica, exploração extrativista, características de manejo (CALZAVARA, 1972; CASTRO, 1992) e utilização agroindustrial (KHAN, 1986; VILLACHICA et al., 1996) para obtenção e comercialização de polpa, vinho de açaí e palmito. Somado a isso, essas espécies são cruciais às pessoas que formam parte da cadeia produtiva do açaí: extrativistas, produtores, intermediários, indústrias de beneficiamento e batedores artesanais (TAVARES; HOMMA, 2015).

A polpa do fruto do açaizeiro (*E. oleracea*) é considerado um alimento funcional pois possui efeito antioxidante, em função da composição de compostos fenólicos, notadamente as antocianinas. O teor desses pigmentos é benéfico a saúde, favorece a circulação sanguínea e protege o organismo contra a aterosclerose (ALEXANDRE et al, 2004), além de ter efeito energético decorrente da fração lipídica (BERNAUD; FUNCHAL, 2011). Além disso, possui mais benefícios como anti-inflamatório, imunomodulador e melhora dislipidemia da diabetes tipo 2, da síndrome metabólica do câncer (PORTINHO, 2012).

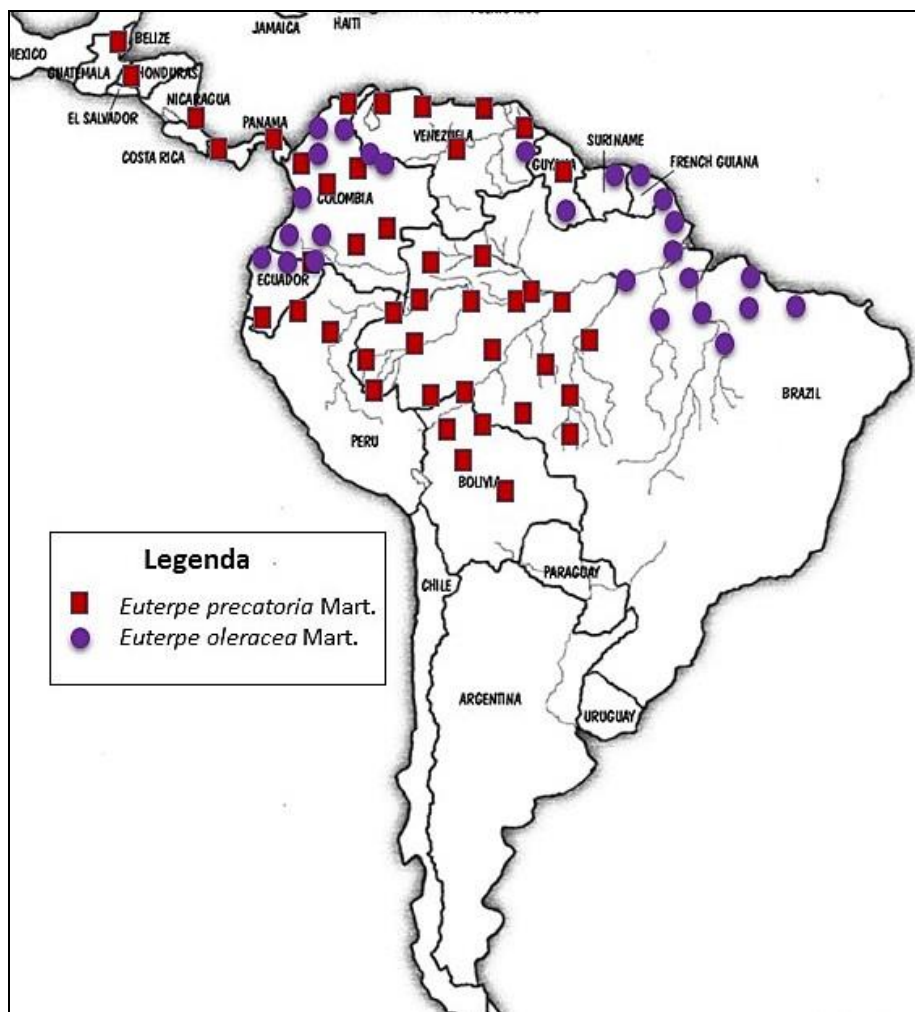
Os açaizeiros (*E. precatoria* e *E. oleracea*) possuem características consideradas essenciais para a nutrição humana como fonte de energia, fibra alimentar, antocianinas, minerais, particularmente cálcio e potássio, e os ácidos graxos oleico e linoleico (BERNAUD; FUNCHAL, 2011; YUYAMA, 2011).

2.1.1 Distribuição geográfica e taxonomia

Euterpe precatoria (Mart.) e *E. oleracea* (Mart) são monocotiledôneas pertencentes a família Arecaceae nativas da Amazônia. A palmeira *E. precatoria*, popularmente conhecida por Açaí-do-Amazonas e Açaí-solteiro, é uma espécie neotropical de sub-dossel de estipe único (monocaula), com altura entre 17 a 24 metros. Esta espécie tem distribuição desde a América Central (Belize, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Costa Rica e Panamá) até o Norte da América do Sul (Colômbia, Venezuela, Trinidad, Guianas, Equador, Peru, Brasil e Bolívia). No Brasil *E. precatoria* ocorre nos Estados Amazônicos do Acre, Amazonas, Rondônia e Pará (HENDERSON, 1995), como populações naturais em florestas maduras, tanto nas áreas inundadas como na terra firme, variando apenas o tempo de colheita. O açaí solteiro é pouco resistente ao fogo, motivo pelo qual é difícil sua ocorrência em áreas desmatadas (HENDERSON et al., 1995; KÜCHMEISTER et al., 1997).

A espécie *E. oleracea* é caracterizada como cespitosa, com registros de até 25 estipes por touceira, em diferentes estádios fenológicos. Os estipes de plantas adultas apresentam altura variada, que oscila entre 3 a 20 metros. Esta espécie tem ampla distribuição geográfica, desde a Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colômbia (CALZAVARA, 1972; ROOSMALEN, 1985; CAVALCANTE, 1991; BALICK, 1986b), também no Panamá, Equador e Trinidad (HENDERSON; GALEANO, 1996). No Brasil ocorre nos Estados do Amapá, Maranhão, Pará, Tocantins e no Mato Grosso (CALZAVARA, 1972; CAVALCANTE, 1991; BALICK, 1986a; MACEDO, 1995), (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição geográfica das espécies *Euterpe precatoria* e *E. oleracea*.



Fonte: Adaptado de Calzavara, 1972; Roosmalen, 1985; Balick, 1986a; Cavalcante, 1991; Henderson, 1995.

2.1.2 Morfoanatomia do fruto, da semente e plantas jovens de *Euterpe precatoria* e *E. oleracea*

O fruto de *E. oleracea* é uma drupa globosa, esférico, de 1 a 2 cm de diâmetro e peso médio de 1,5 gramas. O fruto de *E. precatoria* é esférico, de 1 a 1,8 cm de diâmetro (CLAY; CLEMENT, 1993). O epicarpo de ambas espécies, de coloração roxo ou verde dependendo da maturação, mesocarpo fino, polposo (1mm de espessura) envolve o endocarpo volumoso e duro, caracterizado por uma única semente do fruto que constitui aproximadamente 80% do volume total, coberto por camadas fibrosas e um leve revestimento oleoso (CALVANCANTE, 1991; CLAY; CLEMENT, 1993;

HENDERSON; GALEANO, 1996; MUÑIZ-MIRET et al., 1996; OLIVEIRA et. al., 1998; GALEANO; BERNAL, 2010).

Em *E. precatoria* a morfoanatomia da semente madura é caracterizada como albuminosa, forma globosa, preenche a maior parte do fruto, com único poro germinativo. O endosperma é volumoso, homogêneo, sólido e duro; com embrião indiviso, cônico, basal, eixo embrionário curvo, polo radicular indiferenciado e polo caulinar diferenciado em três primórdios foliares (AGUIAR; MENDONÇA, 2003).

O início do desenvolvimento plantular (germinação) de *E. precatoria* ocorre de 10 a 20 dias após a sementeira, feita a 2 cm de profundidade, com o opérculo na posição horizontal em substrato composto por pó de serragem curtida, mantido à 50% de luminosidade. Além disso, o processo germinativo é caracterizado pelo aparecimento de uma estrutura de aspecto cônico, de cor amarela esbranquiçada que corresponde ao pecíolo cotiledonar (AGUIAR; MENDONÇA, 2001).

Para a espécie *E. oleracea* Mart., a estrutura usada como semente corresponde ao endocarpo que contém em seu interior um embrião, com eixo embrionário diminuto, mas abundante tecido endospermático. O endocarpo é aproximadamente esférico com comprimento e diâmetro médios de 1,23 cm e 1,45 cm, respectivamente, e representa 73,46% da massa total do fruto (ROCHA, 1995).

2.2 Dormência e germinação em palmeiras

A dormência é geralmente considerada como uma característica de um lote de sementes; no entanto, o comportamento individual da semente tem um rol ecológico importante (BEWLEY et al., 2012; BASKIN; BASKIN, 2014a). Um dos critérios de avaliação de dormência é a germinabilidade. Segundo Finch-Savage e Leubner-Metzger (2006) a intensidade da dormência em uma semente é definida como o nível de restrição à germinação, que pode apresentar valores entre 0 e 100% de sementes germinadas.

Os diásporos de palmeiras podem apresentar vários tipos de dormência, com maior ocorrência para o tipo morfofisiológico. Todavia, o embrião é considerado subdesenvolvido, o endocarpo é permeável à água, e os diásporos levam muito tempo para germinar (BASKIN; BASKIN, 2014b). É relatado ainda que o embrião não esteja

completamente inativo (BASKIN; BASKIN, 2014a), considerando os embriões isolados de palmeiras como não adormecidos (RIBEIRO et al., 2011, 2012).

Em palmeiras, a germinação das sementes é geralmente definida como o deslocamento do opérculo resultante do alongamento do pecíolo cotiledonar (BASKIN; BASKIN, 2014 apud FIOR et al. 2011; RIBEIRO et al., 2011; NEVES et al., 2013). O haustório expande-se para preencher a maior parte da semente, não obstante o pecíolo cotiledonar emerge da semente (germinação). Nesse caso, a germinação ocorre antes do surgimento da radícula e da parte aérea, desta maneira o embrião requer um desenvolvimento adicional fora da semente antes da germinação no sentido estrito da palavra (BASKIN; BASKIN, 2014a). De acordo com Pinheiro (2001) o início da germinação da semente de *Schippia concolor* se dá com a protrusão do pecíolo cotiledonar e termina com o surgimento da plúmula através da base da bainha cotiledonar.

As estratégias para quebra de dormência, aceleração ou uniformização da germinação, incluem a remoção do endocarpo e/ou opérculo e tratamento com ácido giberélico (NAGAO et al., 1980; ROBERTO; HABERMANN, 2010; RIBEIRO et al., 2011; NEVES et al., 2013).

Para o açazeiro (*E. oleracea*) a germinação é classificada como ligular adjacente. O processo germinativo é desigual, associado provavelmente ao fato de que as sementes, mesmo provenientes do mesmo cacho, não apresentam maturação uniforme (CARVALHO; NASCIMENTO, 2018). Sementes oriundas de frutos maduros e semeadas imediatamente após a remoção da polpa (mesocarpo), com umidade entre de 40 a 45%, apresentam germinação superior a 89% (NASCIMENTO, 2008). No entanto, sementes de *Euterpe oleracea* Mart., *Euterpe edulis* Mart. e *Euterpe espirosantensis* são consideradas recalcitrantes e possuem dificuldade de conservação (ARAÚJO et al., 1994; ANDRADE; PEREIRA, 1997; MARTINS et al., 1999; NASCIMENTO, 2010).

A tolerância de sementes de *E. precatória* à dessecação (até 11% de umidade) é reportada por Costa (2015), que também observou maiores médias de germinação e velocidade de germinação à temperatura de 20 °C, tanto no claro quanto no escuro. Nascimento e Moraes (2011) afirmam que para conservar a qualidade das sementes de açai (*E. oleracae* Mart.), manter a viabilidade e evitar a infestação de fungos dos

gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, o armazenamento deve ser feito à temperatura constante de 20 °C e as sementes devem conter de 37% e 43% de teor de água.

2.3 Métodos de reprodução em palmeiras

A reprodução em palmeiras é realizada principalmente de forma sexuada, ou seja, mediante a germinação de sementes (LORENZI et al., 2010), notadamente diásporos (depois da despolpa para preparo do vinho de açáí). Entretanto, as dormências morfofisiológicas ou morfológicas são consideradas um dos principais fatores limitantes à germinação da família Arecaceae, e podem estar diretamente relacionadas à imaturidade do embrião zigótico (OROZCO; SEGOVIA et al., 2003; PÉREZ et al., 2008; BASKIN; BASKIN, 2014b).

A reprodução sexuada é o único mecanismo de propagação conhecido para *E. precatória* Mart. (BELIN-DEPOUX; QUEIROZ, 1971), que possui como principal característica o estipe único, ou solitário. Nesta espécie a germinação é caracterizada como lenta, irregular e com baixa porcentagem, além de perder rapidamente a viabilidade quando desidratadas (BROSCHAT, 1994; MARTINS et al., 1996; FERREIRA; GENTIL, 2006; COSTA; MARCHI, 2008). Já *E. oleracea* pode ser reproduzida pelo método sexual e assexual, embora a utilização de sementes seja a forma predominante (NOGUEIRA, 1997).

A espécie *E. precatória* Mart. não apresenta reprodução assexuada, uma vez que as plantas não produzem perfilhos. Comportamento contrário acontece com a espécie *E. oleracea* Mart. que apresenta reprodução assexuada, podendo-se multiplicar abundantemente através de perfilhos formados na base do estipe da planta (BELIN-DEPOUX; QUEIROZ, 1971), entretanto, o número de perfilhos varia em função do genótipo e condição edafoclimática (NOGUEIRA, 1997; OLIVEIRA, 1998).

2.4 Desenvolvimento de embriões zigóticos *in vitro*

2.4.1 Importância do cultivo de embriões zigóticos *in vitro*

A cultura de embriões zigóticos *in vitro* consiste na retirada do embrião da semente e seu cultivo em meio de cultura adequado ao crescimento, desenvolvimento e/ou conversão em planta (a depender do objetivo proposto no estudo). O embrião

zigótico é amplamente utilizado em estudos sobre cultura de tecidos vegetais, pois representa um explante asséptico e com elevada totipotência celular, razões como essas que o incluem como método alternativo à multiplicação vegetal, bem como em estudos visando uma melhor compreensão dos requerimentos nutricionais e fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário e conversão em plantas jovens. Além disso, o embrião zigótico constitui estratégia importante para superar a dormência das sementes em espécies que apresentam limitações inerentes à maturidade do embrião ou em função da presença de substâncias inibidoras no endosperma, além de possibilitar diminuir o tempo necessário para o melhoramento genético vegetal (BRIDGEN, 1994; MONNIER, 1995; HU; FERREIRA; 1998; HASLAM; YEUNG, 2011). O cultivo de embriões *in vitro* também é interessante para pesquisas acerca da manipulação dos constituintes do meio de cultura visando avaliar as respostas morfofisiológicas dos embriões cultivados (RAGHAVAN, 2003), e esclarece aspectos da fisiologia do desenvolvimento em condições *in vitro* (TRIQUES et al., 1997).

Na família Arecaceae o embrião zigótico é utilizado visando a obtenção direta de plantas “assépticas”, para o resgate embriões e obtenção plantas de cruzamentos específicos e cultivares elites, na conservação *in vitro* de recursos genéticos e como fonte de explante para reprodução por embriogênese somática (LEDO et al., 2007; ENGELMANN et al., 2011).

2.4.2 Influência da formulação do meio de cultura no desenvolvimento de embriões *in vitro*

A composição do meio de cultura é determinante no desenvolvimento de embriões e sua conversão em planta *in vitro*. As formulações mais utilizadas em palmeiras são as propostas por Murashige e Skoog (1962) e Eeuwens (1976), com as devidas alterações e suplementações, em função da espécie e objetivo da pesquisa.

Segundo Ledo et al. (2007) embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L. são cultivados com sucesso em meio Y3 líquido sem carvão ativado. De acordo com Minardi et al., (2011) o meio de cultura Y3 mostrou-se adequado para a cultura *in vitro* de *Butia eriospatha* devido ao fato de apresentar na composição maior nível de potássio do que o MS o WPM, sabendo que esse nutriente tem relação com a regulação osmótica de células vegetais e a adaptação de palmeiras em solos salinos. No entanto, Silva

(2002), para germinação de embriões de *Cocos nucifera* L., avaliando três meios de cultura, o Y3 e MS foram os que proporcionaram melhores resultados.

De acordo com Medeiros et al. (2015) o uso de meio Y3 com carvão ativado ou ácido láurico, promoveu o crescimento de plantas de *Syagrus coronata*, através da cultura de embriões zigóticos, sendo o método admissível de propagação já que tem baixa porcentagem de germinação. Ledo et al., (2001) determinou que as maiores porcentagens de conversão de embriões zigóticos e formação de plântulas normais foram verificadas, em média em todos os tratamentos constituídos da presença de ANA e BAP no meio MS, modificado pela ausência de vitaminas e minerais. Entretanto, Yokoo et al. (1992) obtiveram a formação de plântulas completas a partir de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. e do híbrido *Euterpe oleracea* x *E. edulis*, em meio MS modificado na ausência de reguladores de crescimento.

2.4.3 Influência do tipo de fonte e concentrações de carboidrato no desenvolvimento de embriões *in vitro*

Em sistemas heterotróficos *in vitro*, o cultivo de células, tecidos e órgãos vegetais normalmente necessitam da adição de uma fonte de carboidrato ao meio de cultura. Por essa razão, vários estudos sobre os efeitos do tipo de fonte e concentração de carboidrato na morfogênese vegetal *in vitro* são reportados, reafirmando a importância nutricional de uma fonte adequada de carboidrato ao meio nutritivo.

As principais fontes de carboidrato utilizadas em sistemas *in vitro* são a sacarose, glicose, frutose e maltose, sendo a primeira amplamente conhecida e estudada.

Saldanha et al. (2012) observaram que a sacarose e a concentração salina do meio de MS não influenciam significativamente a germinação de embriões zigóticos obtidos de frutos imaturos. Em média, 74% dos embriões da espécie *Euterpe edulis* Mart. germinaram. Na mesma pesquisa dez dias após da inoculação de embriões zigóticos foram observados sinais de primórdio foliar e crescimento da raiz.

Avaliando o estágio de maturação do fruto e a concentração de sacarose em embriões de *Astrocaryum ulei* (Arecaceae), Pereira e colaboradores (2006) não observaram diferenças significativas quanto à sacarose (15, 30 e 45 g.L⁻¹) para embriões oriundos de frutos imaturos. No entanto, o cultivo de embriões obtidos de frutos

maduros em meio de MS suplementado com 30 e 45 g.L⁻¹ de sacarose proporcionaram maior desenvolvimento *in vitro*, possivelmente em razão do estágio mais avançado de diferenciação dos tecidos. De acordo com García et al., (2002) a germinação de embriões *in vitro* pode até acontecer em meios de cultura com baixa concentração de carboidratos, mas não para o posterior crescimento das plântulas. Ainda assim, Ribeiro et al. (1998), concluíram que o melhor desenvolvimento para os embriões imaturos de laranja-pera em diferentes idades foi no meio MS com 75% da sua fórmula original acrescido de 45 a 60 g.L⁻¹ de sacarose.

O aumento da concentração de sacarose de 20 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹ associado à concentração de sal ao 50% do meio MS provavelmente diminuiu o metabolismo das plantas da palmeira (*E. edulis* Mart), resultando na menor altura da planta. O baixo teor de proteína Rubisco (Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) nas cultivares de *C. nucifera* cultivadas *in vitro* foi atribuído a concentrações elevadas de sacarose (90 g.L⁻¹) no meio de cultura (FUENTES et al., 2005) que diretamente afetaram sua capacidade fotossintética. No entanto, o aumento da concentração de sacarose de 20 g.L⁻¹ para 40 g.L⁻¹ em MS resultou em aumento da altura da planta (SALDANHA; MARTINS-CORDER, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estabelecer um protocolo para o desenvolvimento de embriões zigóticos e formação *in vitro* de plantas de *Euterpe precatoria* e *Euterpe oleracea*.

3.2 Específicos

- Descrever os eventos morfológicos durante o desenvolvimento do embrião de *E. precatoria* e *E. oleracea in vitro*.
- Determinar a influência do estágio de maturação do fruto no desenvolvimento de embriões zigóticos *in vitro*.
- Avaliar a influência da composição dos meios de cultura no desenvolvimento de embriões zigóticos *in vitro*.
- Recomendar o estágio de maturação do fruto e a composição do meio de cultura para o desenvolvimento de embriões zigóticos e estabelecimento de plantas jovens para as espécies estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido com as espécies: *Euterpe precatoria* e *E. oleracea*, popularmente conhecidas como açáí solitário ou do Amazonas e açáí de touceira, respectivamente. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Anatomia Vegetal da Universidade Federal do Acre Campus de Rio Branco, AC.

4.1 Material vegetal e áreas de coleta

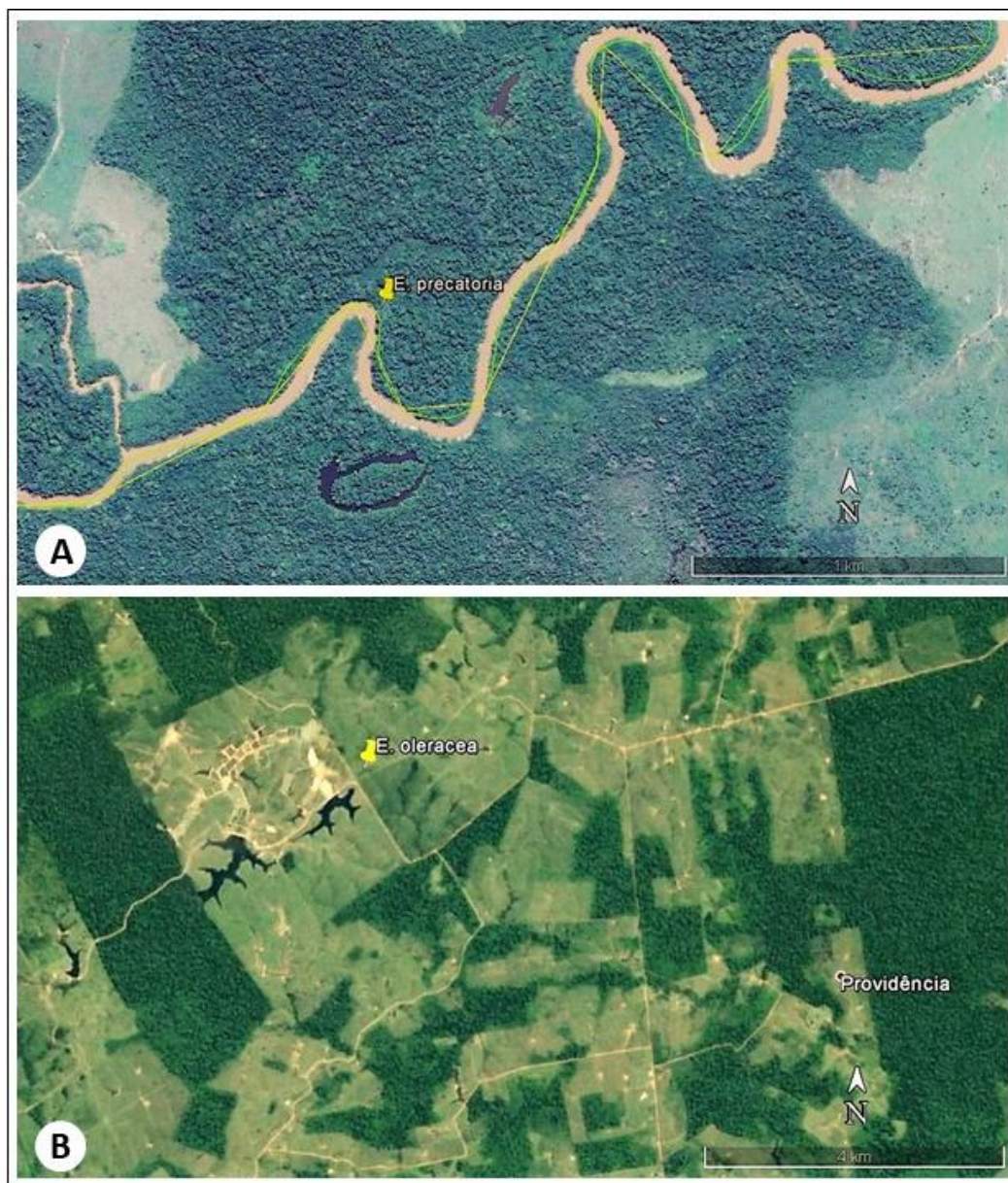
O material vegetal consistiu de frutos em dois estádios de maturação (maduro e imaturo), coletados de plantas matrizes adultas. Ambos os frutos foram colhidos em função do ponto de maturação. Enquanto os frutos maduros caracterizavam-se por possuírem cor escura e estarem prontos para serem colhidos para o preparo da polpa, os imaturos apresentavam frutos ainda de coloração esverdeada (Figura 2).

Figura 2 - Planta matriz de *Euterpe precatoria* com frutos maduros (A). Planta de *E. oleracea* evidenciando frutos verdes e maduros (B). Aspecto dos frutos maduros (C) e imaturos (verdes) (D).



Os frutos de açaí solteiro (*E. precatória* Mart.) foram coletados de plantas adultas de uma população natural em “terra firme”, no município de Plácido de Castro, AC (Figura 3A). Para *E. oleracea*, os frutos foram coletados em plantio comercial do cultivar BRS-Pará, na Fazenda Providência, município de Bujari, AC, distante a 23 km ao Norte-Oeste de Rio Branco, localizado no nordeste do estado do Acre (Figura 3B).

Figura 3 - Mapa de localização das plantas matrizes. (A) *E. precatória* Mart. e (B) *E. oleracea* Mart.



Fonte: Elaboração própria no programa Google Earth Pro 7.1.5.1557.

4.2 Obtenção do embrião zigótico

Depois de coletados, os frutos foram imediatamente acondicionados em sacos de ráfia (fibra), levados ao laboratório e mantidos em geladeira entre 4 e 6 °C, até sua utilização para obtenção da semente e extração do embrião (explante).

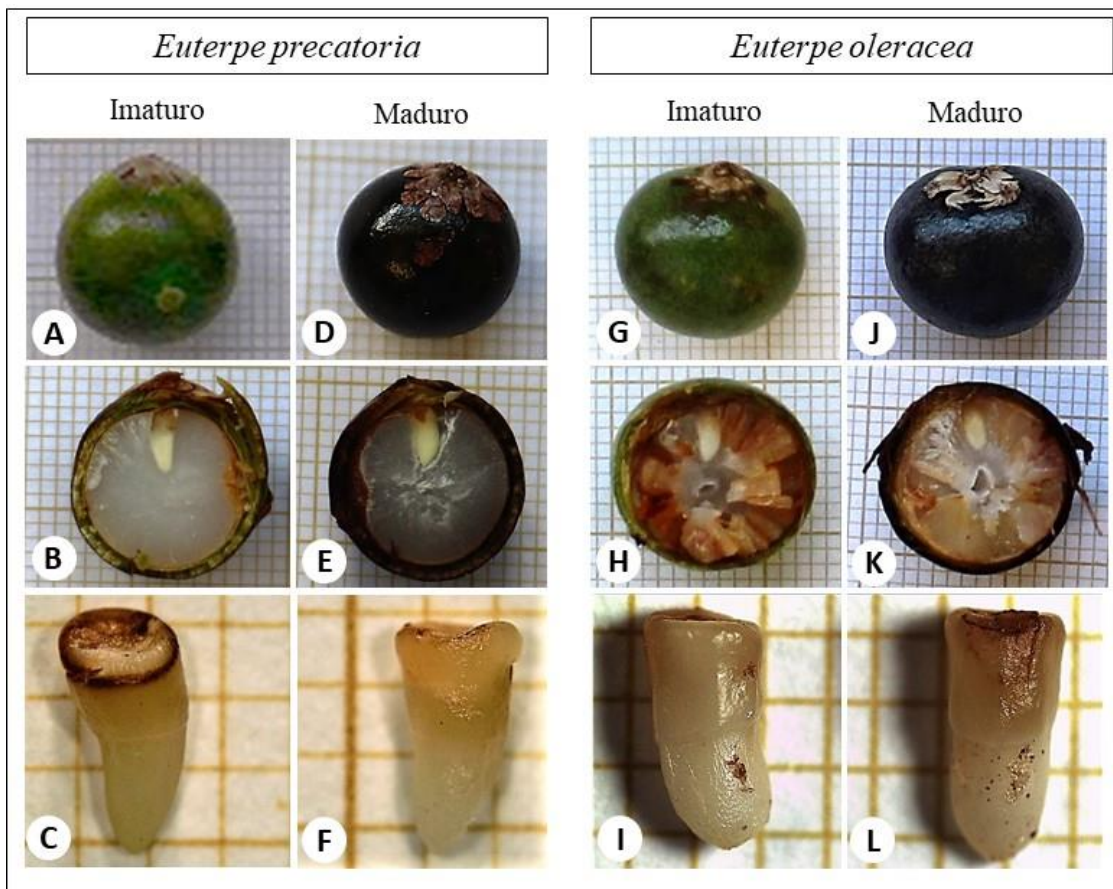
Aproximadamente 24 horas após a coleta, os frutos foram retirados da geladeira, lavados em água corrente e detergente líquido neutro, e enxaguados. Imediatamente após, os frutos maduros foram imersos em água à aproximadamente 45 °C durante 30 minutos para facilitar a retirada do epicarpo e mesocarpo (polpa). Então, com o auxílio de uma faca, obteve-se somente as amêndoas (endosperma com embrião e poro germinativo visível) que foram rapidamente lavadas com água de osmose reversa. Para os frutos imaturos, o procedimento foi semelhante, porém, sem a etapa de imersão em água a 45 °C (devido a condição imatura do fruto).

Em condições de fluxo laminar horizontal, as amêndoas foram submetidas ao processo de desinfestação proposto por (LEDO et al., 2001) modificado. Para tanto, foi realizada imersão das amêndoas em álcool 70% (v/v) durante 2 min, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (2 a 2,5% de cloro ativo), adicionado de 0,05 ml de surfactante Tween-20[®] para cada 100 ml dessa solução, por 20 min. Posteriormente, foram efetuados quatro enxágues com água de osmose reversa autoclavada para remoção dos resíduos do hipoclorito de sódio (Figura 5).

Após a desinfestação, a extração do embrião zigótico foi realizada em fluxo laminar. Para tanto, com auxílio de pinça, alicate e bisturi, os embriões foram extraídos e individualmente sobre meio de cultura disposto em tubos de ensaio (15 x 150 mm), 10 mL de meio de cultura/tubo de ensaio, de acordo com os tratamentos (ver item 4.3).

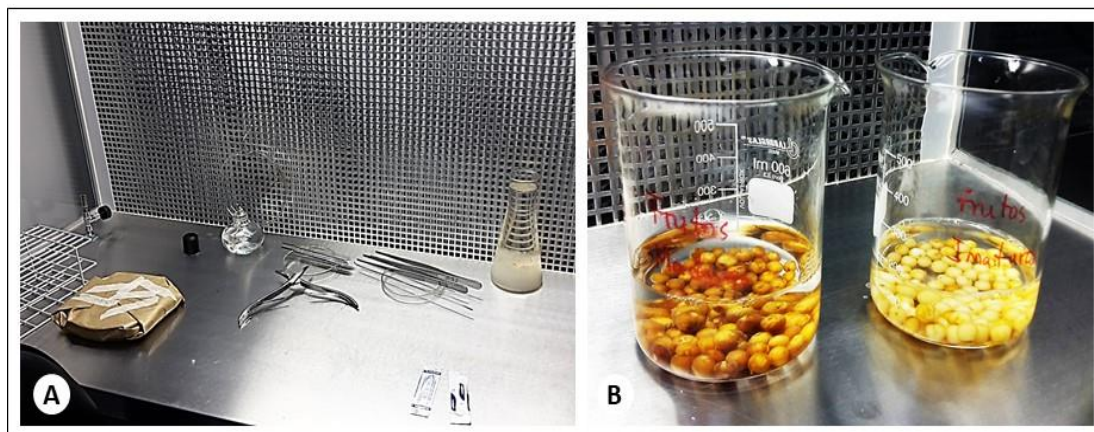
Na Figura 4 pode ser observado o aspecto dos frutos maduros e imaturos, bem como do embrião isolado, para as espécies estudadas. Como é verificado em secção longitudinal, frutos imaturos de *E. precatória* tiveram menor espessura do mesocarpo, embrião e endosperma brancos, enquanto para *E. oleracea* os frutos imaturos apresentaram endosperma com coloração marrom e pouco organizado, e embrião com região proximal marrom.

Figura 4 - Aspecto geral dos frutos imaturos e maduros (inteiros e em secção longitudinal) e do embrião zigótico isolado. *E. precatoria* Mart (A - F) e *E. oleracea* Mart. (G - L).



Na Figura 5 observa-se o ambiente de fluxo laminar horizontal, bem como parte do processo de desinfestação das amêndoas provenientes de frutos maduros e imaturos.

Figura 5 - Procedimentos utilizados para desinfestação das amêndoas (A): Utensílios e materiais utilizados para extração do embrião zigótico. (B): Etapa do processo de desinfestação das amêndoas.



4.3 Delineamento experimental e descrição dos tratamentos

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com arranjo fatorial 2 x 12, sendo dois estádios de maturação do fruto (maduro e imaturo) e doze composições de meio de cultura (combinação das formulações de MS e Y3, tipos e concentrações de carboidratos), num total de 24 tratamentos (Tabela 1) por espécie. No total foram utilizadas 15 repetições por cada tratamento, representada por um tubo de ensaio (25 x 150 mm), preenchido com 10 mL de meio de cultura e um embrião zigótico, fazendo o total de 360 embriões (unidades experimentais), por espécie.

A formulação de MS obedeceu a composição proposta por Murashige e Skoog (1962), havendo modificação do meio de Y3 (Eeuwens, 1976) que teve a concentração de sulfato ferroso e EDTA idêntica ao meio MS.

Tabela 1 - Caracterização dos tratamentos, definidos a partir do estágio de maturação dos frutos e da composição do meio de cultura, e avaliados sobre o desenvolvimento de embriões zigóticos de *Euterpe precatoria* e *E. oleracea in vitro*.

Tratamento	Fatores avaliados	
	Estádio de maturação do fruto	Composição do meio de cultura
T1	Fruto maduro (FM)	M1 (MS + Sacarose 87,64 mM)
T2		M2 (MS + Sacarose 131,46 mM)
T3		M3 (MS + Sacarose 175,28 mM)
T4		M4 (MS + Glicose 87,64 mM)
T5		M5 (MS + Glicose 131,46 mM)
T6		M6 (MS + Glicose 175,28 mM)
T7		M7 (Y3 + Sacarose 87,64 mM)
T8		M8 (Y3 + Sacarose 131,46 mM)
T9		M9 (Y3 + Sacarose 175,28 mM)
T10		M10 (Y3 + Glicose 87,64 mM)
T11		M11 (Y3 + Glicose 131,46 mM)
T12		M12 (Y3 + Glicose 175,28 mM)
T13	Fruto imaturo (FI)	M1 (MS + Sacarose 87,64 mM)
T14		M2 (MS + Sacarose 131,46 mM)
T15		M3 (MS + Sacarose 175,28 mM)
T16		M4 (MS + Glicose 87,64 mM)
T17		M5 (MS + Glicose 131,46 mM)
T18		M6 (MS + Glicose 175,28 mM)
T19		M7 (Y3 + Sacarose 87,64 mM)
T20		M8 (Y3 + Sacarose 131,46 mM)
T21		M9 (Y3 + Sacarose 175,28 mM)
T22		M10 (Y3 + Glicose 87,64 mM)
T23		M11 (Y3 + Glicose 131,46 mM)
T24		M12 (Y3 + Glicose 175,28 mM)

MS: meio de Murashige & Skoog, (1962); Y3: meio de Eeuwens, 1976.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$, sendo adicionados de $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ de PhytigelTM e $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado. A esterilização dos meios de cultura foi por autoclavagem a $120 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 minutos, a 1 kgf.cm^{-2} . Ao término deste processo, realizou-se agitação manual do meio de cultura para melhor homogeneização do carvão ativado durante a solidificação do meio.

4.4 Condições do ambiente de cultivo

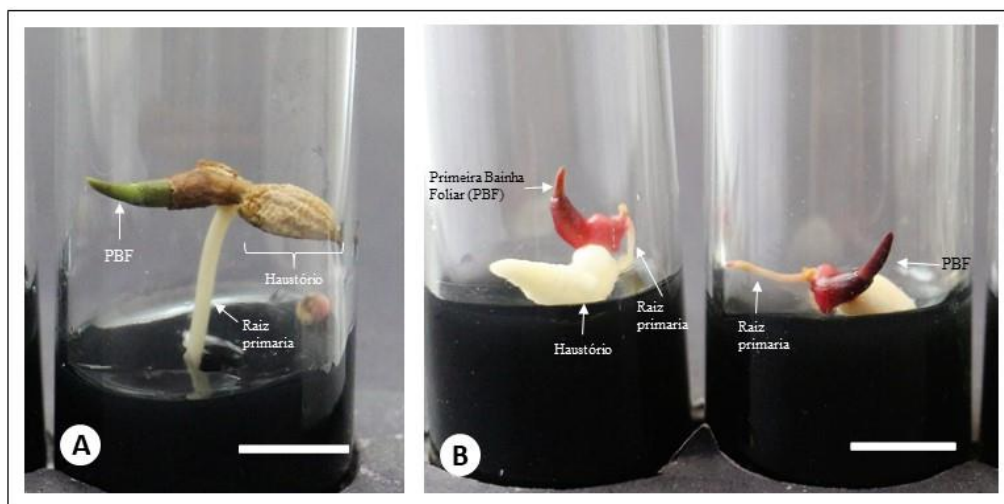
Os tubos de ensaio foram fechados com tampas de polipropileno transparente envoltas com três camadas de filme de PVC. Por fim, os tubos com os embriões foram dispostos em grades porta-tubos e mantidos em sala artificial com temperatura de 25 ± 5 °C, umidade relativa do ar em torno de 60% e fotoperíodo de 16 horas (fornecido por lâmpadas fluorescentes tubulares luz branca fria de 20W, com intensidade de 50 a 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

4.5 Análise estatística dos dados

No presente estudo foram avaliadas respostas qualitativas e quantitativa, a cada dez dias, por um período de até 60 dias.

A maioria das variáveis foram de caráter qualitativo (nominal e ordinal): porcentagem de contaminação por fungo ou bactéria, oxidação do embrião, anormalidade no desenvolvimento embrionário *in vitro*, ocorrência de danos físicos, tipo de haustório (desenvolvimento), emissão da raiz primária (ERP) e emissão de parte aérea (EPA), considerando a emissão da primeira bainha foliar. Destas, a maioria foi considerada para caracterização do desenvolvimento embrionário, e apenas as variáveis desenvolvimento do embrião, altura de parte aérea (APA) e número de raízes (NR) foram submetidas à análise estatística. Destaque-se que o critério estabelecido para o desenvolvimento do embrião ou germinação *in vitro* foi a combinação de duas variáveis ERP e EPA (Figura 6).

Figura 6 – Critério considerado para caracterizar o desenvolvimento embrionário de (A) *Euterpe precatoria* e (B) *E. oleracea in vitro*. Barras 10 mm.



A interação entre os fatores com relação ao conjunto de variáveis de contagem foi analisada utilizando Modelos Lineares Generalizados (MLG), capazes de permitir utilizar distribuições não normais dos erros (binomial, Poisson, quasi-Poisson) e variâncias não constantes (MCCULLAGH; NELDER, 1989). Para estudar os efeitos das variáveis de classificação sobre a distribuição das variáveis respostas, foram construídas tabelas de contingência para a variável combinada (germinação), em relação ao estágio de maturação e as composições de meio, todas nos intervalos de tempo avaliados (Anexo 2 e 3).

Para a altura de parte aérea (APA), de caráter quantitativo (variável contínua), foi realizada análise de variância, compelindo os pressupostos. Para realizar as análises ANOVA e MLG se utilizou o programa R versão 3.4.2 com interface RStudio versão 1.1.383, software livre.

5. RESULTADOS

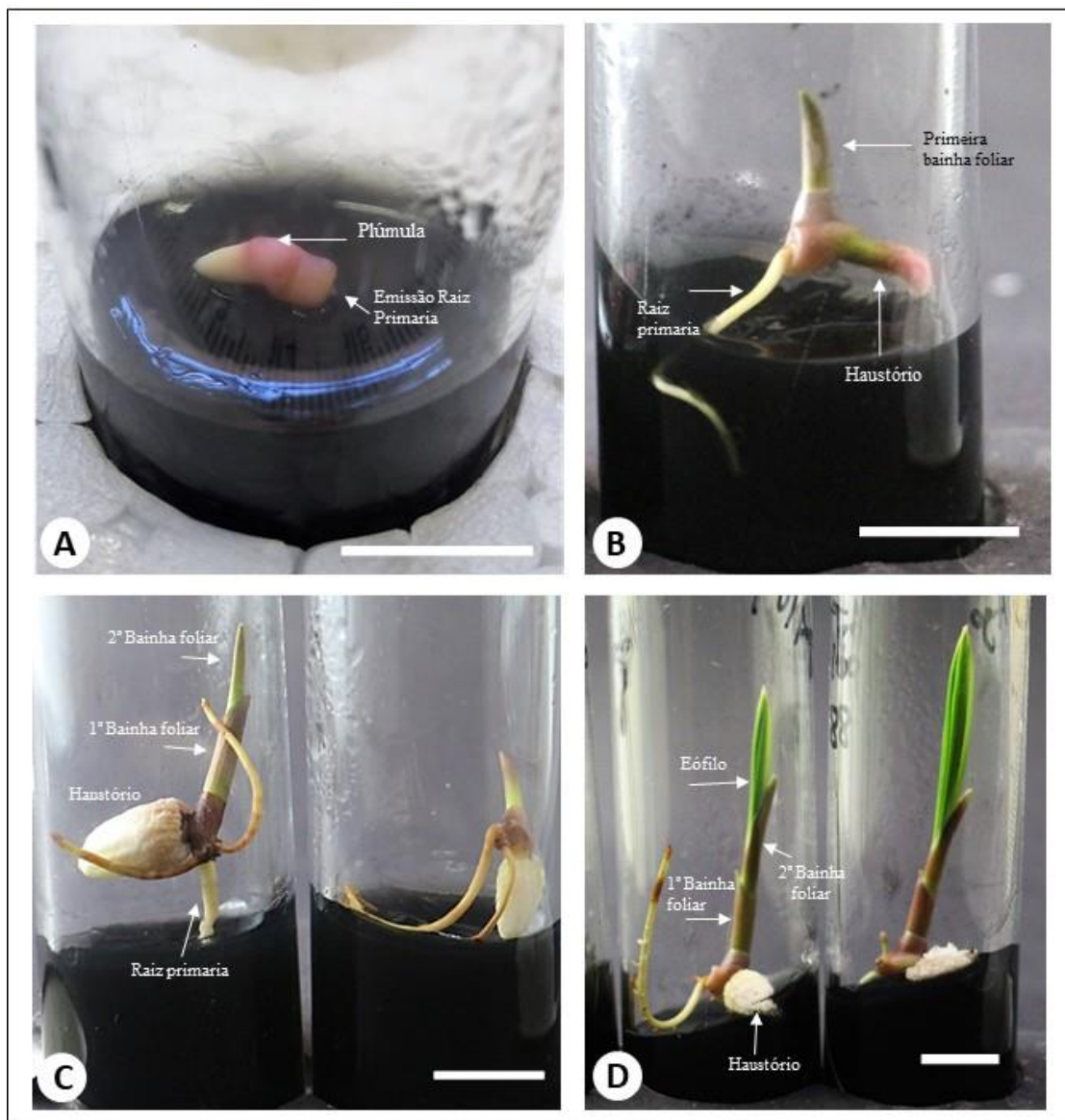
5.1 Aspectos gerais do desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos e de plantas jovens de *E. precatoria* e *E. oleracea*

O desenvolvimento do embrião zigótico de *E. precatoria in vitro* é mostrado na Figura 7. Em geral, durante os primeiros 7 dias *in vitro*, foram observados intumescimento e alongamento dos embriões zigóticos, que progrediu com a protusão da raiz primária e formação da plúmula (pontos de crescimento), aos 10 dias *in vitro* (Figura 7A). Ainda neste período, o embrião apresentou curvatura devido ao alongamento celular; pecíolo cotiledonar (PC) de cor marrom e haustório de cor branca. A cor do PC variou de branco à roxa, característica desta espécie pela presença de antocianinas. A curvatura observada nos embriões não foi uma característica uniforme aos 10 dias de cultivo (Figura 7A).

A formação da radícula e plúmula constitui um dos primeiros eventos morfofisiológicos que caracterizam o desenvolvimento do embrião zigótico (a germinação). A plúmula é observada na parte superior do PC, como um pontinho (iniciação de uma protuberância) de cor vermelha, que expande e posteriormente dá origem à primeira bainha cotiledonar (Figura 7B). Concomitantemente, com algumas exceções, também ocorre a protusão da radícula, que apresenta alongamento, formação de outras raízes em diferentes direções (Figura 7B). Estas estruturas são verificadas entre 10 e 40 dias de cultivo, para a maioria dos embriões *in vitro*.

Outra estrutura característica do desenvolvimento embrionário em palmeiras é o haustório, uma estrutura altamente especializada e crucial à germinação de sementes e formação da plântula. Em *E. precatoria* foi constatada mudança na morfologia, cor e tamanho do haustório, no período de 20 até 60 dias *in vitro*, que ao final deste período, apresentou característica rugosa, forma ovoide alongada, e cor branca a roxa. Por fim, decorridos 60 dias do cultivo *in vitro*, houve a formação (conversão) do embrião em planta jovem, caracterizada pela presença de raízes, primeira e segunda bainhas, desenvolvimento completo do haustório, de cor branca a marrom (Figuras 7C e D).

Figura 7 - Aspectos do desenvolvimento do embrião zigótico e plantas de *Euterpe precatoria* Mart. *in vitro*. (A) Embrião com 10 dias em meio M7 (Y3 + sacarose 87,64 mM). (B) Desenvolvimento aos 30 dias em M7. (C) Desenvolvimento aos 60 dias em meio M7 (Y3 + sacarose 87,64 mM) (D) Plantas jovens aos 60 dias em meio M10 (Y3 + glicose 87,64 mM). Barras: 10 mm.



De modo geral, o processo de desenvolvimento dos embriões de *E. precatoria* é variável, o que pode estar associado à variabilidade fisiológica e genética dos frutos oriundos do mesmo cacho. Outra hipótese é que o cultivo *in vitro*, em função da posição do explante no meio de cultura, pode ter ocasionado estresse e posterior oxidação do haustório.

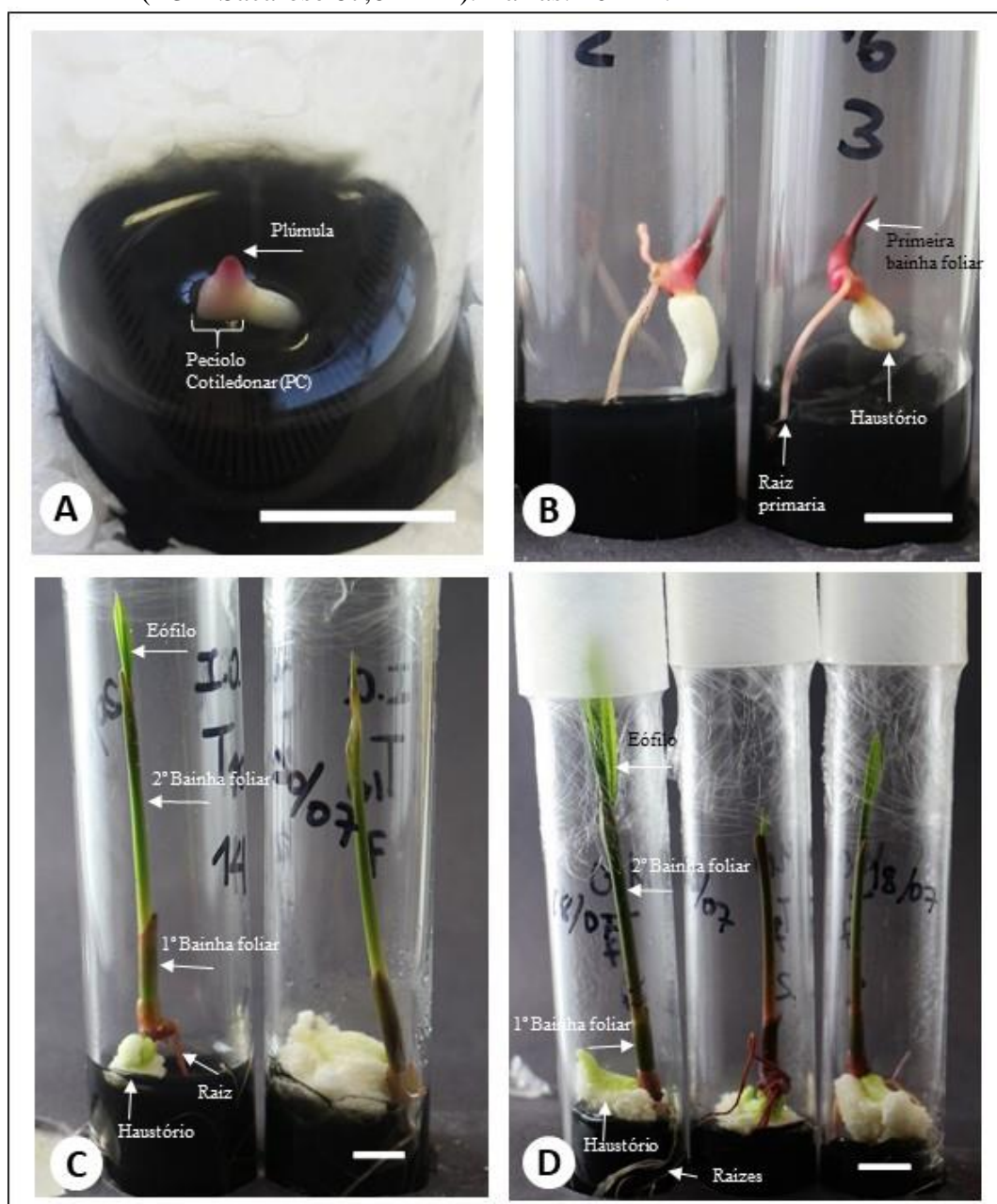
Comparado à *E. precatoria*, o embrião zigótico (EZ) de *E. oleracea* apresentou aspectos morfofisiológicos semelhantes durante o desenvolvimento embrionário e

conversão em plantas *in vitro* (Figura 8A). Ainda assim, algumas características foram inerentes à *E. oleracea*, a saber: pecíolo cotiledonar (PC) de cor marrom; haustório de maior tamanho e cor completamente branca, podendo ser liso ou rugoso; embrião com comprimento variável (2,5 até 4 mm) (Figura 8A).

Outra característica observada em *E. oleracea* é que o embrião teve intumescimento, alongamento e produção de antocianina mais acentuados, aos primeiros dez dias do estabelecimento *in vitro* (Figura 8A); e cor roxa mais intensa no PC. Ademais, entre 10 e 20 dias, observou-se, na maioria dos embriões de *E. oleracea*, a formação da radícula, de cor branca, e plúmula, de cor avermelhada (Figura 8C). É importante salientar, para essa espécie, que a curvatura do embrião não foi observada em todos os embriões, devido ao seu rápido desenvolvimento e formação progressiva das estruturas.

Evidenciou-se aos 30 dias, a presença de raízes bem desenvolvidas, desenvolvimento completo do haustório (de consistência esponjosa), e emissão da primeira bainha foliar, como consequência do rompimento da plúmula (Figura 8B). Também foi constatado que o crescimento e desenvolvimento desta espécie foi superior ao observado em *E. precatoria*, com maior altura da parte aérea, primeira e segunda bainha foliar, além de eófilos, haustório com pleno desenvolvimento e maiores e presença de raízes secundárias aos 60 dias, considerando-se plantas jovens (Figuras 8C e D). Observou-se, ainda, que os embriões de *E. oleracea* Mart. tiveram, de forma geral, menor variação morfológica e de desenvolvimento, sendo, mais uniformidade *in vitro*.

Figura 8 – Aspectos do desenvolvimento do embrião zigótico e plantas de *Euterpe oleracea* Mart. (A) Embrião com formação da plúmula aos 10 dias em meio M6 (MS + Glicose 175,28 mM); (B) Desenvolvimento aos 30 dias em meio M6 (MS + Glicose 175,28 mM) mostrando emissão das raízes, desenvolvimento do haustório, ruptura da plúmula e formação da primeira bainha foliar. (C) Plantas jovens com 60 dias em meio M10 (Y3 + Glicose 87,64 mM), com haustórios bem desenvolvidos e presença de eófilos. (D) Plantas jovens com raízes, haustório desenvolvido e eófilos em meio M7 (Y3 + Sacarose 87,64 mM). Barras: 10 mm.



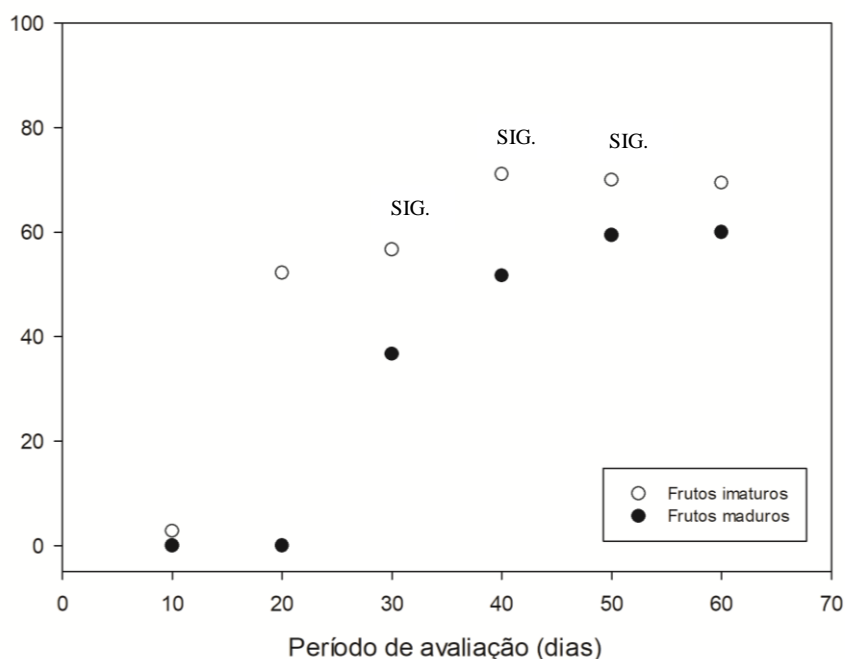
A menor variação no desenvolvimento de EZ de *E. oleracea* *in vitro* pode estar associada a cultivar utilizada no presente estudo, o BRS-Pará, melhorada geneticamente.

5.2 Desenvolvimento de embriões zigóticos e crescimento inicial de plantas de *E. precatoria* e *E. oleracea* *in vitro* em função da maturação do fruto e composição do meio de cultura

Os modelos lineares generalizados utilizados não tiveram bom ajuste aos dados para a interação entre o estágio de maturação do fruto e a composição do meio de cultura, para ambas as espécies de *Euterpe*. Dessa forma, foi estudado o efeito principal da maturidade do fruto e do meio de cultivo, em função do período de avaliação *in vitro* (Figuras 8 e 9).

O desenvolvimento de embriões nas espécies estudadas foi influenciado ($p < 0,05$) pela maturação do fruto para a maioria dos períodos avaliados (Tabela 2 e 3), exceto aos 60 dias em *E. precatoria*. A porcentagem de embriões desenvolvidos *in vitro* foi maior para frutos imaturos, para ambas as espécies, com tendência crescente de desenvolvimento de EZ provenientes de frutos imaturos e maduros até 40 e 50 dias (Figuras 9 e 10). Dessa forma, optou-se por uma análise estatística que pudesse comparar as médias dos frutos maduros e imaturos para cada período de avaliação. Assim, considerou-se, o tempo como fator e estimou-se os contrastes de médias para os estádios de maturação, dentro de cada tempo (30, 40, 50 e 60 dias) (Tabelas 2 e 3).

Figura 9 - Porcentagem de embriões de *Euterpe precatoria* Mart. desenvolvidos *in vitro* sob efeito do estágio de maturação do fruto, em diferentes períodos de avaliação.



Legenda: SIG: Significativo

Na Tabela 2 apresentam-se as estimativas dos contrastes das médias em função da maturação do fruto de *E. precatoria*. Aos 30 dias, a estimativa -0,8148 representa a diferença entre as médias dos frutos maduros em relação aos imaturos, e o sinal negativo indica que EZ oriundos de frutos maduros tiveram porcentagem de desenvolvimento inferior aos imaturos (p -valor $< 0,05$). Comportamento semelhante foi verificado com 40 e 50 dias *in vitro*.

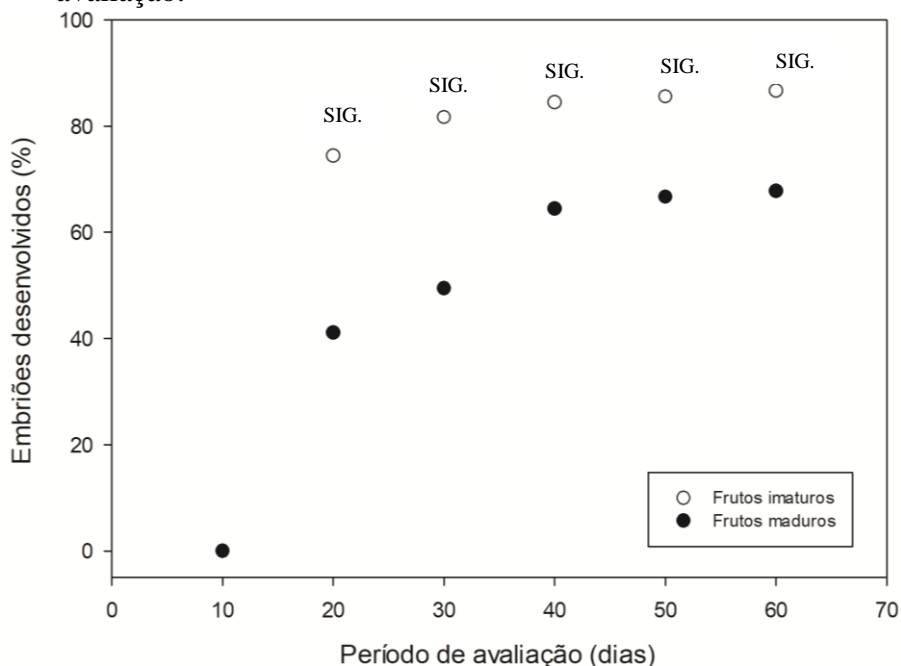
Tabela 2 - Estimativas das diferenças de contrastes de médias (frutos maduros Vs. frutos imaturos) da porcentagem de embriões desenvolvidos *in vitro* de *E. precatoria*, dentro de cada período de avaliação.

Período de avaliação (dias)	Estimativas	Desvio-padrão	p-valor
30	-0,8148	0,2157	0,000159 *
40	-0,8341	0,222	0,000172 *
50	-0,4649	0,2225	0,036644 *
60	-0,4155	0,2221	0,06137 ^{ns}

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$) pelo teste MLG

É importante salientar que a porcentagem média de embriões desenvolvidos foi maior para *E. oleracea*, notadamente aos 20 e 30 dias de avaliação. Este resultado confirma o melhor desenvolvimento dos embriões de *E. oleracea*.

Figura 10 - Porcentagem de embriões de *Euterpe oleracea* Mart. desenvolvidos *in vitro* sob efeito do estágio de maturação do fruto, em diferentes períodos de avaliação.



Legenda: SIG: Significativo.

As estimativas das diferenças dos contrastes de médias (frutos maduros e imaturos) do desenvolvimento de embriões de *E. oleracea* são mostradas na Tabela 3. A estimativa -1,516 representa a maior diferença entre as médias dos frutos maduros e imaturos (p -valor $< 0,05$), no dia 30, e o sinal negativo indica que a média dos frutos maduros foi inferior a dos imaturos.

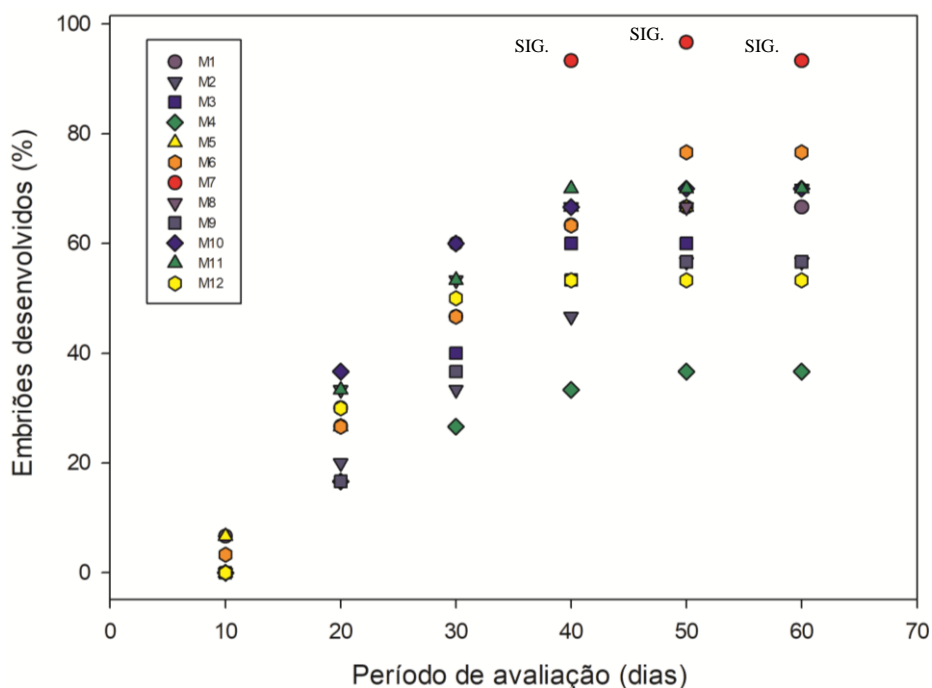
Tabela 3 - Estimativas das diferenças de contrastes de médias (frutos maduros Vs. frutos imaturos) da porcentagem de embriões desenvolvidos *in vitro* de *E. oleracea*, dentro de cada período de avaliação.

Dias	Estimativas	Desvio-padrão	p- valor
20	-1,429	0,2284	<0,0001*
30	-1,516	0,2436	<0,0001*
40	-1,097	0,2580	<0,0001*
50	-1,086	0,2645	<0,0001*
60	-1,128	0,2711	<0,0001*

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$) pelo teste MLG

A porcentagem de embriões desenvolvidos *in vitro* também foi significativamente influenciada pela composição do meio de cultivo, para as duas espécies de açaizeiros (Tabelas 4 e 5; Figuras 10 e 11). As maiores médias para embriões de *E. precatória* foram constatadas em meio M7 (formulação de Y3 + sacarose 87,64 mM), aos 40, 50 e 60 dias (Figura 10), enquanto menor desenvolvimento embrionário foi constatado em embriões cultivados em M11 (Y3 + glicose 131,46 mM). É relevante mencionar o reduzido desenvolvimento de embriões aos 10 dias *in vitro*, o que confirma uma morosidade do processo de desenvolvimento (de acordo ao critério utilizado para descrição do desenvolvimento do embrião) comparado à espécie *E. oleracea* (Figura 11).

Figura 11 - Porcentagem de embriões de *Euterpe precatoria* Mart. desenvolvidos *in vitro* sob efeito da composição do meio de cultura, em diferentes períodos de avaliação.



Legendas: M1 (MS + sacarose 87,64 mM); M2 (MS + sacarose 131,46 mM); M3 (MS + sacarose 175,28 mM); M4 (MS + glicose 87,64 mM); M5 (MS + glicose 131,46 mM); M6 (MS + glicose 175,28 mM); M7 (Y3 + sacarose 87,64 mM); M8 (Y3 + sacarose 131,46 mM); M9 (Y3 + sacarose 175,28 mM); M10 (Y3 + glicose 87,64 mM); M11 (Y3 + glicose 131,46 mM); M12 (Y3 + glicose 175,28 mM). SIG.: Significativo.

As estimativas das diferenças dos contrastes de médias (Vs. meio M7) para o desenvolvimento de *E. precatoria in vitro*, em cada período de avaliação, são mostradas na Tabela 4. Como é verificado, não houve efeito significativo do meio de cultura no desenvolvimento embrionário aos 20 dias; enquanto com 30 dias *in vitro*, apenas as composições de M2 e M4 diferiram estatisticamente do meio M7 (maior média). Aos 40, 50 e 60 dias de avaliação, todas as composições de meio de cultura diferiram do M7 ($p < 0,05$) com médias significativamente menores.

Tabela 4 – Estimativas das diferenças de contrastes de médias (composições dos meios de cultura Vs. o meio M7) do desenvolvimento de embriões de *E. precatoria*, dentro de cada período de avaliação (20, 30, 40, 50 e 60 dias).

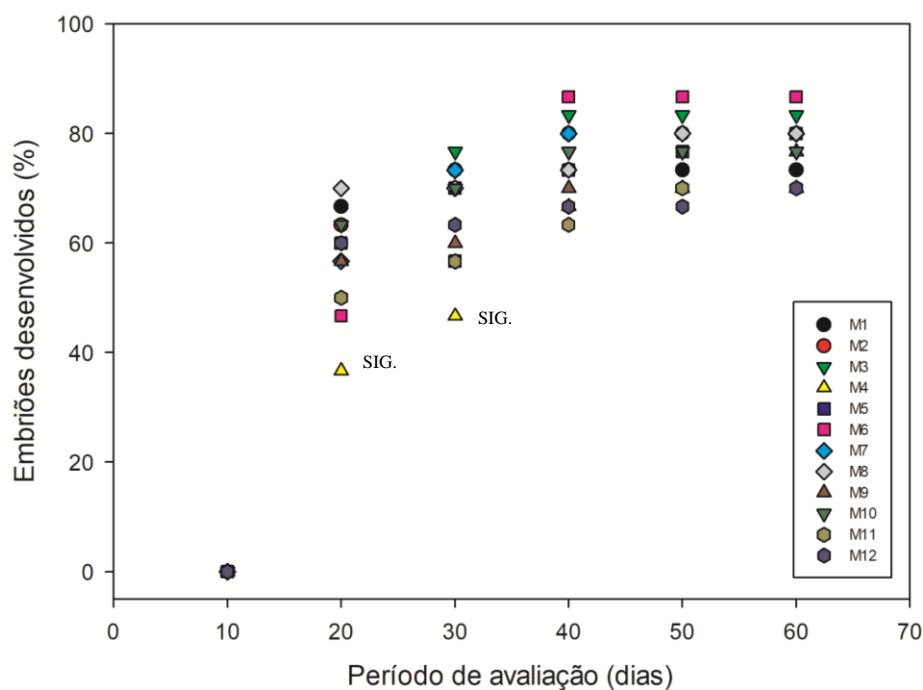
Composição do meio de cultura	Período de avaliação (dias)				
	20	30	40	50	60
M1	-0,1643 ^{ns}	-0,5390 ^{ns}	-2,093 [*]	-2,674 [*]	-1,946 [*]
M2	-0,5390 ^{ns}	-1,099 [*]	-2,773 [*]	-3,099 [*]	-2,371 [*]
M3	-0,7621 ^{ns}	-0,8109 ^{ns}	-2,234 [*]	-2,962 [*]	-2,371 [*]
M4	-0,7621 ^{ns}	-1,417 [*]	-3,332 [*]	-3,914 [*]	-3,186 [*]
M5	-0,1653 ^{ns}	-0,2719 ^{ns}	-1,946 [*]	-2,674 [*]	-1,792 [*]
M6	-0,1643 ^{ns}	-0,5390 ^{ns}	-2,093 [*]	-2,178 [*]	-1,449 ^{ns}
M8	0,1542 ^{ns}	-0,2719 ^{ns}	-1,946 [*]	-2,674 [*]	-1,792 [*]
M9	-0,7621 ^{ns}	-0,9520 ^{ns}	-2,506 [*]	-3,099 [*]	-2,371 [*]
M10	0,3008 ^{ns}	-<0,0001 ^{ns}	-1,946 [*]	-2,520 [*]	-1,792 [*]
M11	0,1542 ^{ns}	-0,2719 ^{ns}	-1,792 [*]	-2,520 [*]	-1,792 [*]
M12	-<0,0001 ^{ns}	-0,4055 ^{ns}	-2,506 [*]	-3,234 [*]	-2,506 [*]

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% (p<0,05) pelo teste MLG

Em que: M1 (MS + sacarose 87,64 mM); M2 (MS + sacarose 131,46 mM); M3 (MS + sacarose 175,28 mM); M4 (MS + glicose 87,64 mM); M5 (MS + glicose 131,46 mM); M6 (MS + glicose 175,28 mM); M7 (Y3 + sacarose 87,64 mM); M8 (Y3 + sacarose 131,46 mM); M9 (Y3 + sacarose 175,28 mM); M10 (Y3 + glicose 87,64 mM); M11 (Y3 + glicose 131,46 mM); M12 (Y3 + glicose 175,28 mM).

Semelhante ao verificado para *E. precatoria*, a espécie *E. oleracea* teve maior percentagem de embriões desenvolvidos aos 40, 50 e 60 dias do desenvolvimento *in vitro*. No entanto, diferente de *E. precatoria*, aos 20 dias de cultivo foi verificada alta percentagem de desenvolvimento (Figura 12). As maiores médias para desenvolvimento embrionário foram obtidas para embriões cultivados em meio M6 e M10, que não diferiram estatisticamente dos demais (Figura 12).

Figura 12 - Porcentagem de embriões de *Euterpe oleracea* Mart. desenvolvidos *in vitro* em função da composição do meio de cultura, em diferentes períodos de avaliação.



Legendas: M1 (MS + sacarose 87,64 mM); M2 (MS + sacarose 131,46 mM); M3 (MS + sacarose 175,28 mM); M4 (MS + glicose 87,64 mM); M5 (MS + glicose 131,46 mM); M6 (MS + glicose 175,28 mM); M7 (Y3 + sacarose 87,64 mM); M8 (Y3 + sacarose 131,46 mM); M9 (Y3 + sacarose 175,28 mM); M10 (Y3 + glicose 87,64 mM); M11 (Y3 + glicose 131,46 mM); M12 (Y3 + glicose 175,28 mM). SIG.: Significativo.

Diferente das respostas obtidas para *E. precatória*, para o qual o desenvolvimento de embriões foi significativamente influenciado a partir de 40 dias, em *E. oleracea* esse efeito significativo do meio de cultura ocorreu aos 20 dias, e para três contrastes aos 30 dias (Tabela 5). A partir de 40 dias de cultivo *in vitro* não foram constatadas diferenças entre M4 e as demais composições, até 60 dias de avaliação (Tabela 5).

Tabela 5 – Estimativas das diferenças de contrastes de médias (composição do meio de cultura Vs. o meio M4) do desenvolvimento de embriões de *E. oleracea in vitro*, dentro de cada período de avaliação (20, 30, 40, 50 e 60 dias).

Composição do meio de cultura	Período de avaliação (dias)				
	20	30	40	50	60
M1	1,240 *	1,145 *	0,3185 ^{ns}	0,1643 ^{ns}	0,1643 ^{ns}
M2	1,093 *	0,9808 ^{ns}	0,6931 ^{ns}	0,5390 ^{ns}	0,5390 ^{ns}
M3	1,093 *	1,323 *	0,9163 ^{ns}	0,7621 ^{ns}	0,7621 ^{ns}
M5	0,9520 ^{ns}	0,9808 ^{ns}	0,3185 ^{ns}	0,3423 ^{ns}	0,5390 ^{ns}
M6	0,4130 ^{ns}	0,4018 ^{ns}	1,179 ^{ns}	1,025 ^{ns}	1,025 ^{ns}
M7	0,8148 ^{ns}	1,145*	0,6931 ^{ns}	0,5390 ^{ns}	0,5390 ^{ns}
M8	1,394 *	0,9808 ^{ns}	0,3185 ^{ns}	0,5390 ^{ns}	0,5390 ^{ns}
M9	0,8148 ^{ns}	0,5390 ^{ns}	0,1542 ^{ns}	-<0,0001 ^{ns}	0,3423 ^{ns}
M10	1,093 *	0,9808 ^{ns}	0,4964 ^{ns}	0,3423 ^{ns}	0,3423 ^{ns}
M11	0,5465 ^{ns}	0,4018 ^{ns}	-0,1466 ^{ns}	-<0,0001 ^{ns}	<0,0001 ^{ns}
M12	0,9520 ^{ns}	0,6801 ^{ns}	<0,0001 ^{ns}	-0,1542 ^{ns}	<0,0001 ^{ns}

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$) pelo teste MLG.

Em que: M1 (MS + sacarose 87,64 mM); M2 (MS + sacarose 131,46 mM); M3 (MS + sacarose 175,28 mM); M4 (MS + glicose 87,64 mM); M5 (MS + glicose 131,46 mM); M6 (MS + glicose 175,28 mM); M7 (Y3 + sacarose 87,64 mM); M8 (Y3 + sacarose 131,46 mM); M9 (Y3 + sacarose 175,28 mM); M10 (Y3 + glicose 87,64 mM); M11 (Y3 + glicose 131,46 mM); M12 (Y3 + glicose 175,28 mM).

Altura de parte aérea (APA) de plantas de *E. precatoria* e *E. oleracea in vitro*, obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos sob efeito do estágio de maturação do fruto e/ou composição do meio de cultura

Efeito significativo da maturidade do fruto e/ou da composição do meio foram observados para a altura das plantas, que variou com a espécie e período de avaliação (Apêndice A, B, C e D). Houve interação ($p < 0,05$) somente para *E. precatoria* e 30 dias de avaliação, demonstrado que a altura da planta difere em função do meio (formulação e carboidrato) dentro de cada estágio de maturação do fruto (Tabela 6). Este resultado estar associado às diferenças observadas no desenvolvimento inicial dos embriões de *E. precatoria*.

O teste de agrupamento utilizado resultou em dois grupos de médias, para ambos estádios de maturação. Para embriões provenientes de frutos imaturos menor altura das plantas ($p < 0,05$) foi observada para no agrupamento composto por M3, M9 e M4. As demais composições (M1, M2, M5 a M8, e M10 a M12) proporcionaram plantas maiores ($p < 0,05$). Para frutos maduros, apesar da formação de dois grupos, houve maior

variabilidade em função da composição do meio. Além disso, embriões obtidos de frutos maduros produziram, de forma geral, plantas com altura significativamente maior (Tabela 6).

Tabela 6 - Agrupamento de médias para a altura de parte aérea (APA; mm) de plantas de *E. precatoria* Mart. obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos sob efeito da interação entre o estágio de maturação do fruto e a composição do meio de cultura, aos 30 dias *in vitro*.

Composição do meio de cultura		Estádio de maturação do fruto	
		Imaturo	Maduros
M10	(Y3+Glicose 87,64mM)	5,08 aA	3,88 aA
M8	(Y3+Sacarose 131,46 mM)	5,07 aA	1,00 bB
M7	(Y3+Sacarose 87,64mM)	4,86 aA	1,38 bB
M5	(MS+Glicose 131,46mM)	4,63 aA	2,33 bB
M11	(Y3+Glicose 131,46mM)	4,53 aA	3,60 aA
M1	(MS+Sacarose 87,64mM)	4,00 aA	3,00 aA
M2	(MS+Sacarose 131,46mM)	3,91 aA	2,00 bB
M6	(MS+Glicose 175,28mM)	3,91 aA	1,77 bB
M12	(Y3+Glicose 175,28mM)	3,63 aA	3,33 aA
M3	(MS+Sacarose 175,28mM)	3,25 bA	1,22 bB
M9	(Y3+Sacarose 175,28mM)	2,36 bA	2,14 bA
M4	(MS+Glicose 87,64mM)	2,22 bA	2,75 aA

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna (composição do meio) e maiúsculas na linha (estádio de maturação do fruto), pertencem ao mesmo grupo ($p < 0,05$) pelo teste Scott Knott

Quanto aos valores médios para APA, as maiores concentrações (131,46mM e 175,28mM), para ambos os tipos de carboidratos, reduziram a altura das plantas. A amplitude de variação para APA das plantas obtidas de embriões imaturos foi de 2,22 a 5,08, enquanto para embriões maduros variou de 1,0 a 3,88 mm.

Diferente do observado aos 30 dias, a APA de plantas de *E. precatoria* e *E. oleracea* (aos 30 e 60 dias) não foi significativamente influenciada pela interação entre o estágio de maturação do fruto e composição do meio (Tabelas 7 a 9; apêndices B e D). Para *E. precatoria*, plantas com 60 dias de cultivo tiveram maior parte aérea (18,49 mm) a partir de frutos imaturos, bem como quando cultivados em meio M1, M5, M7, M8 e M10, grupo que diferiu significativamente dos demais meios (Tabela 7).

Tabela 7 - Agrupamento de médias para a altura de parte aérea (APA; mm) de plantas de *E. precatoria* Mart. obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos sob efeito do estágio de maturação do fruto ou da composição do meio de cultura, aos 60 dias *in vitro*.

Estádio de maturação do fruto		Médias
Plantas obtidas de embrião de fruto imaturo		18,49 a
Plantas obtidas de embrião de fruto maduro		13,41 b
Composição do meio de cultura		Médias
M8	(Y3+Sacarose 131,46 mM)	21,47 a
M10	(Y3+Glicose 87,64mM)	18,59 a
M5	(MS+Glicose 131,46mM)	18,04 a
M7	(Y3+Sacarose 87,64mM)	17,85 a
M1	(MS+Sacarose 87,64mM)	16,87 a
M2	(MS+Sacarose 131,46mM)	15,80 b
M11	(Y3+Glicose 131,46mM)	15,79 b
M4	(MS+Glicose 87,64mM)	15,17 b
M6	(MS+Glicose 175,28mM)	14,44 b
M9	(Y3+Sacarose 175,28mM)	13,19 b
M12	(Y3+Glicose 175,28mM)	12,88 b
M3	(MS+Sacarose 175,28mM)	11,64 b

Médias seguidas da mesma letra pertencem ao mesmo grupo ($p < 0,05$) pelo teste Scott Knott.

Semelhante ao observado para APA de *E. precatoria* aos 60 dias *in vitro*, plantas de *E. oleracea* tiveram maior altura de parte aérea ($p < 0,05$) para embriões imaturos e quando desenvolvidos nas composições M7, M8, M10, M11 e M12 (grupo 1), em ambos períodos de avaliação (Tabelas 8 e 9). Menor APA foi verificada quando a formulação de MS foi suplementada com 175,28 mM de sacarose ou glicose, independente da maturidade do fruto (Tabela 8).

Tabela 8 - Agrupamento de médias para a altura de parte aérea (APA; mm) de plantas de *E. oleracea* obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos em função do estágio de maturação do fruto ou da composição do meio de cultura, aos 30 dias *in vitro*.

Estádio de maturação do fruto		Médias
Plantas obtidas de embrião de fruto imaturo		11,40 a
Plantas obtidas de embrião de fruto maduro		7,15 b
Composição do meio de cultura		Médias
M8	(Y3+Sacarose 131,46 mM)	13,37 a
M12	(Y3+Glicose 175,28mM)	10,97 a
M10	(Y3+Glicose 87,64mM)	10,91 a
M11	(Y3+Glicose 131,46mM)	10,73 a
M7	(Y3+Sacarose 87,64mM)	10,30 a
M9	(Y3+Sacarose 175,28mM)	9,18 b
M5	(MS+Glicose 131,46mM)	8,77 b
M1	(MS+Sacarose 87,64mM)	7,91 b
M2	(MS+Sacarose 131,46mM)	7,58 b
M4	(MS+Glicose 87,64mM)	7,37 b
M3	(MS+Sacarose 175,28mM)	6,02 b
M6	(MS+Glicose 175,28mM)	6,00 b

Médias seguidas da mesma letra pertencem ao mesmo grupo ($p < 0,05$) pelo teste Scott Knott.

Observou-se, maior média (47,89 mm) aos 60 dias em plantas provenientes de frutos imaturos com diferença estatística significativa em relação as plantas provenientes de frutos maduros que apresentaram uma média de 36,45 mm de APA (Tabela 9).

Tabela 9 – Agrupamento de médias para a altura de parte aérea (APA; mm) de plantas de *E. oleracea* obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos em função do estágio de maturação do fruto ou da composição do meio de cultura, aos 60 dias *in vitro*.

Estádio de maturação do fruto		Médias
Plantas obtidas de embrião de fruto imaturo		47,89 a
Plantas obtidas de embrião de fruto maduro		36,45 b
Composição do meio de cultivo		Médias
M8	(Y3 + Sacarose 131,46 mM)	64,66 a
M7	(Y3 + Sacarose 87,64 mM)	58,33 a
M11	(Y3 + Glicose 131,46 mM)	56,33 a
M12	(Y3 + Glicose 175,28 mM)	52,33 a
M10	(Y3 + Glicose 87,64 mM)	51,65 a
M9	(Y3 + Sacarose 175,28 mM)	46,91 a
M5	(MS + Glicose 131,46 mM)	38,62 b
M2	(MS + Sacarose 131,46 mM)	35,73 b
M1	(MS + Sacarose 87,64 mM)	30,18 b
M4	(MS + Glicose 87,64 mM)	29,42 b
M3	(MS + Sacarose 175,28 mM)	28,20 b
M6	(MS + Glicose 175,28 mM)	24,61 b

Médias seguidas da mesma letra pertencem ao mesmo grupo ($p < 0,05$) pelo teste Scott Knott.

Embora não comparadas estatisticamente, as plantas de *E. oleracea* sempre tiveram maior APA, independente da maturação do fruto, composição do meio de cultura e período de avaliação. Este resultado demonstra o maior desenvolvimento do embrião e posterior crescimento da planta jovem.

Número de raízes (NR) de plantas de *E. precatoria* e *E. oleracea* obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos sob efeito do estágio de maturação do fruto e composição do meio de cultura

Utilizando o Modelo Linear Generalizado (MLG), analisou-se a covariável número de raízes para a espécie *E. precatoria*. Observando que não existe interação estatística entre os dois fatores: Estádio de maturação e Composição do meio (Apêndice E). Dessa forma, analisaram-se os efeitos principais par cada fator separadamente.

Os valores médios desta espécie foram de 2 para fruto imaturo e 1,7 para fruto maduro. Para saber se tinha diferença estatística analisou-se o efeito do fator 1 que apresentou diferença estatística significativa entre os estádios de maturação. O valor

(-0,1590) representa a diferença estimativa de NR de plantas para os frutos maduros em relação as plantas de frutos imaturos (Apêndice F). Enquanto, na Tabela 10, apresenta os resultados das comparações, duas a duas, dos 12 níveis do Fator 2. Apresentando 34 diferenças estatísticas significativas entre as composições dos meios de cultura. Entre as quais, 30 são diferenças positivas, por exemplo, 1,175 indicando que na comparação do meio M8 em relação ao M4, em média, o nível M8 (Y3+Sacarose 131,46 mM) tem maior NR do que M4.

Tabela 10 - Comparação das estimativas do número total de raízes (NR) de plantas de *Euterpe precatoria* Mart. obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos em função da composição do meio de cultura, aos 60 dias *in vitro*.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
X	1,41	1,19	1,94	0,88	1,60	1,40	2,14	2,85	2,23	2,22	1,91	2,58
M1	-	-0,173 ^{ns}	0,314 ^{ns}	-0,473*	-0,127 ^{ns}	-0,011 ^{ns}	0,413*	0,701*	0,457*	0,452*	0,302 ^{ns}	0,602*
M2	-	-	-0,488*	-0,299 ^{ns}	0,301 ^{ns}	0,162 ^{ns}	0,587*	0,875*	0,631*	0,626*	0,476*	0,776*
M3	-	-	-	-0,788*	-0,187 ^{ns}	-0,326 ^{ns}	0,098 ^{ns}	0,386*	0,142 ^{ns}	0,137 ^{ns}	-0,012 ^{ns}	0,287 ^{ns}
M4	-	-	-	-	0,600*	0,461*	0,887*	1,175*	0,930*	0,925*	0,775*	1,076*
M5	-	-	-	-	-	-0,139 ^{ns}	0,286 ^{ns}	0,574*	0,330*	0,325*	0,175 ^{ns}	0,475*
M6	-	-	-	-	-	-	0,425*	0,713*	0,469*	0,464*	0,314 ^{ns}	0,614*
M7	-	-	-	-	-	-	-	0,287*	0,043 ^{ns}	0,038 ^{ns}	-0,111 ^{ns}	0,188 ^{ns}
M8	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,244 ^{ns}	-0,249 ^{ns}	-0,399*	-0,098 ^{ns}
M9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,004 ^{ns}	-0,155 ^{ns}	0,145 ^{ns}
M10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,150 ^{ns}	0,150 ^{ns}
M11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,300 ^{ns}
M12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$)

Para a espécie *E. oleracea* Mart., utilizando o MLG (Apêndice G). Observa-se que a interação entre os dois fatores (F1 x F2) não foi significativa conforme p-valor > 5%. Nesse sentido, analisou-se os efeitos principais dos fatores separadamente. O fator 1 apresenta valores médios de 3,67 NR de frutos imaturos e 2,94 NR de frutos maduros. Para verificar se a diferença foi significativa determinou-se o valor da diferença entre as médias dos frutos maduros (-0,22291) em relação aos frutos imaturos. Tal diferença estatística foi significativa entre os estádios de maturação (Apêndice H).

Na Tabela 11 se observam os resultados das comparações, duas a duas, dos 12 níveis do fator 2. Encontrando 12 diferenças estatísticas positivas entre as composições

dos meios de cultura, dentre as quais a composição do meio M8 (Y3+Sacarose 131,46 mM) apresenta maior quantidade em relação as demais composições de meio. Com maior valor médio, 4 NR, em relação as demais composições de meio.

Tabela 11 - Comparação das estimativas do número total de raízes (NR) de plantas de *Euterpe oleracea* Mart. obtidas do desenvolvimento de embriões zigóticos em função da composição do meio de cultura, aos 60 dias *in vitro*.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
X	2,18	3,34	3,2	2,76	3,33	2,92	3,41	4,08	3,86	3,47	3,23	3,76
M1	-	0,172 ^{ns}	0,127 ^{ns}	-0,020 ^{ns}	0,167 ^{ns}	0,036 ^{ns}	0,192 ^{ns}	0,370*	0,317*	0,210 ^{ns}	0,138 ^{ns}	0,288*
M2	-	-	-0,045 ^{ns}	-0,192 ^{ns}	-0,004 ^{ns}	-0,135 ^{ns}	0,020 ^{ns}	0,198*	0,144 ^{ns}	0,038 ^{ns}	-0,033 ^{ns}	0,116 ^{ns}
M3	-	-	-	-0,147 ^{ns}	0,040 ^{ns}	-0,090 ^{ns}	0,065 ^{ns}	0,243*	0,189 ^{ns}	0,083 ^{ns}	0,011 ^{ns}	0,161 ^{ns}
M4	-	-	-	-	0,188 ^{ns}	0,056 ^{ns}	0,212 ^{ns}	0,390*	0,337*	0,230*	0,159 ^{ns}	0,309*
M5	-	-	-	-	-	-0,131 ^{ns}	0,024 ^{ns}	0,202*	0,149 ^{ns}	0,042 ^{ns}	-0,028 ^{ns}	0,120 ^{ns}
M6	-	-	-	-	-	-	0,156 ^{ns}	0,334*	0,280 ^{ns}	0,173 ^{ns}	0,102 ^{ns}	0,252*
M7	-	-	-	-	-	-	-	0,178 ^{ns}	0,124 ^{ns}	0,017 ^{ns}	-0,053 ^{ns}	0,096 ^{ns}
M8	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,053 ^{ns}	-0,160 ^{ns}	-0,231 ^{ns}	-0,081 ^{ns}
M9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,106 ^{ns}	-0,178 ^{ns}	-0,028 ^{ns}
M10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,071 ^{ns}	0,078 ^{ns}
M11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,149 ^{ns}
M12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1 Aspectos gerais do desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos e de plantas jovens *in vitro* de *E. precatória* e *E. oleracea*

Existe grande similaridade entre o desenvolvimento *in vitro* do embrião zigótico de *Euterpe precatória* e *E. oleracea* e outras palmeiras como *Euterpe edulis* (SALDANHA; MARTINS-CORDES, 2012) e *Acrocomia aculeata* (RIBEIRO et al., 2012). Todavia, algumas diferenças são verificadas em relação à orientação do eixo embrionário, alongamento do pecíolo cotiledonar (PC) e cor de estruturas como o haustório (MAZZOTTINI-DOS-SANTOS et al., 2017).

No presente estudo, o embrião das espécies de *Euterpe* estudadas apresentou a formação de estruturas características, conforme relatado para *E. oleracea in vitro* (Ledo et al., 2001) e *E. precatória in vivo* (germinação de sementes) (AGUIAR; MENDONÇA, 2003). Conforme verificado por Ledo et al. (2001), embriões de *E. oleracea* extraídos de frutos maduros e cultivados em meio MS modificado (0,17 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄, ágar 0,6 %, carvão ativado 0,25, sacarose 3 %, acrescido de ANA e BAP) apresentaram intumescimento, início da expansão da lâmina cotiledonar basal, ou somente haustório, na primeira semana do estabelecimento *in vitro*. Além disso, o haustório teve coloração branca e consistência esponjosa, e a emissão da radícula foi observada aos 14 dias.

Com relação a espécie *E. precatória* Mart, não há estudos sobre o desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*. Há somente um relato sobre a determinação de protocolo de assepsia a partir de embrião zigótico e segmentos foliares (BATISTA et al., 2017), assim como um relato sobre a caracterização morfoanatômica do embrião durante o processo germinativo da semente *in vivo* (AGUIAR; MENDONÇA, 2003).

O haustório é característico do desenvolvimento embrionário em palmeiras, sendo uma estrutura altamente especializada e crucial à germinação de sementes e formação da planta. Em *E. precatória* foi constatada mudança na morfologia, cor e tamanho do haustório, no período de 20 até 60 dias *in vitro*, que ao final deste período, apresentou característica rugosa, forma ovoide alongada, cor branca a roxa. Mazzottini-dos-Santos et al. (2017) concluíram que o haustório é uma estrutura multifuncional,

desempenhando importante papel no controle da mobilização de reservas, absorção, conversão de compostos, e transporte de produtos hidrolizados em *Acrocomia aculeata*.

6.2 Desenvolvimento de embriões zigóticos e crescimento inicial de plantas *in vitro* de *E. precatória* e *E. oleracea* em função da maturação do fruto e composição do meio de cultura

As diferenças observadas no desenvolvimento dos embriões e crescimento inicial de plantas *in vitro* indicam a importância e necessidade de definir o estágio de maturação do fruto mais adequado à obtenção do embrião zigótico, bem como a composição do meio de cultura que permita o melhor desenvolvimento do embrião e formação de plantas *in vitro* com boa qualidade. O meio de cultura proposto por Murashige e Skoog (1962) é utilizado com sucesso para o cultivo *in vitro* de várias espécies de Arecaceae, e o mais amplamente aplicado aos estudos de fisiologia do desenvolvimento vegetal *in vitro*. Ao contrário do meio MS, a formulação de Y3 foi desenvolvida para *Cocos nucifera*, especificamente para atender o crescimento e iniciação de calos obtidos de tecidos maduros da referida palmeira (EEUWENS, 1976). Comparada à formulação de MS, o meio Y3 contém 40 mM de potássio (MS: 20 mM), 2,0 mM de H₂PO₄ (MS: 1,25 mM), 34 mM de Cloreto (MS: 6 mM); bem como menor concentração de Ca²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺, NO₃⁻, SO₄²⁻.

Desde o desenvolvimento do meio Y3, várias espécies de Arecaceae são cultivadas *in vitro* com sucesso, e resultados superiores são observados comparados à formulação de Murashige e Skoog (WALDOW et al., 2013; PÁDUA et al., 2014; BONETTI et al., 2016; LUIS; LÉDO et al., 2017; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2017). No que concerne ao resgate de embriões zigóticos, ou sua utilização para obtenção de plantas assépticas, a formulação de Y3 também proporciona resultados superiores.

Estudos prévios demonstram a influência significativa de fatores como o genótipo, maturidade do embrião e composição do meio de cultura sobre o desenvolvimento (“germinação”) *in vitro* de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* var. Sri Lankan (VIDHANAARACHCHI et al., 2016), *Elaeis guineensis* Jacq. híbrido Manicoré (PÁDUA et al., 2013) e *Euterpe edulis* Martius (SALDANHA et al., 2012).

Segundo Ledo et al. (2001), embriões de *E. oleracea* obtidos de frutos maduros apresentaram conversão em plantas quando cultivados em meio MS modificado (0,17

g.L⁻¹ de NaH₂PO₄, ágar 0,6 %, carvão ativado 0,25, sacarose 3 %), acrescido de ANA e BAP. Adicionalmente, a suplementação do meio com ANA e BAP promoveu resultados superiores à testemunha para todas as variáveis avaliadas. Entretanto, os autores não verificaram diferenças significativas entre as concentrações de ANA e BAP para a percentagem de conversão de embriões e número de raízes por planta. Na presente pesquisa, os meios de cultura não foram suplementados com fitorreguladores, sendo obtida alta porcentagem de embriões desenvolvidos, para frutos imaturos e maduros.

Utilizando embriões imaturos de *Euterpe edulis*, Saldanha e Martins-Corder (2012) tiveram 74% de embriões desenvolvidos (germinados), alcançando até 80% em meio MS (50% das concentrações de nutrientes minerais) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, e MS adicionado de 40 g.L⁻¹. Apesar do incremento da concentração de sacarose no meio MS resultar em maior porcentagem de desenvolvimento, os referidos autores não constataram efeito significativo. Todavia, a altura das plantas e a massa fresca tiveram dependência ($p < 0,05$) da concentração de sacarose. Já Waldow et al. (2013) recomendaram as formulações de MS e Y3 para cultura de embriões zigóticos de *Butia eriophata*.

O melhor desenvolvimento *in vitro* verificado em embriões de frutos imaturos (esverdeados) é interessante em termos de praticidade laboratorial, notadamente para a espécie *E. precatória* que apresenta endosperma com maior dureza. Dessa forma, a utilização de frutos imaturos tem potencial de facilitar a extração do embrião com menores riscos por injúrias mecânicas e redução do número de plantas anormais. Ribeiro et al. (2012) afirmam que o grau intermediário de diferenciação do embrião de Macaúba (*Acrocomia aculeata*) não restringe seu desenvolvimento *in vitro*, o que associam a ausência de dormência morfológica.

Um dos fatores que influencia o cultivo *in vitro* de embriões é o grau de diferenciação dos tecidos, que é menor em embriões imaturos (HARTMANN et al., 1992; COCUCCI; MARIATH, 2004). No entanto em nosso estudo o estágio de maturação apresentou diferenças significativas, apresentando maiores valores de germinação quando se utilizou embriões obtidos de frutos imaturos, para ambas as espécies (*E. precatória* e *E. oleracea*).

As diferenças observadas no desenvolvimento *in vitro* dos embriões das espécies estudadas, em função da maturidade do fruto ou composição do meio, tiveram

influência significativa no crescimento das plantas, aos 30 e 60 dias de avaliação. Segundo Saldanha e Martins-Corder (2012) plantas de *E. edulis* totalmente desenvolvidas foram obtidas depois de 120 dias do estabelecimento *in vitro* dos embriões imaturos.

A importância dos carboidratos é reportada por Bewley et al. (2013), que afirmam ser as principais reservas da maioria das sementes de plantas cultivadas. Acrescentam também que dissacarídeos como a sacarose são os mais comuns açúcares livres presentes, sendo importantes para o embrião como uma fonte de substrato para a respiração durante a germinação de sementes e posterior crescimento da planta.

Avaliando o estágio de maturação do fruto e a sacarose sobre o cultivo *in vitro* de embriões de murmuru (*Astrocaryum ulei* Burret.), Pereira et al. (2006) observaram maior germinação (85,9%) quando embriões imaturos, obtidos de frutos com epicarpo esverdeado, foram cultivados em meio MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose. Já embriões extraídos de frutos maduros tiveram 41,3% de desenvolvimento *in vitro* com 15 g.L⁻¹ de sacarose. Para *Butia capitata* Neves et al. (2010) verificaram que sementes com maior grau de maturação resultaram em redução da oxidação e maior desenvolvimento *in vitro* do embrião (aumento no alongamento do pecíolo cotiledonar), bem como plantas com maior emissão de raízes e de bainhas foliares.

Ainda segundo Neves e colaboradores embriões obtidos de sementes imaturas foram mais oxidados, restringindo o desenvolvimento embrionário e sua conversão em plantas jovens. Entretanto no presente trabalho para *E. precatória* apresentou 1,67% de oxidação para os dois estádios de maturação, e para *E. oleracea* 0,56% de oxidação para frutos imaturos e 2,22% de oxidação para frutos de maduros (Apêndice K).

Hu e Ferreira (1998) afirmam que embriões imaturos podem desenvolver *in vitro*, porém, demandam maior quantidade de substâncias orgânicas, especialmente sacarose. Na presente pesquisa, a espécie *E. precatória* teve maior porcentagem de embriões imaturos desenvolvidos (96,6%) quando cultivados em meio M7 (Y3 + Sacarose 87,64 mM) (Anexo 4). Comportamento não observado para embriões de *E. oleracea* aos 60 dias *in vitro*, para os quais a composição do meio de cultivo não influenciou significativamente o seu desenvolvimento (Tabela 5, Figura 12).

Embora não comparadas estatisticamente, as espécies estudadas no presente trabalho apresentaram diferenças na formação de estruturas como a plúmula, haustório e emissão de eófilos, o que é visualizado na Figura 8. Em geral, *E. precatoria* teve desenvolvimento e crescimento de plantas jovens mais lentos.

7. CONCLUSÕES

- Embriões de *E. precatória* e *E. oleracea* Mart., obtidos de frutos imaturos, apresentam maior porcentagem de desenvolvimento e melhor formação de plantas *in vitro*.
- O meio de cultura composto pela formulação de Y3 suplementado com 87,64 mM de sacarose promove maior porcentagem de desenvolvimento de embriões de *E. precatória*.
- A formulação de Y3 ou de MS, acrescidas de 87,64 mM ou 131,46 mM de sacarose ou glicose, proporcionam maior altura e número de raízes das plantas de *E. precatória*.
- O desenvolvimento de embriões de *E. oleracea in vitro* não é influenciado pela composição dos meios avaliados. Para essa espécie, recomenda-se utilizar a formulação de Y3 com 87,64 mM ou 131,46 mM de Sacarose, por apresentar boa conversão de plantas jovens e maior altura de parte aérea e número de raízes.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. O.; MENDONÇA, M. S. Aspectos morfológicos da germinação e do desenvolvimento plantular em *Euterpe precatoria* Mart. (açai-do Amazonas). **Acta Amazônica**, v. 31, n. 4, p. 687-691, 2001.
- AGUIAR, M. O.; MENDONÇA, M. S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* Mart. (Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**. v. 25, no 1, p. 37-42. 2003.
- ALEXANDRE, D.; CUNHA, R. L.; HUBINGER, M. D. Conservação do açai pela tecnologia de obstáculos. **Ciência e tecnologia de Alimentos**. v. 24, no 1, p. 114-119. 2004.
- ALVES, M.R.P.; DEMATTÊ, M.E.S.P. Palmeiras: características botânicas e evolução. Campinas: **Fundação Cargill**, 129p. 1987.
- ANDRADE, C.S.; PEREIRA, T.S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmitero (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 10, p. 987-991. 1997.
- ARAÚJO, E.F; SILVA, R.F.; ARAÚJO, R.F. Avaliação da qualidade de sementes de açai armazenadas em diferentes embalagens e ambientes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília. v. 16, n.1, p.76-79. 1994.
- BALICK, M.J. The use of palms by the Apinayé and Guajajara Indians of Northeastern Brazil. In: BALICK, M.J., ed. The palm- tree of life: biology, utilization and conservation. **Advances in Economical Botany**, New York, v. 6, p. 65-90, 1986a.
- BALICK, M.J. Palms and development in the humid tropics. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1. Belém, 1984. Anais...Belém: Embrapa-CPATU, v, 6, p.121-140, 1986b.
- BASKIN C. C.; BASKIN J. M. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research** 14, 1–16, 2004.
- BASKIN J. M., BASKIN, C.C. What kind of seed dormancy might palms have?. **Seed Science Research**. v. 24, no 1, p. 17-22, 2014a.
- BASKIN C. C.; BASKIN J. M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. 2. Ed. Academic Press. San Diego, CA, USA. 2014b.
- BATISTA, B. N.; RAPOSO, N. V. M.; LIBERATO, M. A. R. Determinação do protocolo de assepsia para reprodução *in vitro* de *Euterpe precatoria* MART. **Revista Fitos**, v. 11, n. 1, p. 40-47, 2017.
- BELIN-DEPOUX, M.; HERING DE QUEIROZ, M. Contribution à l'étude ontogénique des palmiers. Quelques aspects de la germination de *Euterpe edulis* Mart. **Revue generale de botanique**. v. 78, p. 339-71, 1971.

BENTES, E. S.; HOMMA, A. K.; DOS SANTOS, C. A. N. Exportações de polpa de açaí do estado do Pará: situação atual e perspectivas. Em Embrapa Amazônia Oriental- Artigo em **anais** de congresso (ALICE). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 55. 2017, Santa Maria, RS. Inovação, extensão e cooperação para o desenvolvimento. Brasília, DF: SOBER, 2017.

BERNAUD, R. F. S.; FUNCHAL, C. D. S. Atividade antioxidante do açaí. **Nutrição Brasil**, v. 10, no 5, p. 310-316, 2011.

BEWLEY, J. D, et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer Science & Business Media, 2012. p. 2012 – 392.

BONETTI, Keila AP, et al. In vitro germination of zygotic embryos of hybrid BRS Manicoré (*E. guineensis* X *E. oleifera*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, no 3, p. 1841-1850, 2016.

BRIDGEN, M. P. A review of plant embryo culture. **HortScience**. v. 29, n. 11, p. 1243-1245, 1994.

BROSCHAT, T. K. Palm seed propagation. **Acta Horticulturae**, v.1, n.360, p.141-147, 1994.

CAVALCANTE, P. Frutas comestíveis da Amazônia. Belém: CEJUP. p. 271, 1991.

CALZAVARA, B.B.G. **As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico**. Boletim da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 5. Belém: FCAP. 103p. 1972.

CARVALHO, J. E. U. de; NASCIMENTO, W. M. O. do. Inovações tecnológicas na propagação do açaí e do bacuri. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 40, n. 1, p. 679, 2018.

CASTRO, A. O extrativismo do açaí no Amazonas. Relatório de Resultados do Projeto de Pesquisa: Extrativismo na Amazônia Central, viabilidade e desenvolvimento. Convênio INPA CNPq/ORSTOM, Manaus. p. 95, 1992.

CEMBRANELI, F.; VIEIRA FISCH, S. T.; PEREIRA DE CARVALHO, C. Exploração sustentável da palmeira *Euterpe edulis* Mart. no bioma Mata Atlântica, Vale do Paraíba-SP. **Revista Ceres**, v. 56, no 3. 2009.

CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R. Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests. Rome: Food and agriculture organization of the united nations, 1993.

CLEMENT, C. R.; LLERAS, E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociência**. v. 9, no 1-2, p. 67-71, 2005.

COCUCCI A. E., MARIATH, J. E. A. Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed Porto Alegre, Brasil. p. 15-30, 2004.

COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. **Informativo Abrates**, v.18, n.1, p.39-50, 2008.

COSTA, C. R. X. **Temperatura, luz e tolerância à dessecação na germinação de sementes de Açaí-do-Amazonas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

DI RIENZO, J. A.; MACCHIAVELLI, R.; F. CASANOVES. Modelos Lineales Generalizados Mixtos, aplicaciones en InfoStat. Córdoba, Argentina. 2017.

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.

ENGELMANN, F.; MALAURIE, B.; N'NAN, O. In vitro culture of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos. In Thorpe T., Yeung E. (eds.) **Plant embryo culture: methods and protocols**. Humana Press, Methods in Molecular Biology, New York, p.63-72. 2011.

FERREIRA DO NASCIMENTO, S. A.; GENTIL DE OLIVEIRA, D. F. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). **Acta Amazônica**. 36 (2006) , p. 141 – 146, 2006.

FINCH-SAVAGE W.E.; LEUBNER-METZGER G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist** vol. 171, no 3, p. 501–523. 2006.

FIOR C. S.; LEONHARDT C.; S.F. SCHWARZ. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**. v. 41, no 7, p. 1150-1153, 2011.

FUENTES G. et al. Exogenous sucrose can decrease in vitro photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, no 1, p. 69-76, 2005.

FREITAS, E. O. **Embriogênese somática e analytics morfoanatômicas e por citometria de fluxo em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.)**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

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

GALEANO, G.; BERNAL, R. **Palmas de Colombia**. Guia de campo. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia. 688 p. 2010.

GARCÍA, J. L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, p. 95-100, 2002.

GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart.(Palmae). **Plant cell reports**, v. 7, no 7, p. 550-552, 1988.

HASLAM, T. M.; YEUNG, E. C. Zygotic embryo culture: an overview. In Thorpe T., Yeung E. (eds.) **Plant embryo culture: methods and protocols**. Humana Press, Methods in Molecular Biology, New York, p. 3-15, 2011.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagación de plantas: principios y prácticas**. Compañía Editorial Continental. p. 760, 1992.

HENDERSON, A. **The palms of the Amazon**. Oxford: University Press, p. 362, 1995.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. Euterpe, Prestoea, and Neonicholsonia (Palmae). **Flora Neotropica**, New York: New York Botanical Garden, p. 1-89, 1996.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palms of the Americas**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. p. 352, 1995.

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

KHAN, F. Ecology of economically important palms in peruvian Amazonia. In: BALICK, M.J., ed. The palm- tree of life: biology, utilization and conservation. **Advances in Economical Botany**, New York, v. 6, p. 42-49, 1986.

KÜCHMEISTER, H.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. Flowering, pollination, nectar standing crop, and nectaries of *Euterpe precatória* (Arecaceae), an Amazonian rain forest palm. **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, no 1-4, p. 71-97, 1997.

LEDO, A. S. et al. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LEDO, A. S., et al. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.

LÉDO, A. S., et al. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 42, no 2, p. 147-154, 2007.

LÉDO, A. S., et al. Strategies for exchange of coconut germplasm in Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, no 3. 2017.

LEITMAN, P. et al. Arecaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB15713>)

LORENZI, H. et al. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Nova Odessa: **Plantarum**, p. 416, 2004.

LORENZI H.; NOBLICK L. R.; KAHN F.; FERREIRA E. **Flora Brasileira Lorenzi: Arecaceae (Palmeiras)**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, Brazil. 2010.

LUIS, 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. **CryoLetters**, v. 38, p. 7-16, 2017.

MACEDO, M. **Contribuição ao estudo de plantas econômicas no Estado de Mato Grosso**. Cuiabá: UFMT, p.70, 1995.

MALDANER, J. et al. Sacarose e nitrogênio na multiplicação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, no 4, p. 1201-1206, 2006.

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, no 4, p. 1563-1578, 2017.

MARTINS, C. C.; DA SILVA, W. R.; BOVI, M. L. A. Tratamentos pré-germinativos de sementes da palmeira inajá. **Bragantia**, v. 55, no 1, p. 123-128, 1996.

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Tolerância à dessecação de sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes). **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo. v. 22, n. 3, p. 125-132, 1999.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Binary data. En Generalized linear models**. Springer US, p. 98-148. 1989.

MINARDI, B. D. et al. Cultivo in vitro de embriões zigóticos de *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc. **INSULA Revista de Botânica**, no 40, p. 70. 2011.

MEDEIROS, M. J., et al. Ecophysiological, anatomical and biochemical aspects of in vitro culture of zygotic *Syagrus coronata*. **Trees**, v. 29, no 4, p. 1219-1233, 2015.

MENEZES, E. et al. Preferences and attitudes towards açai-based products among North American consumers. **Food Research International**, v. 44, no 7, p. 1997-2008, 2011.

MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: Thorpe T A (eds) Embryogenesis in vitro em plantas. Atual Plant Science e Biotechnology in Agriculture, Springer, Dordrecht. v. 20, p. 117-153, 1995.

MUÑIZ-MIRET, N. et al. The economic value of managing the açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) in the flood plains of the Amazon estuary, Pará, Brazil. **Forest Ecology and Management**. v. 87, no 1-3, p. 163-173, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-797, 1962.

NAGAO, M. A.; KANEGAWA K.; W. S. SAKAI. Accelerating palm seed germination with gibberellic acid, scarification, and bottom heat. **HortScience**. v. 15, no 2, p. 200-201, 1980.

NASCIMENTO, W. M. O. **Açai** *Euterpe oleracea*. **Mart.** Inf. Téc. Rede Sementes Amazônia, v. 18, p. 1-2, 2008.

NASCIMENTO, W. M. O. da; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D. L. Conservation of *Euterpe oleracea* seeds. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 32, no 1, p. 24-33, 2010.

NASCIMENTO, W. M. O. do; MORAES, M. H. D. Fungos associados a sementes de açai: efeito da temperatura e do teor de água das sementes durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina. v. 33, n. 3, p. 415-425, 2011.

NEVES, C. S. et al. Germinação *in vitro* de embriões de coquinho-azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc.(Arecaceae)] obtidos de frutos com diferentes graus de maturação. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 7, no 1, p. 47-54, 2010.

NEVES, C. S. et al. Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*). *Flora*. v. 208, no 1, p. 68-78, 2013.

NOGUEIRA, O. L. **A cultura do açai**. Belém: Embrapa–SPI/CPAF Amazônia Oriental. 50 p. (Coleção Plantar). 1995.

NOGUEIRA, O. L. **Regeneração, manejo e exploração de açazais nativos de várzea do estuário amazônico**. 1997. (Tese de Doutorado). UFPA. Belém.

NOGUEIRA, O. L.; FIGUEREDO, J. F. C.; MÜLLER, A. A. (Ed.) **Açai**. Belém,PA: Embrapa Amazônia Oriental 137 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Sistema de produção 4), 2005.

OLIVEIRA, M. S. P. de. **Melhoramento genético do açazeiro na Amazônia Oriental**. 15p. (apostila). 1998.

OLIVEIRA, M. S.; PADILHA, M. M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de açazeiro. **Acta Botanica Brasílica**, v. 15, n. 1, p. 27-33, 2001.

- OROZCO-SEGOVIA, A. et al. **Seed biology of palms: a review**. *Palms*, v. 47, no 2, p. 79-94, 2003.
- PÁDUA, M. S., et al. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, no 4, p. 1545-1556, 2013.
- 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.
- PEREIRA, J. E. S. et al. Germinação in vitro de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, no 2, p. 251-256, 2006.
- PÉREZ, H. E.; CRILEY, R. A.; BASKIN, C. C. Promoting germination in dormant seeds of *Pritchardia remota* (Kuntze) Beck., an endangered palm endemic to Hawaii. **Natural Areas Journal**. v. 28, no 3, p. 251-260, 2008.
- PECH Y AKÉ, A. E., et al. Enhanced aerobic respiration improves in vitro coconut embryo germination and culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. v. 40, no 1, p. 90-94, 2004.
- PINHEIRO C. B. Germination strategies of palms: the case of *Schippia concolor* Burret in Belize. **Brittonia**, v. 53, no 4, p. 519-527. 2001.
- PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos benéficos do açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5, no 1, p. 15-20, 2012.
- RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. v. 39, no 5, p. 437-442, 2003.
- RIBEIRO, V. G. et al. Cultivo *in vitro* de embriões de Laranja Pêra: concentrações do meio MS e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n. 4, p. 429-434, 1998.
- RIBEIRO L. M., et al. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as bio-fuel. **Seed Science and Technology**. v. 39, no 2, p. 303-317, 2011.
- RIBEIRO L. M.; OLIVEIRA D. M. T.; SOUZA Q.S de. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. **Trees**. v. 26, no 3, p. 851-863, 2012.
- ROBERTO G. G.; G. HABERMANN. Morphological and physiological responses of the recalcitrant *Euterpe edulis* seeds to light, temperature and gibberellins. **Seed Science and technology**. v. 38, no 2, p. 367-378, 2010.
- ROCHA, F. V. N. da. **Regeneração in vitro de embriões zigóticos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.)**. 1995. (Monografia de conclusão do curso). UFPA. Belém.

ROOSMALEN, M. G. M. van. **Fruits of the Guianan Flora**. Utrecht: Institute of Systematics Botany/Wageningen Agricultural University, 483p. 1985.

SALDANHA, C. W.; M. P. MARTINS-CORDER. *In vitro* germination and embryogenic competence acquisition of *Euterpe edulis* Martius immature zygotic embryos. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, no 3, p. 171-178, 2012.

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, no 1, p. 139-150, 2017.

SANTANA A. C. de; COSTA F. A. Mudanças recentes na oferta e demanda do açaí no Estado do Pará. In: Santana AC de, Carvalho DF & Mendes AFT (Eds.) **Análise sistêmica da fruticultura paraense: organização, mercado e competitividade empresarial**. Belém, Banco da Amazônia. p.205-226. 2008.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açaí palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 109, no 3, p. 501-508, 2012.

SCHULTZ J. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante do açaí de *Euterpe edulis* Mart. e *Euterpe oleracea* Mart. submetidos a tratamentos para sua conservação**. 2008. Trabalho de conclusão do curso. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias curso de Agronomia, Florianópolis.

SILVA I. M. DA.; SANTANA A. C DE; REIS M. S. Análise dos retornos sociais oriundos de adoção tecnológica na cultura do açaí no Estado do Pará. **Revista Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 3, p. 25-37, 2006.

SILVA, V. S. **Regeneração *in vitro* de embriões de *Cocos nucifera* L.** 2002. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

TAVARES, G. S.; HOMMA, A. K. O. **Comercialização do açaí no estado do Pará: alguns comentários**. Observatorio de la Economía Latinoamericana. 2015.

TOAIARI, S. D. A. et al. Iron bioavailability of the açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and the iron-fortified manioc flour in rats. **Revista de Nutrição**. v. 18, no 3, p. 291-299, 2005.

TZEC-SIMA M.A.; ORELLANA R.; ROBERT M. L. *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (Mexico). **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 42, no 1, p. 54-58, 2006.

TRIQUES, K. et al. Capacidade fotossintética de plântulas de coco cultivadas *in vitro* (*Cocos nucifera* L.) derivadas de embriões zigóticos. **Plant Science**, v. 127, no 1, p. 39-51, 1997.

UHL, N.W.; DRANSFIELD, J. Genera Palmarum. A new classification of palms and its implications. In: BALICK, M.J., ed. The palm- tree of life: biology, utilization and conservation. **Advances in Economical Botany**, New York, v. 6, p.1-19, 1986.

VIDHANAARACHCHI, V. R. M.; SURANJITH, W. C.; GUNATHILAKE, T. R. Effect of genotype, embryo maturity and culture medium on *in vitro* embryo germination of Sri Lankan coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 44, no 3, 2016.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J.E.U. de; MÜLLER, C.H.; DIAZ, S.C.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperación Amazónica**. (TCA-SPT, 44). 367p, 1996.

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

YOKOO, E.Y.; RAMOS, L.C.S.; BOVI, M.L.A. **Cultura de tecidos de híbridos e espécies de palmito no Instituto Agrônomo**. Campinas, IAC. (Boletim científico, 25). 1992.

YUYAMA L. K. O. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Ilha**. v. 47, p. 2, 2011.

APÊNDICES

Apêndice A - Análise de variância da altura da parte aérea (APA), de plantas de *E. precatória*, avaliadas aos 30 dias *in vitro*, em função do estágio de maturação do fruto (F1: fator 1) e composição do meio de cultura (F2: fator 2).

FV	GL	SQ	QM	Fc	P valor
F1	1	181.55	181.55	50.730	0.000000 *
F2	11	102.87	9.352	2.613	0.00037653*
F1*F2	11	100.71	9.155	2.558	0.0045579*
Resíduo	222	794.50	3.579		
Total	245	1179.63			

Notas: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$) F1: Maturidade dos frutos, F2: Composição do meio.

Apêndice B - Análise de variância da altura da parte aérea (APA), de plantas de *E. precatória*, avaliadas aos 60 dias *in vitro*, em função do estágio de maturação do fruto (F1: fator 1) e composição do meio de cultura (F2: fator 2).

FV	GL	SQ	QM	Fc	P valor
F1	1	1668.5	1668.48	31.0664	0.00000 *
F2	11	1635.1	148.65	2.7678	0.00213*
F1 * F2	11	500.1	45.47	0.8465	0.59369 ^{ns}
Residuo	236	12674.8	53.71		
Total	259	16478.6			

Notas: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$) F1: Maturidade dos frutos, F2: Composição do meio.

Apêndice C - Análise de variância da altura da parte aérea (APA), de plantas de *E. oleracea*, avaliadas aos 30 dias *in vitro*, em função do estágio de maturação do fruto (F1: fator 1) e composição do meio de cultura (F2: fator 2).

FV	GL	SQ	QM	Fc	P valor
F1	1	1011,95	1011,95	39,42	0.0001*
F2	11	1243,90	113,08	4,41	0.0001*
F1 * F2	11	322,86	29,35	1,14	0,3278 ^{ns}
Residuo	253	6494,01	25,67		
Total	276	9139,29			

Notas: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$). F1: Maturidade dos frutos, F2: Composição do meio.

Apêndice D - Análise de variância da altura da parte aérea (APA), de plantas de *E. oleracea*, avaliadas aos 60 dias *in vitro*, em função do estágio de maturação do fruto (F1: fator 1) e composição do meio de cultura (F2: fator 2).

FV	GL	SQ	QM	Fc	P valor
F1	1	8934	8933,6	16,6814	0.00006 *
F2	11	45778	4161,6	7,7708	0.00000 *
F1 * F2	11	4517	410,7	0,7668	0,67309 ^{ns}
Resíduo	253	135493	535,5		
Total	276	194721			

Notas: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$). F1: Maturidade dos frutos, F2: Composição do meio.

Apêndice E - Análise de deviance do número de raízes (NR), de plantas de *E. precatória*, avaliadas aos 60 dias *in vitro*, em função do estágio de maturação do fruto (F1: fator 1) e composição do meio de cultura (F2: fator 2).

FV	GL	Deviance Residuo	Deviance	Pr(>Chi)
F1	1	3,009	187,17	0,01531 *
F2	11	40,681	146,49	<0,00001 *
F1:F2	11	6,045	140,44	0,37789 ^{ns}

Notas: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$) F1: Maturidade dos frutos, F2: Composição do meio.

Apêndice F - Estimativa do valor médio do número de raízes (NR), de plantas de *E. precatória*, avaliadas aos 60 dias *in vitro*, em função do estágio de maturação do fruto (F1: fator 1).

	Estimativa	Error	T valor	Pr(> z)
(Intercepto)	0,69315	0,04737	14,633	<0,000001*
F1 ME	-0,15906	0,07322	-2,173	0,0307 *

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$). M.E. Maduro *Euterpe*

Apêndice G - Análise de deviance do número de raízes (NR), de plantas de *E. oleracea*, avaliadas aos 60 dias *in vitro*, em função do estágio de maturação do fruto (F1: fator 1) e composição do meio de cultura (F2: fator 2).

FV	GL	Deviance Residuo	Deviance	Pr(>Chi)
F1	1	11,11	117,61	6,284e-08 *
F2	11	11,421	106,18	0,001531 *
F1:F2	11	5,388	100,8	0,222268 ^{ns}

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$).

Apêndice H - Estimativa do valor médio do NR, de plantas de *E. oleracea*, avaliadas aos 60 dias *in vitro*, em função do estágio de maturação do fruto (F1: fator 1).

	Estimativa	Erro	T valor	Pr(> z)
(Intercepto)	1,30221	0,02648	49,184	< 2e-16 *
F1 MO	-0,22291	0,04259	-5,234	3,3e-07 *

Nota: (ns) não significativo; (*) significativo a 5% ($p < 0,05$). M.O: Maduro *Oleracea*.

Apêndice I – Porcentagem de contaminação (por fungo ou bactéria) e oxidação em embriões zigóticos de *E. precatoria* e *E. oleracea*, avaliados aos 10 e 60 dias *in vitro*.

Espécie	10 D				60 D			
	Fungo	Bactéria	Oxidação	TOTAL	Fungo	Bactéria	Oxidação	TOTAL
<i>E. precatoria</i>	0,55	0,83	0,83	2,21	1,67	1,67	3,89	7,23
<i>E. oleracea</i>	0,55	5,55	1,38	7,48	0,55	9,44	1,38	11,37

Apêndice J – Porcentagem de sobrevivência de plantas de *E. precatoria* e *E. oleracea*, avaliada 30 dias após na estufa (*ex vitro*).

Espécie	Maduro (%)	Imaturo (%)
<i>E. precatoria</i>	82,75	81,81
<i>E. oleracea</i>	86,67	80,0

Apêndice K – Porcentagem de contaminação (por fungo ou bactéria) e oxidação em embriões zigóticos de *E. precatoria* e *E. oleracea*, avaliados aos 60 dias *in vitro* em função do estágio de maturação do fruto.

Espécie	<i>E. precatoria</i>			<i>E. oleracea</i>		
	Fungo	Bactéria	Oxidação	Fungo	Bactéria	Oxidação
Frutos imaturos	3,33	1,67	1,67	1,11	10,56	0,56
Frutos maduros	-	6,11	1,67	-	8,33	2,22

ANEXOS

Anexo 1 - Concentração de nutrientes minerais (macro e micronutrientes), aminoácido, mio-inositol e vitaminas, em mg L⁻¹, das formulações de MS (Murashige e Skoog, 1962) e de Y3 (Eeuwens, 1976) modificada.

Componente químico	Concentração final no meio de cultura (mg L ⁻¹)	
	MS	Y3
Nitrato de amônio NH ₄ NO ₃	1.650,00	-
Cloreto de amônio (NH ₄ Cl)	-	535,00
Nitrato de potássio KNO ₃	1.900,00	2.020,00
Cloreto de cálcio dihidratado CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00	294,00
Fosfato de sódio monohidratado NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	275,96
Sulfato de magnésio heptahidratado MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00	247,00
Fosfato de potássio monobásico KH ₂ PO ₄	170,0	-
Cloreto de potássio KCl	-	1.492,00
Ácido Bórico H ₃ BO ₃	6,20	3,10
Sulfato de manganês monohidratado MnSO ₄ H ₂ O	22,3	11,20* MnSO ₄ 4H ₂ O
Sulfato de Zinco heptahidratado ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	7,20
Iodeto de Potássio KI	0,83	8,30
Molibdato de sódio dihidratado	0,25	0,24
Sulfato de cobre pentahidratado NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,025	0,16
Cloreto de Cobalto hexahidratado CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,24
Cloreto de níquel hexahidratado NiCl ₂ .6H ₂ O	-	0,024
Sulfato ferroso heptahidratado FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80	27,80*
EDTA dissódico dihidratado Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30	37,30*
Biotina	-	0,050
Pantotenato de cálcio	-	0,050
Glicina Aminoácido	2,00	-
Ácido nicotínico Vitamina B3	0,50	0,050
Piridoxina-HCl Vitamina B6	0,50	0,050
Tiamina-HCl Vitamina B1	0,10	0,500
Mio-inositol C ₆ H ₁₂ O ₆	100,00	100,00

* Eeuwens (1976) recomenda 11,20 mg L⁻¹ de MnSO₄4H₂O. Devido a disponibilidade apenas de MnSO₄H₂O, foi realizada substituição.

Anexo 2 – Tabela de contingência da contagem de embriões de *E. precatoria* e *E. oleracea* desenvolvidos *in vitro* em função da maturação do fruto e período de avaliação.

Maturação do fruto	<i>E. precatoria</i>						<i>E. oleracea</i>					
	Período de avaliação (dias)											
	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
Imaturos	5	94	102	128	126	125	0	134	147	152	154	156
Maduros	0	0	66	93	107	108	0	74	89	116	120	122

Anexo 3 – Tabela de contingência da contagem de embriões de *E. precatoria* e *E. oleracea* desenvolvidos *in vitro* (germinados), em função da composição do meio de cultura, dentro de cada período de avaliação.

Meio de cultura	<i>E. precatoria</i>						<i>E. oleracea</i>					
	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
M1	2	8	14	19	20	20	0	20	22	22	22	22
M2	0	6	10	14	17	17	0	19	21	24	24	24
M3	0	5	12	18	18	17	0	19	23	25	25	25
M4	0	5	8	10	11	11	0	11	14	20	21	21
M5	2	8	16	20	20	21	0	18	21	22	23	24
M6	1	8	14	19	23	23	0	14	17	26	26	26
M7	0	9	18	28	29	28	0	17	22	24	24	24
M8	0	10	16	20	20	21	0	21	21	22	24	24
M9	0	5	11	16	17	17	0	17	18	21	21	23
M10	0	11	18	20	21	21	0	19	21	23	23	23
M11	0	10	16	21	21	21	0	15	17	19	21	21
M12	0	9	15	16	16	16	0	18	19	20	20	21

Anexo 4 – Tabela de porcentagem de embriões desenvolvidos *in vitro* (germinados) de *E. precatoria* e *E. oleracea*, em função da composição do meio de cultura, dentro de cada período de avaliação.

Meio de cultura	<i>E. precatoria</i>						<i>E. oleracea</i>					
	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
M1	6,67	26,67	46,67	63,33	66,67	66,67	0,00	66,67	73,33	73,33	73,33	73,33
M2	0,00	20,00	33,33	46,67	56,67	56,67	0,00	63,33	70,00	80,00	80,00	80,00
M3	0,00	16,67	40,00	60,00	60,00	56,67	0,00	63,33	76,67	83,33	83,33	83,33
M4	0,00	16,67	26,67	33,33	36,67	36,67	0,00	36,67	46,67	66,67	70,00	70,00
M5	6,67	26,67	53,33	66,67	66,67	70,00	0,00	60,00	70,00	73,33	76,67	80,00
M6	3,33	26,67	46,67	63,33	76,67	76,67	0,00	46,67	56,67	86,67	86,67	86,67
M7	0,00	30,00	60,00	93,33	96,67	93,33	0,00	56,67	73,33	80,00	80,00	80,00
M8	0,00	33,33	53,33	66,67	66,67	70,00	0,00	70,00	70,00	73,33	80,00	80,00
M9	0,00	16,67	36,67	53,33	56,67	56,67	0,00	56,67	60,00	70,00	70,00	76,67
M10	0,00	36,67	60,00	66,67	70,00	70,00	0,00	63,33	70,00	76,67	76,67	76,67
M11	0,00	33,33	53,33	70,00	70,00	70,00	0,00	50,00	56,67	63,33	70,00	70,00
M12	0,00	30,00	50,00	53,33	53,33	53,33	0,00	60,00	63,33	66,67	66,67	70,00