



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE ESTUDOS EM SAÚDE E BIOLÓGICAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JUAN DAVID FERREIRA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E INDUÇÃO
DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS EM AÇAZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) TIPO
BRANCO**

Marabá, PA

2018

JUAN DAVID FERREIRA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E INDUÇÃO
DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS EM AÇAZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.) TIPO
BRANCO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à banca examinadora da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, sob a orientação da Professora Dra. Zanderluce Gomes Luis.

Marabá, PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Setorial Campus do Tauarizinho

Gomes, Juan David Ferreira

Caracterização morfológica da germinação *in vitro* e indução de massas embriogênicas em açazeiro (*euterpe oleracea* mart.) tipo branco / Juan David Ferreira Gomes ; orientadora, Zanderluce Gomes Luis. — Marabá : [s. n.], 2018.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de Marabá, Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas, Faculdade de Biologia, Curso de Bacharel em Ciências Biológicas, 2018.

1. Açáí – Cultivo. 2. Embriogênese somática. 3. Germinação. I. Luis, Zanderluce Gomes, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 634.6

Elaborada por Adriana Barbosa da Costa – CRB-2/391

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA GERMINAÇÃO *IN VITRO* E INDUÇÃO
DE MASSAS EMBRIOGÊNICAS EM AÇAZEIRO (*Eutерpe oleracea* Mart.) TIPO
BRANCO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à banca examinadora da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, sob a orientação da Professora Dra. Zanderluce Gomes Luis.

Marabá –PA, ____ de _____ de _____.

Banca Examinadora:

Professor Doutor Bernardo Tomchinsky – UNIFESSPA (Membro)



Professor Doutor Ulisses Brigatto Albino – UNIFESSPA (Membro)

Professora Doutora Zanderluce Gomes Luis (Orientadora)

Marabá – PA

2018

Ofereço

À minha mãe, Cleane Ferreira

Ao meu pai, Clóvis Viana

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, Mãe Cleane, Pai Clóvis e irmã Rayane por todo amor, carinho e apoio que deram nesses quatro anos e durante toda minha vida, sem vocês nada disso teria acontecido, obrigado por todo o conhecimento passado por vocês, por terem me tornado a pessoa que sou hoje e obrigado por toda confiança depositada em mim.

À Andessandra, agradeço por todas as palavras de apoio nos momentos difíceis pelos quais passei, por me fazer acreditar em mim nas vezes que pensei em desistir, por toda ajuda nos experimentos, pelas horas e horas ao meu lado no laboratório e por me ajudar manter a calma sempre, sem você eu não teria conseguido, muito obrigado!

Aos meus amigos Abner, Bruno, Jhonwilers, Kaic e Patrick pelo apoio, palavras de força, ensinamentos, por me proporcionarem momentos que foram cruciais para que eu continuasse nessa trajetória.

Aos amigos da Dorgival Pinheiro, que contribuíram com carinho, incentivos e me muita alegria transmitida.

Aos amigos que a biologia me deu, Camila, Danny, Elis, Felipe, Jhennifer, Marcy, Matheus, Lorena e Thalyta pelo apoio e pela oportunidade de viver momentos incríveis, levo a amizade de vocês pra vida.

Aos demais colegas de turma, por contribuírem com esse projeto com exemplos e palavras de apoio.

Aos colegas do grupo de biologia vegetal da UNIFESSPA pelos auxílios nos experimentos e compartilhamento de conhecimentos.

Aos professores Diógenes, Sidnei e Zanderluce por todos os ensinamentos em sala de aula e por me presentarem com suas amizades sempre me ajudando com conselhos e me fazendo acreditar que sou capaz.

A minha orientadora, Zanderluce Gomes Luis, sem ela esse trabalho não teria sido realizado. Agradeço pelo apoio, disponibilidade, paciência, amizade, por acreditar em mim, muito obrigado!

A minha orientadora de iniciação científica, Cristiane Vieira Cunha, pelos ensinamentos e exemplo de pessoa do bem que ela é.

A todos os professores da biologia, pelos ensinamentos e por serem meus exemplos.

A todos aqueles que, de alguma forma, agregaram para a realização desse trabalho.

Muito obrigado!

*“Clareza na ideia, pureza no coração,
sentimento como guia, honestidade
como religião”.*

Emicida

RESUMO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia brasileira, sendo o Pará o principal centro de dispersão natural desta espécie. O açazeiro possui importância econômica com a produção de frutos e palmito e, cultural na confecção de artesanatos além de sua importância para a sobrevivência como ingrediente básico na alimentação das comunidades ribeirinhas. A busca pelo açazeiro aliado a formas inadequadas de utilização, propagação e ciclo de vida longo das palmeiras resultam em uma exploração desorganizada desta espécie. Diante disso, as técnicas de cultivo *in vitro* mostram-se como alternativa para auxiliar a propagação do açazeiro. A embriogênese somática tem sido a técnica *in vitro* mais utilizada na propagação em massa das palmeiras, visto que facilita a produção de mudas elite em grande escala, reduz o tempo dos programas de melhoramento e torna o trabalho de produção de mudas menos complexo. Este trabalho teve por objetivo estudar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), determinar o substrato mais favorável para a germinação e elucidar as etapas morfológicas durante a germinação. Além disso, buscou-se otimizar o protocolo de embriogênese somática por meio do uso de segmentos foliares obtidos de plantas germinadas *in vitro* e embriões zigóticos, e determinar, entre eles qual explante é mais responsivo quanto formação de calos. Para a germinação foram utilizados três substratos; papel filtro e água, ágar-água e meio de MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 10 mg.L^{-1} de mio-inositol, 30 g.L^{-1} de sacarose e $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar. Para a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos (EZ), foram avaliados o efeito das concentrações de 0, 50 e 100 mg L^{-1} de 2,4-D em meio MS contendo carvão ativado, e das concentrações 0, 1,5 e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ em meio MS isento de carvão ativado. A embriogênese somática a partir de segmentos foliares partiu das plântulas germinadas *in vitro* no experimento de germinação, foram avaliados o efeito das auxinas 2,4-D, nas concentrações de 0, 1,5 e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$. Como resultados, verificou-se que o uso dos substratos papel filtro e água e ágar-água não possibilitaram a germinação dos EZ, por outro lado o substrato com MS mostrou 79% de germinação. A embriogênese somática a partir de EZ como

explante foi superior a realizada com o uso de seguimentos foliares, que apresentou de oxidação e baixo número de calos formados.

Palavras-chave: açai, embriogênese somática, embriões zigóticos, seguimentos foliares.

ABSTRACT

The Acai Palm (*Euterpe oleracea* Mart.) is a palm native to Brazilian Amazon Forest and the state of Pará is the main center of natural dispersion of this species. The Acai Palm has economic importance to the production of fruits and palmito, furthermore, it still has cultural role in the making of handicrafts, besides its importance to the survival as a basic ingredient in the feeding of the riverside communities. The search for the acai palm tree added to the inadequate forms of use, propagation and long life-cycle of the palm trees result in a disorganized exploration of this species. This said, the *in vitro* culture techniques are introduced as an alternative to boost the propagation of the acai palm. Somatic embryogenesis has been the most widely used *in vitro* technique for mass propagation of palm trees, because it facilitates the large-scale production of elite seedlings, reduces the time of breeding programs and makes seedling production less complex. The goal of this study is to study the *in vitro* germination of acai palm zygotic embryos, in order to determine the most favorable substrate for germination and clarify the morphological stages during germination. In addition, we sought to optimize somatic embryogenesis protocol by using leaf segments got from *in vitro* germinated plants and zygotic embryos, and to determine, among them, which explant is more responsive to callus formation. For the germination, three substrates were used: paper filter and water, agar-water and MS mean (MURASHIGE; SKOOG, 1962) supplemented with 10 mg.L⁻¹ myo-inositol, 30 g.L⁻¹ sucrose and 9.0 g.L⁻¹ agar. For the somatic embryogenesis obtained from zygotic embryos (ZE), the effect of concentrations of 0, 50 and 100 mg L⁻¹ of 2,4-D on MS mean containing activated carbon was evaluated, and the concentrations of 0, 1.5 and 3.0 mg L⁻¹ in activated carbon free MS mean. For somatic embryogenesis got from leaf segments of germinated seedlings *in vitro*, in the germination experiment, the effect of 2,4-D auxins at concentrations of 0, 1,5 and 3,0 mg L⁻¹ were evaluated. It was verified that use of the filter paper substrates and water and agar-water did not allow the germination of the ZE, on the other hand, the substrate with DM showed 79% of germination. The somatic embryogenesis from ZE as explant was superior to that performed with the use of foliar sequences, which presented 56% of oxidation and low number of callus formed.

Keywords: Acai palm, somatic embryogenesis, zygotic embryos, foliar segments.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Classificação dos níveis de oxidação dos embriões zigóticos (EZ) de açaí (*Euterpe oleracea* tipo branco). A: Embrião zigótico sem oxidação em ambas as regiões (distal e proximal). B: EZ sem oxidação na região proximal e oxidação nível 1 na região distal. C: EZ evidenciando oxidação nível 2 em sua região distal (asterisco) e oxidação nível 3 na região proximal (seta). Abreviações: (rp) região proximal; (rd) região distal. Barras: A, B e C = 1000 µm.....24
- Figura 2 – Porcentagem de intumescimento, protrusão da parte aérea e radicular, germinação normal e anormal em embriões zigóticos inoculados em papel filtro e água, ágar-água e MS (Murashige e Skoog, 1962).26
- Figura 3 – Valores acumulados de porcentagens (colunas) e do número de estruturas da parte da parte aérea (◆), de raiz primária (■) e porcentagem de germinação (colunas) até 70 dias, após o início da germinação em MS de embriões zigóticos de açaizeiro tipo branco *in vitro*.....27
- Figura 4 – Etapas da germinação *in vitro* de embriões de açaizeiro (*Euterpe oleracea* tipo branco) em meio de MS. A: Embrião zigótico intumescido na região distal, apresentando início das protrusões da parte aérea (asterisco) e radicular (seta) após 7 dias de inoculação. B: Coifa em evidência (seta) após 15 dias. C: Crescimento da parte aérea exibindo coloração rosa devido antocianinas e crescimento da radícula após 30 dias. D: Coleóptilo (asterisco) e parte aérea aclorofilada. E: Plântula com início o desenvolvimento de clorofila na parte aérea aos 50 dias de cultivo. F: Plúmula em desenvolvimento dando origem a folhas. G: Desenvolvimento de raízes adventícias (setas) e expansão das folhas da plântula. H: Germinação anormal. Abreviações: (rd) região distal; (rp) região proximal.29
- Figura 5 – Etapas morfológicas da germinação de embriões zigóticos (EZ). em meio ágar-água. A: EZ com início de oxidação na região distal e início da formação da estrutura cônica (seta). B: EZ apresentando oxidação nível 2 na região distal e desenvolvimento da estrutura cônica. C: EZ apresentando estrutura cônica em evidência (seta) e oxidação nível 1 na região distal. D: EZ não viável

apresentando oxidação nível 2 na região proximal. Abreviações: (rp) região proximal; (rd) região distal. Barras: A, B, C e D = 1000 μm31

Figura 6 – Aspecto da embriogênese somática induzida a partir de embriões zigóticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* tipo branco) em meio contendo carvão ativado. A: Calo mucilaginoso na região proximal e compacto na região distal aos 15 dias de cultivo. B: Calo nodular compacto na região do mesocótilo e oxidação da região proximal do explante, após 30 dias em de cultivo. C: Calo embriogênico na região proximal do explante e intensa oxidação da região distal. D: Calo mucilaginoso, embriogênico, calos friáveis e primários aos 50 dias de cultivo. E: Estruturas embriogênicas em evidência. F: Calos primários, embriogênicos e nodulares aos 70 dias em 2,4-D. G: Embrião zigótico com aspecto desidratado apresentando calo vitrificado e esponjoso. H: Calo vitrificado no cotilédone da plântula. I: Germinação em tratamento controle apresentando calo do tipo esponjoso no cotilédone. Abreviações: (e) Calo embriogênico, (ej) Calo esponjoso, (ep) Epicótilo, (f) Calo friável, (m) Calo mucilaginoso, (mc) mesocótilo, (n) Calo nodular, (p) Calo primário, (rd) Região distal, (v) Calo vitrificado. Barras: A, B, C, D, E, F, G, H e I: 1000 μm33

Figura 7 – Aspecto da embriogênese somática induzida a partir de embriões zigóticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* tipo branco) em meio de indução sem carvão ativado. A: Embrião zigótico apresentando intumescimento da região proximal após 15 dias no tratamento 1,5 mg.L^{-1} de 2,4-D. B: Início da formação de calos embriogênicos na região do mesocótilo. C: Formação de calo primário e embriogênico na região distal aos 30 dias de cultivo. D: Calo Vitrificado em evidência. E: Aos 45 dias de cultivo, embrião zigótico apresentando calo primário e embriogênico. F: Calo nodular em evidência. G: Embrião zigótico com formação de calo friável, nodular e embriogênico. H: Calos embriogênicos na região do mesocótilo e calo primário, friável e nodular após 60 dias de imersão no meio com 1,5 mg.L^{-1} de 2,4-D. I: Detalhes da germinação em meio desprovido de reguladores apresentando calo do tipo esponjoso na região distal. Abreviações: (e) Calo embriogênico, (ej) Calo esponjoso, (f) Calo friável, (n) Calo nodular, (p) Calo primário, (v) Calo vitrificado. Barras: A, B, C, D, E, F, G, H e I: 1000 μm38

Figura 8 – Aspecto da embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro* de açazeiro (*Euterpe oleracea* tipo branco). A: Emergência de folha interna. B: Calos embriogênicos friável aos 140 dias após a imersão no meio. C: Folha interna expandida aos 170 dias de cultivo. D: Explante totalmente oxidado. E: Calos embriogênicos formados a partir da folha interna. F: Calos embriogênicos após 190 dias no tratamento com 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Abreviações: (e) Calos embriogênicos, (ef) Calo embriogênico friável, (f) Calo friável, (p) Calo primário. Barras: A, B, C, D, E, F: 1000 µm.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem e níveis de oxidação dos embriões zigóticos de <i>Euterpe oleracea</i> tipo branco inoculados em papel filtro e água, ágar-água e meio de Murashige e Skoog (1962).....	30
Tabela 2 – Influência das concentrações da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em meio com carvão ativado na indução de diferentes tipos de calos induzidos a partir de embriões zigóticos de <i>Euterpe oleracea</i> tipo branco.	36
Tabela 3 – Influência das concentrações da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em meio sem carvão ativado na indução de diferentes tipos de calos induzidos a partir de embriões zigóticos de <i>Euterpe oleracea</i> tipo branco.	37
Tabela 4 – Porcentagem de oxidação nos embriões zigóticos de <i>Euterpe oleracea</i> tipo branco submetidos as concentrações de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nos experimentos com carvão e sem carvão ativado.	38
Tabela 5 – Influência da concentração da auxina 2,4-diclorofenoxiacético no intumescimento e oxidação dos segmentos foliares obtidos de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. tipo branco.....	42
Tabela 6 – Formação de calos (%) em explantes foliares de <i>Euterpe oleracea</i> tipo branco inoculados em concentrações baixas de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).	43

LISTA DE ABREVIATURAS

μM	Micromolar
Atm	Atmosfera
°C	Grau Celsius
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
CE	Calo embriogênico
ES	Embrião somático
et al.	Expressão que significa “e outros”.
EZ	Embrião zigótico
Fe-EDTA	Solução de Sulfato Ferroso e
g	O grama (unidade de medida de massa).
h	Hora (unidade de tempo)
L	Litro (unidade de medida de volume)
mg	Miligramas (unidade de medida de massa)
mL	Mililitro (unidade de medida de volume)
MS	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
pH	escala numérica adimensional utilizada para especificar a acidez ou basicidade de uma solução aquosa.
PVC	Película de polivinilcloreto
TCL	Thin cell layer (Camada fina de células)
Y3	Meio formulado por Eeuwens (1976)

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. <i>Euterpe oleracea</i> , Mart. tipo branco	15
2.2. Variedade.....	15
2.3. <i>Euterpe oleraceae</i>	16
2.4. Importância econômica	17
2.5. Propagação	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivo específico	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Material vegetal	22
4.2. Influência do substrato na geminação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos	22
4.2.1. Germinação em papel filtro e água.....	23
4.2.2. Germinação em meio de cultivo ágar-água	23
4.2.3. Germinação em meio de Murashige e Skoog, 1962 (MS).....	23
4.3. Embriogênese somática a partir de segmentos foliares e embriões zigóticos.....	24
4.4. Análise estatística.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Influência do substrato na geminação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos de <i>Euterpe oleracea</i> tipo branco	26
5.2. Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de açazeiro (<i>Euterpe oleracea</i> Mart. tipo branco).....	32
5.3. Embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas <i>in vitro</i> de açazeiro (<i>Euterpe oleracea</i> Mart. tipo branco).....	39
6. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia Brasileira, pertence à família Arecaceae e é considerada a espécie mais importante de seu gênero (OLIVEIRA; NETO; QUEIROZ, 2015). A *E. oleracea*, apresenta distribuição, tropical e subtropical, sendo o estado do Pará o principal centro de dispersão natural desta espécie (JEFFREY; CRONQUIST, 1984; JONES; DRANSFIELD, 1995).

Na região do estuário amazônico, onde se encontram as maiores populações dessa espécie, o açazeiro é também conhecido como Açai-do-Pará, açai-do-Baixo Amazonas, açai-de-touceira, açai-de-planta e açai- verdadeiro (OLIVEIRA; NETO; PENA, 2007a). A espécie é amplamente cultivada no estuário do rio e sua produção chega representar 90% da produção de frutos do país (CARVALHO; NASCIMENTO, 2018; HOMMA et al., 2016).

Ocorrências espontâneas também são encontradas nos estados do Amazonas, Maranhão e Mato Grosso (NOGUEIRA; FIGUEIRÊDO; MÜLLER, 2005). Rompendo as barreiras nacionais, o açazeiro ocorre em outros países da América do Sul (Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname e Guiana) e da América Central (Panamá) (HENDERSON, 2000).

E. oleracea possui importância econômica, social e cultural (HOMMA et al., 2016). A produção de frutos e palmito tem movimentado anualmente mais de dois bilhões de reais no estado do Pará e, no estado do Amapá, mais de duzentos milhões de reais, e destes, 150 milhões de reais apenas com a produção da polpa em ambos os estados (IBGE, 2015; OLIVEIRA; NETO; QUEIROZ, 2015).

O açazeiro pode ser utilizado de inúmeras formas: como ornamental; na construção rústica de casas e pontes; uso medicinal como vermífugo e antidiarreico; na produção de celulose para fabricação do papel Kraft, a polpa dos frutos e o palmito são utilizados na alimentação; o endocarpo na confecção de biojóias e na constituição de ração animal e também na adubação (OLIVEIRA; NETO; PENA, 2007a).

O açazeiro possui duas vias principais de reprodução, sexuada e assexuada. A via mais viável para os produtores é a propagação sexuada, realizada por meio do uso das sementes, principalmente, se o foco for produção em larga escala

(NASCIMENTO; CARVALHO; OLIVEIRA, 2011). A propagação assexuada pode ser feita pela retirada de brotações que emergem da região abaixo do coleto da planta (CARVALHO; NASCIMENTO, 2018), no entanto, a porcentagem de brotações que sobrevivem após o plantio é baixa, permitindo no máximo a produção de 60% de mudas por ano (OLIVEIRA; NETO; PENA, 2007b).

Outros fatores limitantes na propagação assexuada são a necessidade de mão-de-obra e a variação genotípica que influencia diretamente na quantidade de brotações, fazendo com que a planta apresente um estipe solitário (OLIVEIRA; NETO; PENA, 2007b).

O potencial econômico aliado as formas inadequadas de utilização e propagação do açazeiro acarretam uma exploração desorganizada desse recurso (TAGORE, 2017), como ocorreu nos anos 60, quando a extração exacerbada do palmito quase resulta na extinção da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) que antes da ascensão do açazeiro era o maior alvo dos exploradores de palmito (NOGUEIRA, 1997).

Diante da importância socioeconômica da espécie, é importante avançar nas pesquisas sobre o açaí, seja na área da produção em larga escala de mudas ou melhoramento genético, uma vez que alguns estudos foram realizados apenas com interesse de estabelecer protocolos de embriogênese somática (CARVALHO; NASCIMENTO, 2018; OLIVEIRA; NETO; QUEIROZ, 2015; OLIVERA FREITAS et al., 2016; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson et al., 2012).

As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* se aplicam como alternativa para auxiliar a propagação desta espécie e produção de mudas de alta qualidade (ALMEIDA, 2009). No caso das palmeiras, devido ao seu ciclo vida longo e ausência de métodos convencionais de propagação vegetativa, as técnicas de melhoramento necessitam de um tempo maior até alcançarem resultados significativos (FARIAS NETO et al., 2005).

As técnicas de cultivo *in vitro*, em especial a embriogênese somática, têm sido utilizadas na propagação em massa das Arecaceas por apresentar a maior taxa de multiplicação quando comparada com qualquer outro método de propagação (LEDO, A. et al., 2001; NOGUEIRA; FIGUEIRÊDO; MÜLLER, 2005), uma vez que facilita a produção de mudas de material elite em grande escala, acelera os programas de

melhoramento que, no caso das palmeiras, devido seu longo ciclo de vida torna o trabalho mais complexo e extenso (LEDO, A. da S. et al., 2002; TISSERAT, 1987).

Assim, este trabalho busca estudar a germinação *in vitro* de *Euterpe oleracea*. em diferentes substratos e otimizar o protocolo de embriogênese somática a partir de segmentos de tecidos foliares jovens e caracterizar morfológicamente os estágios envolvidos em cada processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Euterpe oleracea*, Mart. tipo branco

Euterpe oleracea Mart. tipo branco, conhecida popularmente como açaí branco, é mais raro em comparação com o açaí roxo (*Euterpe oleracea*) e tem grande procura no comércio local (ARAUJO, 2017; CALZAVARA, 1972). É uma espécie perene e elegante, pertencente à família Arecaceae, que abrange, aproximadamente, 200 gêneros e cerca de 2600 espécies com distribuição geográfica tropical e subtropical (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000; OLIVEIRA; NETO; PENA, 2007b).

O açaí branco juntamente com o preto, são os dois principais tipos dentro do seu gênero (SILVEIRA, 2017). O tipo roxo, é amplamente estudado e possui diversos estudos sobre sua composição (ROGEZ, 2000; SANCHES; OLIVEIRA, 2011; SOUSA; OLIVEIRA; NETO, 2015), em contraste, o açaí tipo branco possui poucas informações sobre sua composição (RODRIGUES et al., 2006; SANCHES; OLIVEIRA, 2011; SOUSA; OLIVEIRA; NETO, 2015).

O açazeiro distribui-se por toda a região amazônica de forma natural e se organizam em aglomerados que recebem o nome de açazais, tendo como principal característica a ocorrência nas áreas de várzeas (NOGUEIRA, 1997).

No Brasil, o açazeiro (*E. oleracea*) ocorre de forma espontânea nos estados do Amapá, Maranhão, Pará, Tocantins e Mato Grosso. A espécie também pode ser encontrada em outros países como a Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e Colômbia (BALICK, 1986; CAVALCANTE, 1991; MACEDO, 1995; ROOSMALEN, VAN, 1985). Uma distribuição mais ampla é apresentada na literatura por Henderson e Galeano, (1996), que apontam a ocorrência de açazeiro no Panamá, Equador e Trinidad.

2.2. Variedade

O açazeiro está disseminado por todo o estuário amazônico e apresenta vasta diversidade em características morfológicas (MULLER 2005). São diferenciadas de acordo com a coloração dos frutos maduros, pela forma, tamanho e

peso dos cachos, quantidade de perfilhos na touceira, pela forma e como o cacho se ramifica e pela consistência do suco extraído dos frutos (açai) de *Euterpe oleracea* (OLIVEIRA et al., 2002).

Etnovarietades ou etnoespécies são conhecidas por populações ribeirinhas na região amazônica que as denominam de açai-roxo (comum), açai-branco, açai-açu, açai-sangue-de-boi, açai-espada, açai-tinga e açai-chumbinho (JARDIM; OLIVEIRA, 2014).

Diversas variedades de *E. oleracea* foram identificadas por pesquisadores do Museu Paraense Emilio Goeldi, afirmaram que muitas outras variedades estão ameaçadas de extinção sem mesmo termos conhecido (CANTO, 2001).

De acordo com Rogez, (2000) apenas dois tipos de açazeiros são comercializados. O açai preto, conhecido assim por apresentar frutos com epicarpo contendo coloração violácea quando maduro, é mais comum e mais comercializado. Já o açai-branco apresenta frutos com coloração verde mesmo maduro, mais raro, porém com grande procura no comércio.

2.3. *Euterpe oleraceae*

O açazeiro pode possuir até 25 estipes por touceira com diferentes níveis de desenvolvimento. As plantas adultas podem apresentar de 3m a 20m de altura e de 7 cm a 18cm de diâmetro, possuindo em seu ápice de 8 a 14 folhas (HENDERSON; GALEANO, 1996). Seu caule (estipe) é cilíndrico, liso, acinzentado e geralmente com manchas ocasionadas por líquens. Os estipes apresentam nós definidos por toda sua extensão, com entrenó medindo aproximadamente 11 cm (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000).

As folhas, são compostas, ramificadas de arranjo espiralado, com 40 a 80 pares de folíolos, opostos ou sub-opostos e organizado em intervalos regulares (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000). Os folíolos são pendentes nos indivíduos adultos e horizontais nos indivíduos jovens, apresenta base mais aberta e extremidade apical pontiaguda, apresentando comprimento entre 20cm a 50cm e largura entre 2cm a 3cm (PRANCE, G.T.; SILVA, 1975). Cada folíolo possui uma nervura central, proeminente na face adaxial e mais dois conjuntos com duas ou três nervuras, proeminentes na face abaxial, distribuídos de maneira uniforme em

relação ao plano de divisão da nervura central. O comprimento da bainha foliar pode ser de 1,0m, podendo variar de 0,6m a 1,5m (HENDERSON; GALEANO, 1996). As folhas apresentam comprimento de até 2 m quando adultas (NOGUEIRA, 1997).

Possui inflorescência classificada como infrafoliar, com 5 pedúnculos medindo entre 5cm e 15cm e diâmetro entre 2,7cm e 4,0cm (HENDERSON; GALEANO, 1996). É envolvida por duas brácteas: uma espatela ligular e uma espata de formato (VENTURIERI, 2015). Após a abertura da espata, a espatela cai e expõe a inflorescência do tipo cacho, mostrando um número não uniforme de ráquias, onde as flores estão inseridas. As flores estão dispostas em tríades, organizadas de forma que cada flor feminina fique ao lado de duas flores masculinas (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON; GALEANO, 1996), há uma exceção em relação ao fim de cada ráquia que apresenta somente flores masculinas, o que resulta em uma porcentagem de 80,5% de flores masculinas e 19,5% de flores femininas (CALZAVARA, 1972).

O fruto do açazeiro é carnoso e globoso, exibe resíduo do estigma lateralmente e possui diâmetro de 1 cm a 2 cm e peso de aproximadamente 1,5g. O epicarpo, no açaí branco, é verde e no preto é atro-violácea (VENTURIERI, 2015). O mesocarpo é polposo, com cerca de 1 mm de espessura que envolve o endocarpo volumoso e duro apresentando em seu interior uma semente, com embrião pequeno e endosperma volumoso (CAVALCANTE, 1991; HENDERSON; GALEANO, 1996; OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000).

O sistema radicular do açazeiro é fasciculado, com raízes que emergem do estipe a uma altura de aproximadamente 30 cm a 40 cm acima da superfície do solo (HENDERSON; GALEANO, 1996). As raízes jovens exibem cor avermelhada por conta das antocianinas presentes (MARKAKIS, 1982).

2.4. Importância econômica

A palmeira do açazeiro (*Euterpe oleracea*) se destaca por estar presente em quase toda a área amazônica e por seu valor para as populações locais, sendo uma das espécies pioneiras e mais importantes para as agroindústrias de palmito (CORRÊA, 2017).

Além da importância econômica do palmito, o alto preço seguido da grande procura pelo suco extraído dos frutos aumenta o interesse pelo cultivo desse vegetal (BARRETO et al., 2012). O consumo do suco do açaí não se limita a região amazônica ou as demais regiões do Brasil, a exportação desse produto para o exterior carrega consigo altos valores monetários (NOGUEIRA, 1997a; TAVARES; HOMMA, 2015).

A utilização do açazeiro vai além do uso do suco ou do palmito, a palmeira pode ser aproveitada quase em sua totalidade (LIMA, 2015). Os frutos podem ser utilizados pra fazer mingau, creme, picolé, sorvete, licor, geleia adubo orgânico, ração animal, antidiarreico, corante e acessórios de artesanato (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000), das folhas pode-se fazer cobertura de casas, parede, cesto, tapete, esteira, adorno, cobertura morta, adubo orgânico e abanador (CALZAVARA, 1972; NOGUEIRA, 1997). Dos cachos a utilização pode ser na criação de vassouras e no solo como adubo orgânico e cobertura morta; do estipe realiza-se construções de casas, pontes, cercados, currais, utiliza-se como lenha e extrai-se a celulose para a fabricação de papel; a parte da raiz serve como antiverminoso (NOGUEIRA, 1997b; OHASHI; KAGEYAMA, 2004).

No estuário amazônico as atividades como extração de palmito e/ou do suco do açaí são responsáveis por mais de 25.000 empregos, gerando renda de mais de 40 milhões de reais de receitas (NETO; VASCONCELOS; SILVA, 2010; VALLES, 2013). Por ser uma atividade extrativista esse recurso não gera impostos para o município o que o torna a principal fonte de economia familiar da região (BRONDÍZIO, 2008).

A exportação do palmito do açazeiro para as demais regiões do país e para o exterior colocou a espécie em evidência na economia paraense (HOMMA et al., 2006). Os palmitos processados e classificados como de maior qualidade são exportados para o exterior, chegando ao valor de US\$3,00/kg, ao mesmo tempo em que os menos qualificados são comercializados a US\$0,51/kg (ROGEZ, 2000).

O palmito na região amazônica tem se mostrado uma forte fonte de renda, por outro lado, o alto preço dos frutos do açazeiro aumenta o interesse pelo cultivo do açazeiro nas comunidades rurais espalhadas por todo estuário amazônico (NOGUEIRA, 1997; TAVARES; HOMMA, 2015). Conhecendo o potencial da região que atualmente é a maior exportadora do mundo, aumentam a produção desse

recurso através dos conhecimentos de cultivo e manejo (BENTES; HOMMA; SANTOS, 2017).

Os principais importadores de suco do açaí produzido no Pará são os Estados Unidos e o Japão. Em 2012 os americanos foram responsáveis por 84,65% da exportação paraense, seguido do Japão com 10,12% (SANTANA, 2012). Ainda no ano de 2012 a exportação atingiu 6.061.194 kg de polpa de açaí, o que equivale em US\$ 17 milhões. Em 2013 foram exportados 4.559.021 kg de polpa, quantia equivalente a mais de US\$12,38 milhões. No ano de 2014, US\$ 22,523 em milhões chegaram à economia paraense, o que corresponde a 84% do total de exportação de sucos do Pará (TAVARES; HOMMA, 2015).

Diante disso, alguns estudos mostram que o preço por tonelada de açaí (US \$ 3,22 milhões) supera em valores monetários ao preço por tonelada de soja (US \$ 2.208) ou a castanha-do-Pará (US \$ 2.415) (YAMAGUCHI et al., 2015).

2.5. Propagação

O açaizeiro se propaga tanto pela via sexuada quanto pela assexuada. Na via sexuada ocorre a propagação por meio da germinação das sementes enquanto na via assexuada, a propagação é realizada através da retirada dos perfilhos jovens que surgem na intercessão entre a raiz e o caule da palmeira (CALZAVARA, 1972; OLIVEIRA; NETO; QUEIROZ, 2015). No entanto, o processo assexuado pode não apresentar resultados eficientes, pois em algumas plantas, independente do ambiente, não possuem a capacidade de emitir brotações, resultando em um trabalho cansativo e pouco produtivo (OLIVEIRA et al., 2002).

O açaizeiro por ser uma espécie originária de cruzamentos, demonstra alto nível de variação entre seus caracteres, como por exemplo, os tipos: branco e o roxo. Com isso, a capacidade de variação dificulta os programas de melhoramento com palmeiras, que por sua vez já apresentam dificuldades em trabalhos com palmeiras devido suas características de planta perene (FREITAS, 2014; NOGUEIRA; FIGUEIRÊDO; MÜLLER, 2005).

Diante do exposto e na busca de patamares mais elevados de produtividade em termos de quantidade de fruto e polpa produzida, evidencia-se a necessidade de mais estudos sobre técnicas de propagação e melhoramento desta espécie

(OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA; NETO; QUEIROZ, 2015; TAVARES; HOMMA, 2015).

A cultura de tecidos permite a formação de mudas livres de vírus ou qualquer outro patógeno, mudas uniformes e selecionadas de um genótipo superior em um tempo inferior a propagação feito com técnicas tradicionais (LAKSHMANAN, 2006; MARTINS-CORDER; SALDANHA, 1999; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson et al., 2012; TORRES et al., 1998).

A embriogênese somática é a técnica mais utilizada na cultura de tecidos para a propagação de palmeiras (LUIS, 2013). Essa técnica permite a formação de milhares de embriões a partir de um explante sem a necessidade de reprodução assexuada (LEDO, A. da S.; LAMEIRA; MENEZES, 2002; ZIMMERMAN, 1993). As células são induzidas a seguirem rotas que as levam a se desdiferenciarem dando formação a novas plântulas (GUEYE et al., 2009). Esta técnica só é capaz de ser realizada devido à plasticidade das células vegetais (FEHÉR, 2008).

Assim, por meio de mais estudos no ramo do cultivo *in vitro*, busca-se o aprimoramento das técnicas de embriogênese somática. Nos últimos anos, trabalhos realizados com *Euterpe oleracea* (açai), estão sendo realizados objetivando o domínio dessa técnica (LEDO, A. et al., 2001; LEDO, A. da S.; LAMEIRA; MENEZES, 2002; OLIVERA FREITAS et al., 2016; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* e otimizar o protocolo de embriogênese somática.

3.2. Objetivo específico

- Germinar embriões zigóticos em diferentes meios de cultura a partir do resgate de embriões;
- Determinar o substrato mais favorável para a germinação de embriões zigóticos *in vitro*;
- Otimizar o protocolo de embriogênese somática por meio do uso de segmentos foliares obtidos de plantas germinadas *in vitro* e embriões zigóticos;
- Determinar o explante mais responsivo quanto à formação de calos;
- Caracterizar os estádios de desenvolvimento durante a embriogênese somática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Embriões zigóticos utilizados como explantes foram obtidos a partir de frutos maduros de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). Os frutos utilizados em todos os experimentos foram obtidos da mesma planta matriz, localizada no bairro Amapá, no núcleo Cidade Nova em Marabá, Pará, Brasil (5°21'51.2"S 49°07'37.2"W) (-5.364217, -49.127009). Os frutos foram selecionados de acordo com sua maturação, que foi caracterizada pela textura e coloração do epicarpo.

Após a coleta, os frutos foram processados por meio da retirada do epicarpo e do mesocarpo, objetivando deixar somente o endocarpo, que representa a parte mais interna rígida do fruto e abriga internamente a semente. Após o processamento dos frutos, os endocarpos contendo as sementes foram levados para o laboratório para serem desinfestados. Em laboratório, os endocarpos foram levados até a câmara de fluxo laminar para ser realizada a desinfestação, excisão e inoculação dos embriões zigóticos.

A desinfestação das sementes foi realizada, pela imersão em álcool etílico 70% durante três minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) (2,0% a 2,5% de cloro ativo p/p) por 30 minutos e dois enxágues sucessivos em água destilada e autoclavada. Posteriormente ao enxague, os endocarpos foram deixados imersos em água destilada e autoclavada durante a excisão dos embriões, para facilitar a abertura dos endocarpos. Esse procedimento foi realizado com auxílio de pinça e bisturi.

Os embriões zigóticos extraídos foram inoculados em placas de Petri contendo substratos específicos para germinação, organizados em seis placas contendo cinco embriões em cada, totalizando 30 embriões.

Para os estudos de germinação, foram realizados três experimentos conduzidos *in vitro*. Os estudos de embriogênese somática foram realizados a partir de dois explantes, folhas jovens obtidas da germinação *in vitro* e embriões zigóticos.

4.2. Influência do substrato na geminação *in vitro* de embriões zigóticos

4.2.1. Germinação em papel filtro e água

Após excisão, os embriões zigóticos foram inoculados em placa de *Petri* (11 x 90 mm) contendo dois discos de papel filtro e dois ml de água destilada. Após a inoculação, as placas de *Petri* foram vedadas com filme de PVC transparente, embrulhadas em papel alumínio e armazenadas em incubadora tipo B.O.D (LIMA TEC 320 TFP-I) à 28 °C.

As análises da germinação foram realizadas a cada três dias com o auxílio de estereoscópio e câmera fotográfica. A cada avaliação, quando necessário, foi acrescentado um ml de água destilada autoclavada com o auxílio de uma pipeta.

4.2.2. Germinação em meio de cultivo ágar-água

Os embriões extraídos foram inoculados em meio Ágar (9,0 g L⁻¹). Cada placa de *Petri* foi preenchida com 25 ml de meio.

As placas contendo os embriões foram vedadas com filme de PVC transparente e revestidas por papel alumínio. Em seguida as placas foram armazenadas em incubadora tipo B.O.D (LIMA TEC 320 TFP-I) à 28 °C.

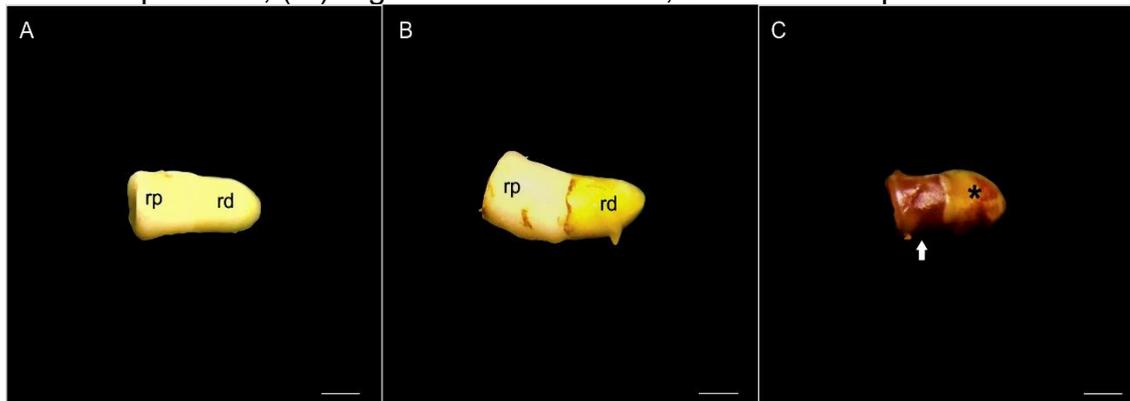
4.2.3. Germinação em meio de Murashige e Skoog, 1962 (MS)

Embriões, excisados de sementes previamente desinfestadas, foram inoculados em placas de *Petri* contendo meio de MS, suplementado com 10 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose e 9,0 g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do agente gelificante e, posteriormente, o meio foi autoclavado por 20 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1,1 atm.

Os embriões foram mantidos no escuro a 25 °C por 60 dias e depois foram expostos a fotoperíodo de 16h e temperatura de 28 °C luz em incubadora. O meio foi renovado a cada 30 dias e as avaliações realizadas a cada três dias, durante os primeiros 30 dias de cultivos e, posteriormente, a cada 15 dias. Os experimentos duraram 70 dias e as variáveis avaliadas foram: intumescimento, germinabilidade, protrusão foliar/radicular e oxidação. A oxidação dos embriões foi avaliada segundo a coloração e classificada em três níveis de intensidade: coloração amarelada (nível

1,0 - 1,9), coloração marrom claro (nível 2,0 a 2,9) e marrom escuro (nível 3) (Figura 1). Todas as avaliações foram realizadas com o auxílio de um estereoscópio e uma câmera fotográfica.

Figura 1 - Classificação dos níveis de oxidação dos embriões zigóticos (EZ) de açaí (*Euterpe oleracea* tipo branco). A: Embrião zigótico sem oxidação em ambas as regiões (distal e proximal). B: EZ sem oxidação na região proximal e oxidação nível 1 na região distal. C: EZ evidenciando oxidação nível 2 em sua região distal (asterisco) e oxidação nível 3 na região proximal (seta). Abreviações: (rp) região proximal; (rd) região distal. Barras: A, B e C = 1000 μm .



Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

4.3. Embriogênese somática a partir de segmentos foliares e embriões zigóticos

As folhas de plântulas obtidas do experimento de germinação *in vitro* a partir de embriões zigóticos de açaizeiro foram utilizadas como fonte de explante para a indução de calos embriogênicos e embriões somáticos. A parte aérea das plântulas contendo folhas não expandidas foi seccionada transversalmente em segmentos de aproximadamente cinco milímetros de espessura. Os segmentos foliares foram inoculados em meio de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 10 mg.L^{-1} de mio-inositol, 30 g.L^{-1} de sacarose e 9,0 g.L^{-1} de ágar. A auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi acrescentada nas concentrações de 0; 1,5 e 3,0 mg.L^{-1} .

Embriões zigóticos também foram utilizados como fonte de explantes para a indução da embriogênese somática. Os embriões zigóticos foram excisados de

sementes previamente desinfestadas conforme protocolo descrito anteriormente (cf.4.1) e inoculados em meio MS suplementado com 10 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 9,0 g.L⁻¹ de Agar e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado. A auxina 2,4-D foi adicionada nas concentrações de 0, 50 e 100 mg.L⁻¹. O pH dos meios utilizados foram ajustados para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do ágar e, em seguida, o meio foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm. de pressão.

Os subcultivos foram realizados a cada 40 dias em placas de *Petri* (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 ml de meio de cultura por placa, mantidos no escuro, em incubadora de crescimento tipo B.O.D à 25 ± 2 °C.

4.4. Análise estatística

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado. O experimento de germinação foi composto por três tratamentos (substrato de geminação) com quatro repetições. Cada repetição foi constituída por cinco embriões.

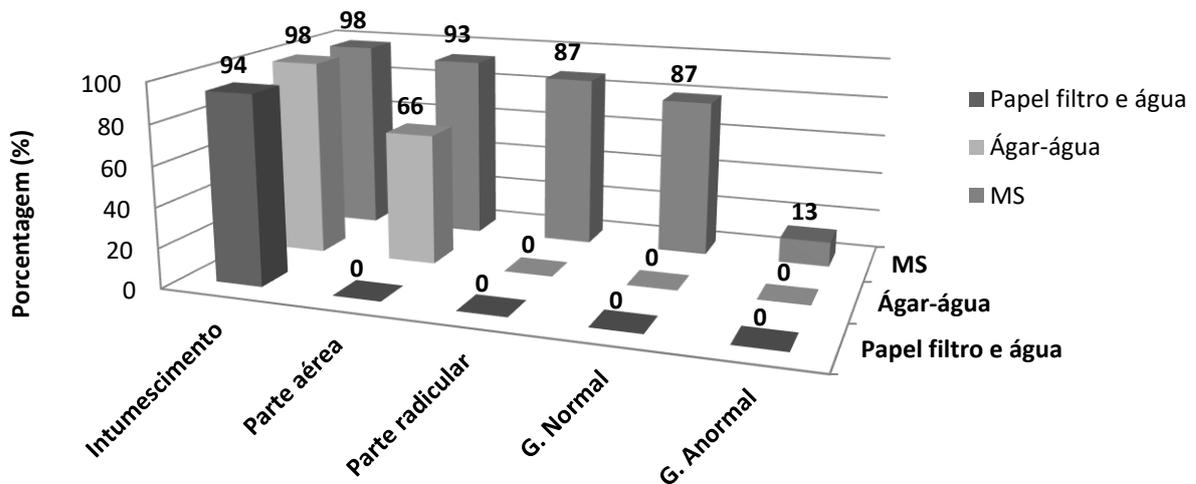
O experimento de embriogênese somática seguiu um esquema fatorial 2 x 3 (explantes e concentrações de auxina) totalizando seis tratamentos. Cada tratamento foi composto por quatro repetições contendo cinco explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (FERREIRA, D. F., 2011). Dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{0,5}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Influência do substrato na geminação *in vitro* de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* tipo branco

Em todos os experimentos de germinação testados, observou-se que os eventos germinativos iniciaram ao terceiro dia de cultivo com o intumescimento dos embriões zigóticos (EZ). No quarto dia de cultivo, os EZ apresentaram intumescimento equivalente ao dobro do tamanho original. Todos os tratamentos favoreceram o intumescimento dos embriões inoculados, com médias acima de 90% (Figura 2).

Figura 2 – Porcentagem de intumescimento, protrusão da parte aérea e radicular, germinação normal e anormal em embriões zigóticos inoculados em papel filtro e água, ágar-água e MS (Murashige e Skoog, 1962).



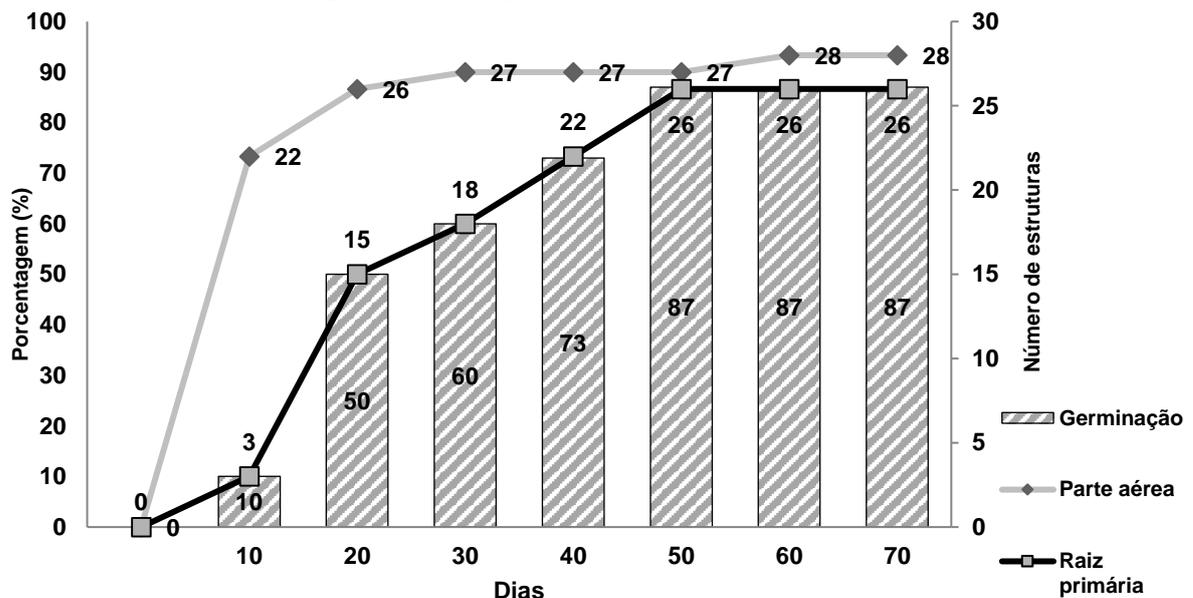
Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

A germinação dos embriões se iniciou aos dez dias e foi constatada após a protrusão da radícula, observada na região proximal (Figura 3), conforme o critério botânico (STEFANELLO; et al., 2006), embora se observe que, em muitos trabalhos com palmeiras *Attalea speciosa* (SALEH, 2016), *Butia capitata* (RIBEIRO et al., 2011), *Acrocomia aculeata* (MOURA et al., 2009), o critério adotado seja o

desenvolvimento do cotilédone. Ressalta-se que a escolha do critério de germinação se deve ao fato de muitos embriões apresentarem intumescimento, mas não continuar o desenvolvimento e emissão da radícula e/ou parte aérea, não regenerando assim, uma plântula.

As primeiras emissões de radícula foram observadas ao sétimo dia de cultivo em meio MS e ocorreram a partir da região proximal (Figura 3 e 4A). As protrusões radiculares foram verificadas em 61% dos embriões e surgiram em menor tempo em comparação aos resultados encontrados por Ledo *et al.*, (2001), que relataram as primeiras emissões de radículas aos 13 dias de cultivo (Figura 3). Já, o surgimento de raízes adventícias foi constatado ao vigésimo primeiro dia de cultivo (Figura 3).

Figura 3 – Valores acumulados de porcentagens (colunas) e do número de estruturas da parte da parte aérea (◆), de raiz primária (■) e porcentagem de germinação (colunas) até 70 dias, após o início da germinação em MS de embriões zigóticos de açaizeiro tipo branco *in vitro*.



Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Aos 30 dias de cultivo em MS, os embriões apresentaram partes aéreas (90%) e radiculares (61%) bem desenvolvidas passando a ser caracterizados como plântulas (Figura 4D). Aos 50 dias de cultivo, a germinação atingiu seu máximo (87%), observou-se a partir dos 50 dias estabilização ao não ser constatado o aumento da germinação (Figura 3). Após transferência para o ambiente com fotoperíodo, as plântulas aclorofiladas desenvolveram pigmentações clorofiladas em

suas partes aéreas e, posteriormente, exibiram coloração rosada na região próxima ao meristema, indicando a presença de antocianinas. A presença de antocianinas nos tecidos vegetais pode ocorrer como forma de proteção aos raios ultravioleta (MIAO et al., 2016).

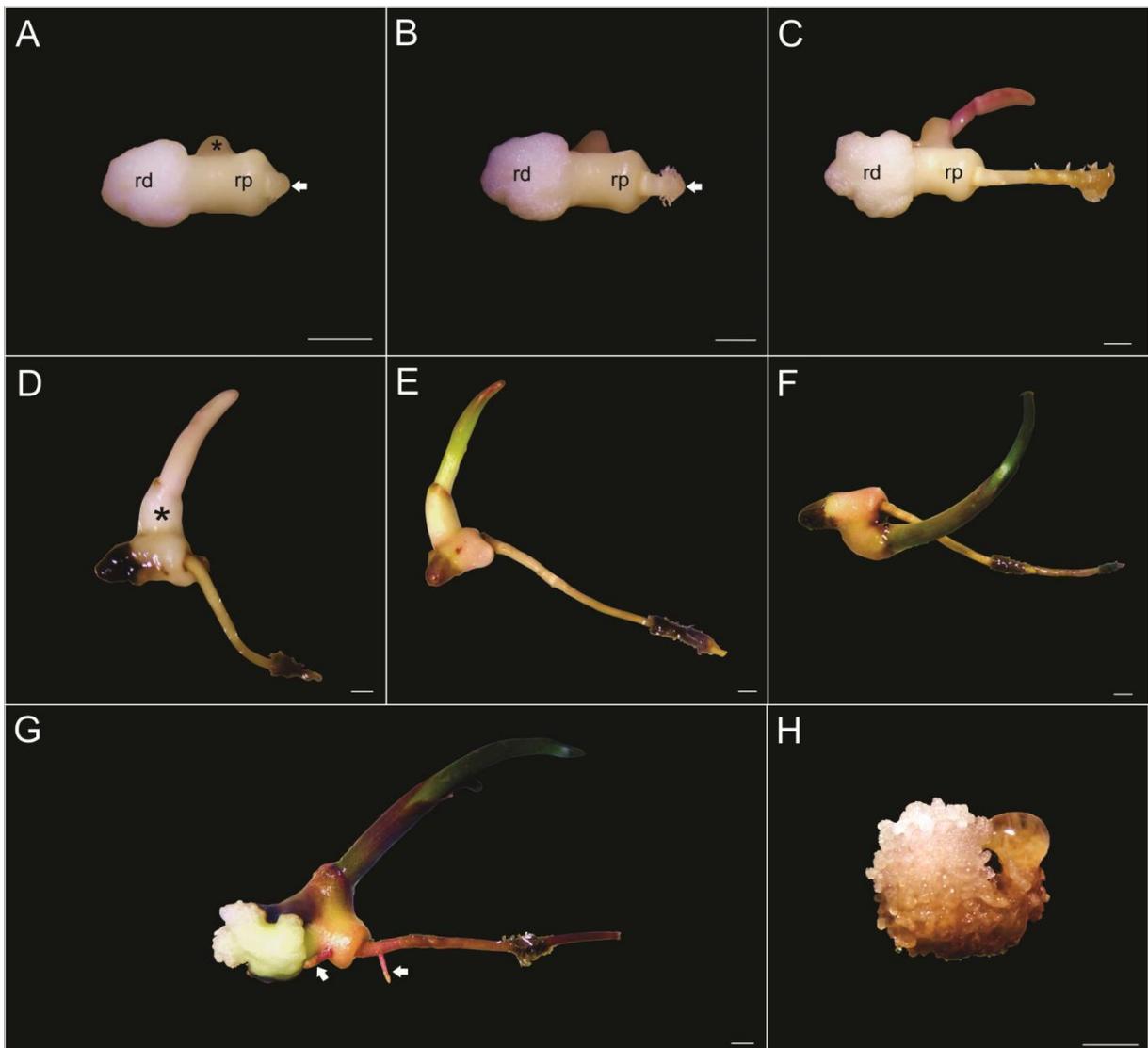
Neste mesmo período, verificou-se que os embriões zigóticos intumescidos em ágar-água, apresentaram o desenvolvimento de uma pequena estrutura cônica na superfície da região proximal (Figura 5 A-C). No entanto, esta estrutura não se desenvolveu e não foram observadas protruções de parte aérea. A estrutura cônica verificada no início da germinação também foi citada nos trabalhos de germinação de outras palmeiras como *Attaleia speciosa* Mart. ex Spreng (Saleh, 2016) e *Butia capitata* (Mart.) Becc. (Ribeiro et al., 2011).

O início da germinação dos embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* Mart. tipo branco se caracterizou a partir do intumescimento dos embriões seguido da multiplicação das células do haustório localizado na região distal do embrião nos primeiros 5 dias após o cultivo. O haustório é responsável pela mobilização de reservas para o eixo embrionário (SALEH, 2016). Em seguida, aos 7 dias após serem inoculados no meio de cultura de MS, os embriões apresentaram protruções da parte aérea em evidência na região proximal dos embriões (Figura 4A). O início do crescimento aéreo iniciou-se com a emissão do cotilédone aos 15 dias, dando origem a plúmulas envoltas pelo coleóptilo aos 30 dias, todas as estruturas ainda se encontravam aclorofiladas (Figura 4D).

As protruções da parte radicular iniciaram com a emissão dos primórdios radiculares aos 10 dias de cultivo e aos 15 dias as raízes primárias já desenvolvidas apresentaram coifa em suas extremidades (Figura 4B).

Aos 50 dias após a inoculação dos embriões zigóticos no meio de cultura, as partes áreas se mostraram clorofiladas e os haustórios oxidados. Neste mesmo período, foi possível observar a expansão das folhas verdadeiras e o aparecimento de raízes adventícias (Figura 4G).

Figura 4 – Etapas da germinação *in vitro* de embriões de açazeiro (*Euterpe oleracea* tipo branco) em meio de MS. A: Embrião zigótico intumescido na região distal, apresentando início das protrusões da parte aérea (asterisco) e radicular (seta) após 7 dias de inoculação. B: Coifa em evidência (seta) após 15 dias. C: Crescimento da parte aérea exibindo coloração rosa devido antocianinas e crescimento da radícula após 30 dias. D: Coleóptilo (asterisco) e parte aérea aclorofilada. E: Plântula com início o desenvolvimento de clorofila na parte aérea aos 50 dias de cultivo. F: Plúmula em desenvolvimento dando origem a folhas. G: Desenvolvimento de raízes adventícias (setas) e expansão das folhas da plântula. H: Germinação anormal. Abreviações: (rd) região distal; (rp) região proximal.



Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Ao longo de todo o experimento, observou-se que os EZ apresentaram oxidações que aconteceram, principalmente, na região distal (Figura 4). A

porcentagem de embriões oxidados assim como a intensidade da oxidação foi significativamente superior nos embriões inoculados em papel filtro e água (76%; nível 2,3) seguido pelo uso de meio de Murashige e Skoog (1962) (MS) (36%; nível 1,4) e ágar-água (29%; nível 1,1) (Tabela 1). A oxidação dos tecidos também contribuiu para que não ocorresse germinação nos embriões inoculados em ágar-água e papel filtro e água.

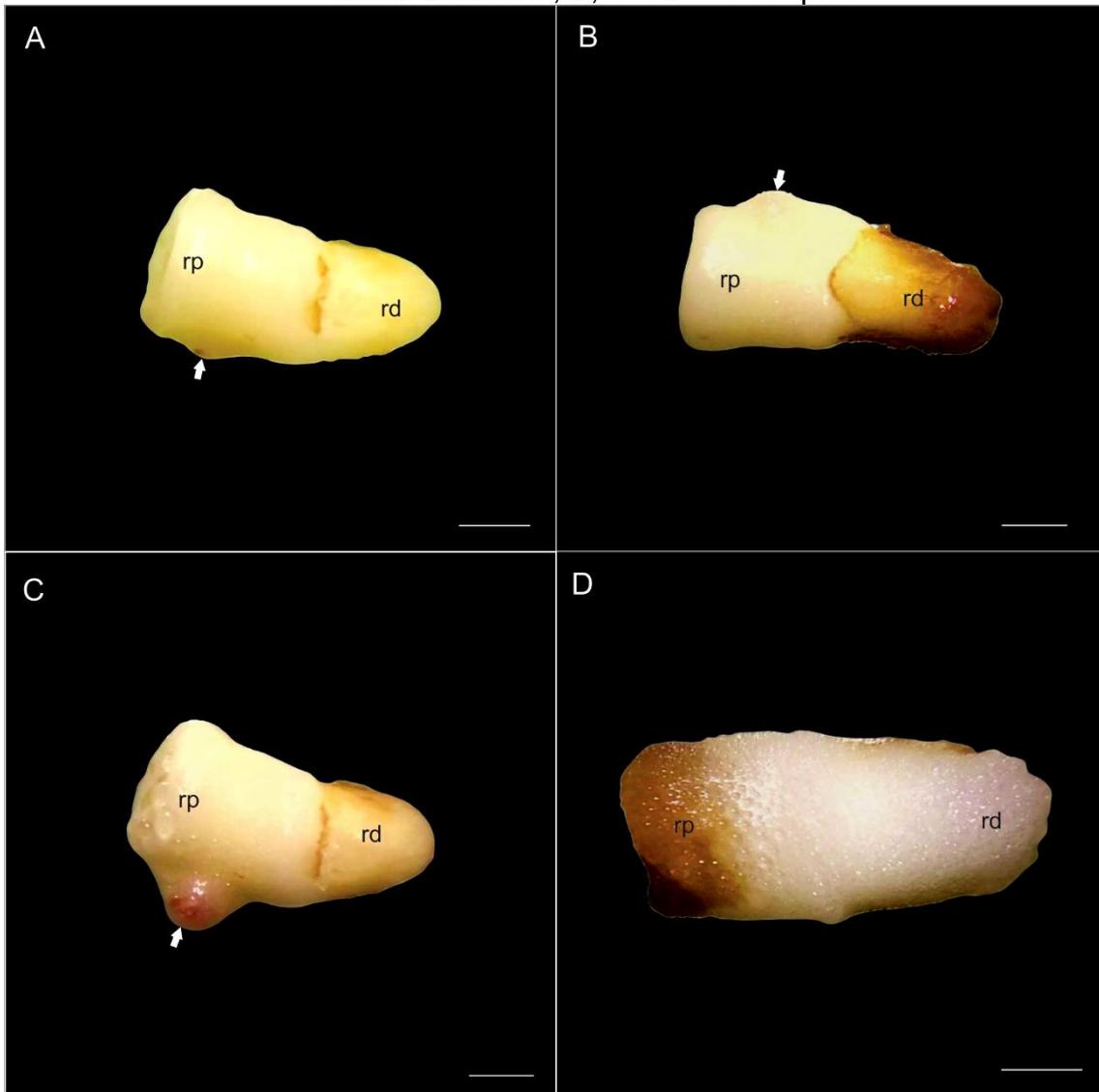
Tabela 1 – Porcentagem e níveis de oxidação dos embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* tipo branco inoculados em papel filtro e água, ágar-água e meio de Murashige e Skoog (1962).

Tratamento de germinação	Embriões oxidados (%)	Níveis de oxidação
Papel filtro e água	76 a	2,3 a
Ágar-água	29 b	1,1 c
MS	36 b	1,4 b
Média	46,8	1,6

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

Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Figura 5 – Etapas morfológicas da germinação de embriões zigóticos (EZ). em meio ágar-água. A: EZ com início de oxidação na região distal e início da formação da estrutura cônica (seta). B: EZ apresentando oxidação nível 2 na região distal e desenvolvimento da estrutura cônica. C: EZ apresentando estrutura cônica em evidência (seta) e oxidação nível 1 na região distal. D: EZ não viável apresentando oxidação nível 2 na região proximal. Abreviações: (rp) região proximal; (rd) região distal. Barras: A, B, C e D = 1000 μ m.



Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Ao final do experimento, verificou-se que somente os embriões inoculados em meio de MS apresentaram germinação normal, ou seja, com protrusão de radícula e de parte aérea. A anormalidade na germinação também foi observada em MS

(13%). Considerou-se anormais os embriões zigóticos que intumesceram, desenvolveram massas celulares, porém não regeneraram plântula.

A ausência de germinação observada nos embriões inoculados em papel filtro e agar-água pode estar relacionada a necessidade de maior energia para iniciar os processos germinativos como observado por Ribeiro et al., (2011) no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia capitata* (Mart.) Becc. Esses autores verificaram que os embriões cultivados em meio isento de sacarose apresentaram oxidação. Outro fator a ser considerado é a isenção de sais minerais nestes tratamentos que pode ter levado a ausência de germinação dos embriões. No entanto, o trabalho de Bellintani et al., (2007) com *OrthoPHYTUM mucugense* e *Neoregelia mucugensis* apresentou porcentagens de germinação semelhantes entre os tratamentos utilizando meio MS e agar-água. Já com a espécie *O. mucugense* o tratamento com agar-água foi superior em termos de germinabilidade em comparação ao meio MS.

Serão necessários estudos complementares para testar outros meios de cultivo que possibilitem maiores taxas de germinação *in vitro* para *Euterpe oleraceae* Var. Branco.

5.2. Embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart. tipo branco)

Embriões zigóticos (EZ) de açazeiro foram inoculados em meio de cultura contando diferentes concentrações de auxinas para indução de calos embriogênicos. Em todos os tratamentos, os EZ mostraram respostas morfológicas nos primeiros 15 dias de cultivo, caracterizada pelo intumescimento do EZ (Figura 6 e 7A). Em meio desprovido de carvão ativado, também foi observado a oxidação dos embriões como resposta inicial (Figura 6B e 7A e B). Essas respostas são comuns durante a indução em palmeiras, como alguns autores descreveram em *Acrocomia aculeata* (Luis, 2013) e (Moura et al., 2009), *Bactris gasipaes* (Steinmacher et al., 2007), *Elaeis oleifera* (Lima, 2018) e *Elaeis guineenses* (Carvalho; Luis; Scherwinski-Pereira, 2012).

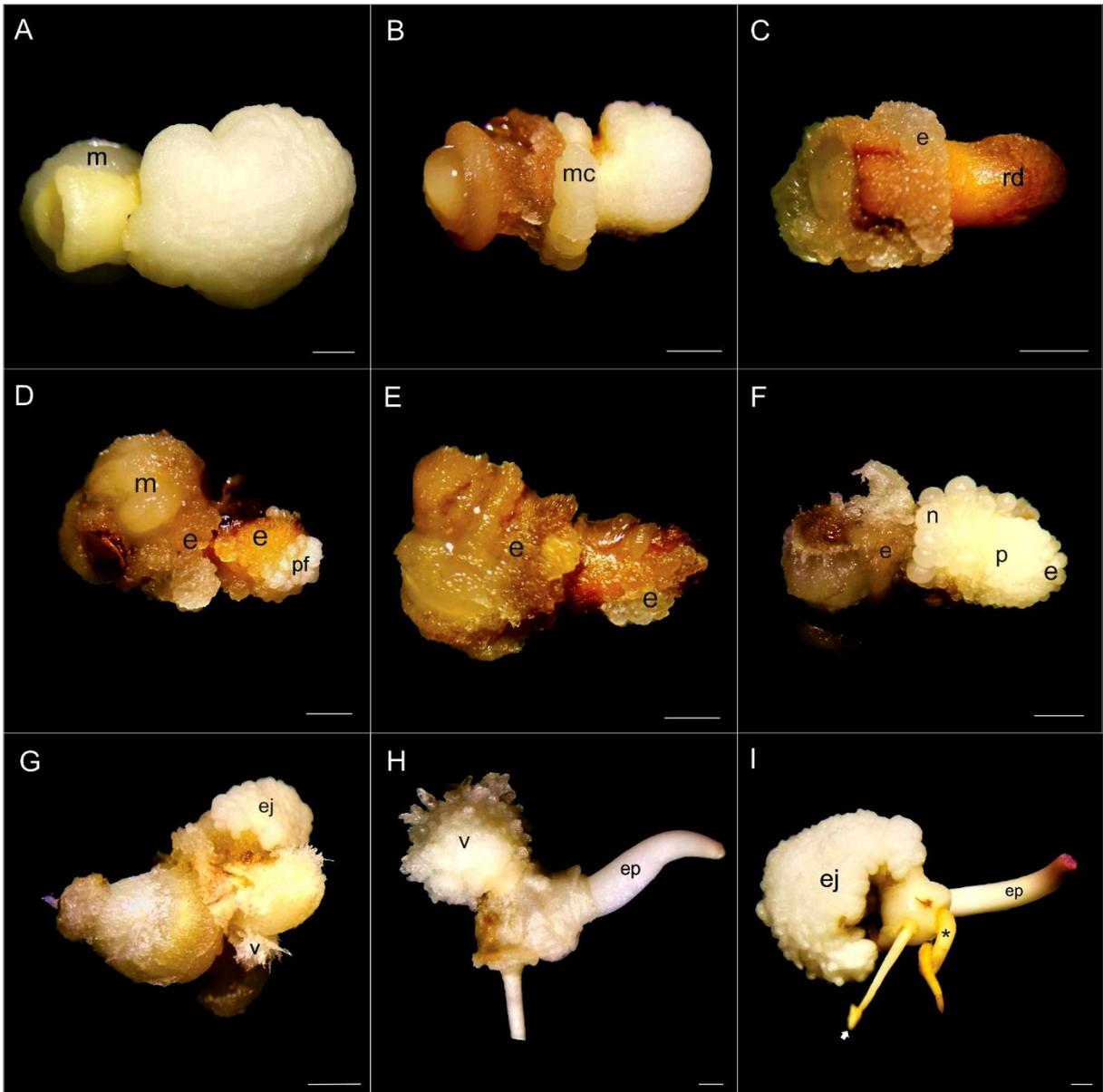
Aos 30 dias de cultivo, os EZ cultivados no tratamento controle com carvão ativado (80%) e sem carvão ativado (70%) emitiram parte aérea e foi possível

observar o surgimento de calos esponjosos nos cotilédones das plântulas (Figura 6 e 7I).

Neste mesmo período, na concentração de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D houve aumento do número de calos nodulares de 10% para 25% e de calos primários de 10% para 30%. Calos nodulares são estruturas que apresentam intensas divisões celulares e de formação de regiões meristemáticas que na maioria das vezes dão origem a calos embriogênicos (SALEH, 2016). Verificou-se também o surgimento de 50% de calos embriogênicos e 40% de calo friável. Na concentração de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D observou-se 40% de calo do tipo nodular, 25% de calo primário, 70% de calo embriogênico (Figura 7) composto por protoderme, feixes procambiais, células parenquimáticas e futuro feixe embrionário (LUIS, 2013).

O surgimento de calos primários nos EZ de *Euterpe oleracea* aos 30 dias de cultivo também foi observado nas palmeiras *Acrocomia aculeata* (Luis; Scherwinski-Pereira, 2014) e *Elaeis spp.* (Balzon, 2017). Já a calos friáveis foram observados em embriões zigóticos de manicoré (*Elaeis guineensis* (Jacq) x *E. oleifera*) por Bonetti, (2015).

Figura 6 – Aspecto da embriogênese somática induzida a partir de embriões zigóticos de açazeiro (*Euterpe oleracea* tipo branco) em meio contendo carvão ativado. A: Calo mucilaginoso na região proximal e compacto na região distal aos 15 dias de cultivo. B: Calo nodular compacto na região do mesocótilo e oxidação da região proximal do explante, após 30 dias em de cultivo. C: Calo embriogênico na região proximal do explante e intensa oxidação da região distal. D: Calo mucilaginoso, embriogênico, calos friáveis e primários aos 50 dias de cultivo. E: Estruturas embriogênicas em evidência. F: Calos primários, embriogênicos e nodulares aos 70 dias em 2,4-D. G: Embrião zigótico com aspecto desidratado apresentando calo vitrificado e esponjoso. H: Calo vitrificado no cotilédone da plântula. I: Germinação em tratamento controle apresentando calo do tipo esponjoso no cotilédone. Abreviações: (e) Calo embriogênico, (ej) Calo esponjoso, (ep) Epicótilo, (f) Calo friável, (m) Calo mucilaginoso, (mc) mesocótilo, (n) Calo nodular, (p) Calo primário, (rd) Região distal, (v) Calo vitrificado. Barras: A, B, C, D, E, F, G, H e I: $1000 \mu\text{m}$.



Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

No experimento com carvão ativado, 80% dos embriões zigóticos germinaram no tratamento controle, ou seja, apresentaram formação de raízes. No experimento isento de carvão ativado, a taxa de germinação foi 75%.

Aos 70 dias após a inoculação, os explantes apresentaram diferentes formações morfológicas de calos que podem ser observados na tabela 2.

No experimento sem carvão ativado, observou-se a formação máxima de 28% de calos primários na concentração de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, valor significativo em relação às demais concentrações testadas neste experimento (Tabela 2). A

formação de calos embriogênicos ocorreu em ambas as concentrações de 2,4-D testadas, não existindo diferenças significativas entre elas. Calos embriogênicos são constituídos por células meristemáticas que adquirem a rota embriogênica, formando embriões somáticos por meio de intensa atividade mitótica (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

No experimento contendo carvão ativado, as concentrações de auxina testadas não diferiram em relação a formação de calo primário, contudo, para a variável calo embriogênico, a maior concentração de 100 mg.L⁻¹ proporcionou formação significativamente superior. A diferença observada entre os experimentos se deve a presença de carvão ativado, que possui ação adsorvente, diminuindo a disponibilidade de auxina do meio para o explante (COSTA et al., 2006; NUNES et al., 2008).

Ressalta-se que o surgimento de calos com características embriogênicas foi observado posteriormente ao surgimento de calos primários. Tal comportamento é o esperado e corrobora os resultados obtidos nos estudos com as palmeiras *Elaeis guineensis* (Silva et al., 2014), *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Granja et al., 2018) e *Elaeis guineensis* Jacq. (Texeira; Sondahl; Kirby, 1993) e (Scherwinski-pereira, et al., 2010).

A formação média de calo nodular em meio contendo carvão ativado não diferiu significativamente dos resultados obtidos em meio desprovido de carvão (Tabela 2 e 3). A média geral de calo nodular obtida neste estudo foi similar a observada para *Elaeis oleifera* por Lima (2018). Por outro lado, no trabalho com *Acrocomia aculeata*, Padilha (2013) observou que não houve surgimento de calo nodular até 180 dias de cultivo em meio contendo a auxina picloram. A formação de calo nodular é comum em estudos de embriogênese somática em palmeiras e são caracterizados por possuírem morfologia arredondada e superfície brilhante. Segundo Luis; Scherwinski-Pereira, (2014) e Saleh, (2016), calos nodulares são formados por células meristemáticas em intensa divisão celular, possuem feixes procambiais e protoderme.

Tabela 2 – Influência das concentrações da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em meio com carvão ativado na indução de diferentes tipos de calos induzidos a partir de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* tipo branco.

	Tratamentos (mg. L ⁻¹)	Calo esponjoso (%)	Calo mucilaginoso (%)	Calo nodular (%)	Calo vitrificado (%)	Calo primário (%)	Calo embriogênico (%)	Calo friável (%)
Carvão ativado (mg.L-1)	0	16,2 a	0,0 a	1,2 b	0,0 a	2,5 c	0,0 c	0,0 b
	50	20 a	1,2 a	10,0 b	5,0 a	13,7 b	25 b	3,7 b
	100	1,2 b	1,2 a	26,2 a	6,2 a	16,2 b	57,5 a	2,5 b
Carvão ativado	Média	12,5 a	0,8 a	12,5 a	3,7 a	10,8 a	27,5 a	2,0 b

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

Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Tabela 3 – Influência das concentrações da auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em meio sem carvão ativado na indução de diferentes tipos de calos induzidos a partir de embriões zigóticos de *Euterpe oleracea* tipo branco.

	Tratamentos (mg.L ⁻¹)	Calo esponjoso (%)	Calo mucilaginoso (%)	Calo nodular (%)	Calo vitrificado (%)	Calo primário (%)	Calo embriogênico (%)	Calo friável (%)
Sem carvão ativado (mg.L⁻¹)	0	3 b	0 a	0 b	8 a	1 c	0 b	0 b
	1,5	1 b	3 a	14 b	3 a	20 b	48 a	0 b
	3	4 b	1 a	23 a	6 a	28 a	48 a	9 a
Sem carvão ativado	Média	3 b	1 a	12 a	5 a	16 b	32 a	6 a

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

Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Observaram-se diferenças significativas nas taxas médias de oxidação entre os experimentos com e sem carvão ativado. A média de oxidação do experimento desprovido de carvão ativado foi 42%, valor significantemente superior aos alcançados no experimento contendo por carvão ativado 21% (Tabela 4). Estes resultados estão de acordo com os observados no trabalho de Ferreira, F. F., (2012) com *Astrocaryum aculeatum* (ARECACEAE) onde foi comparado o cultivo em meio desprovido de antioxidantes e compostas por carvão ativado apresentaram diferenças significativas na variável oxidação. O efeito antioxidante do carvão ativado visto no presente trabalho, também foi observado no trabalho de Costa et al. (2006) com bananeira cv. Grande Naine (AAA) e com cultivares de *Rubus idaeus* L. de Fagundes et al. (2017), onde o tratamento com carvão ativado apresentou níveis de oxidação significantemente inferiores ao tratamento isento de carvão ativado.

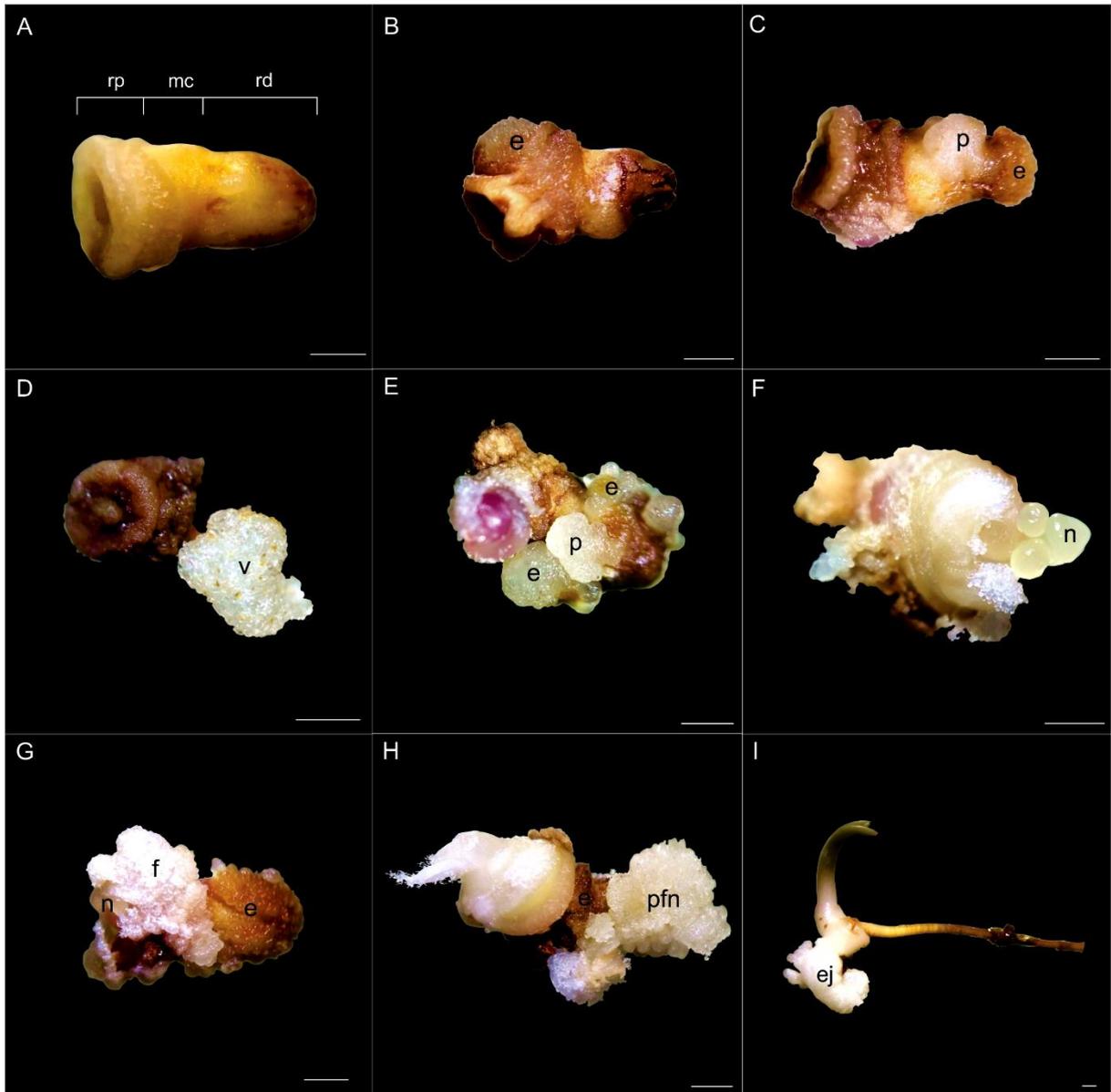
Tabela 4 – Porcentagem de oxidação nos embriões zigóticos de *Eutерpe oleracea* tipo branco submetidos as concentrações de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nos experimentos com carvão e sem carvão ativado.

Carvão		Sem carvão	
0 C	11,2 b	0 C	21,2 b
100	41,8 a	1,5	53,7 a
50	10,0 b	3	51,8 a
Média	21,0	Média	42,2

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

Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Figura 7 – Aspecto da embriogênese somática induzida a partir de embriões zigóticos de açaizeiro (*Eutерpe oleracea* tipo branco) em meio de indução sem carvão ativado. A: Embrião zigótico apresentando intumescimento da região proximal após 15 dias no tratamento 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D. B: Início da formação de calos embriogênicos na região do mesocótilo. C: Formação de calo primário e embriogênico na região distal aos 30 dias de cultivo. D: Calo Vitrificado em evidência. E: Aos 45 dias de cultivo, embrião zigótico apresentando calo primário e embriogênico. F: Calo nodular em evidência. G: Embrião zigótico com formação de calo friável, nodular e embriogênico. H: Calos embriogênicos na região do mesocótilo e calo primário, friável e nodular após 60 dias de imersão no meio com 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D. I: Detalhes da germinação em meio desprovido de reguladores apresentando calo do tipo esponjoso na região distal. Abreviações: (e) Calo embriogênico, (ej) Calo esponjoso, (f) Calo friável, (n) Calo nodular, (p) Calo primário, (v) Calo vitrificado. Barras: A, B, C, D, E, F, G, H e I: 1000 µm.



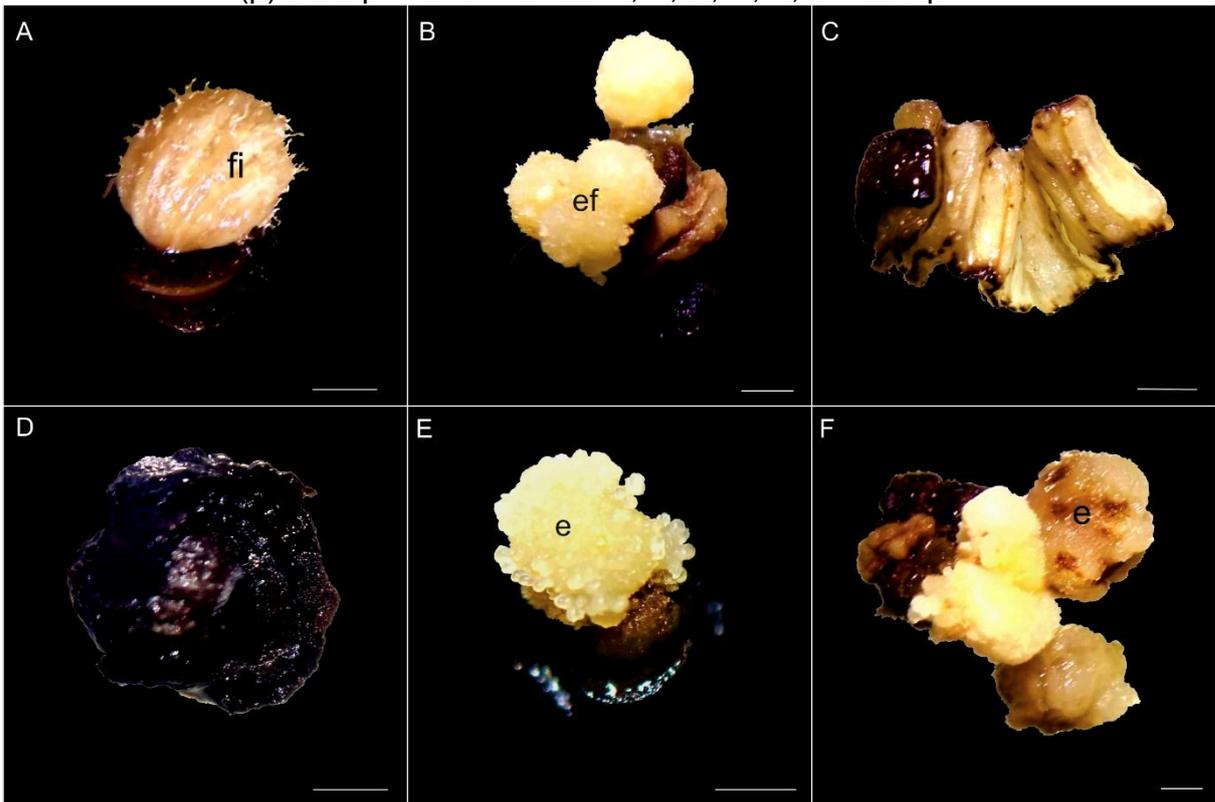
Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

5.3. Embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas *in vitro* de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart. tipo branco)

As folhas de plântulas obtidas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro foram utilizadas como fonte de explantes para esse experimento. Após 15 dias de cultivo em meio MS, suplementado com 0; 1,5 e 3,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, os seguimentos foliares não apresentaram intumescimento e mostraram-se oxidados

na cor marrom claro. Foi possível observar a formação de calos primários e o desenvolvimento de folhas internas (Figura 8) nos três tratamentos.

Figura 8 – Aspecto da embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro* de açaizeiro (*Euterpe oleracea* tipo branco). A: Emergência de folha interna. B: Calos embriogênicos friável aos 140 dias após a imersão no meio. C: Folha interna expandida aos 170 dias de cultivo. D: Explante totalmente oxidado. E: Calos embriogênicos formados a partir da folha interna. F: Calos embriogênicos após 190 dias no tratamento com $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. Abreviações: (e) Calos embriogênicos, (ef) Calo embriogênico friável, (f) Calo friável, (p) Calo primário. Barras: A, B, C, D, E, F: $1000 \mu\text{m}$.



Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Os níveis de oxidação nesse experimento foram altos e com isso a formação de calos embriogênicos foi de 11%. Em *Acrocomia aculeata* os altos níveis de oxidação nos segmentos foliares foi fator determinante para o não surgimento de calos nos trabalhos de Meira (2015) e Luis (2013) que não obtiveram a formação de calos embriogênicos utilizando a auxina 2,4-D. Em *Phoenix dactylifera* L. Kurup *et al.* (2014) foi alcançada taxa significativamente maior de 73,3% no meio na concentração de 100 mg.L^{-1} de 2,4-D referente a calos embriogênicos quando comparado ao tratamento desprovido de carvão ativado e concentração de 10 mg.L^{-1} de 2,4-D que alcançou apenas 14,2%.

Tabela 5 – Influência da concentração da auxina 2,4-diclorofenoxiacético no intumescimento e oxidação dos segmentos foliares obtidos de plântulas *in vitro* de *Euterpe oleracea* Mart. tipo branco

Concentração de 2,4-D (mg L⁻¹)	Intumescimento (%)	Oxidação (%)
0	33 a	56 a
1,5	33 a	63 a
3	25 a	50 a
Média	31	56

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

Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

Aos 190 dias após a inoculação dos seguimentos foliares, foi notado 9% de calos primários e 0,2% de calo friável nos explantes, não apresentando diferença estatística da taxa de calos primários e friáveis entre os tratamentos (Tabela 6). A oxidação chegou a 56% no experimento, devido isso não foi constatado nenhum embrião somático (Tabela 5).

Tabela 6 – Formação de calos (%) em explantes foliares de *Eutepa oleracea* tipo branco inoculados em concentrações baixas de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Concentração de 2,4-D (mg L⁻¹)	Calo primário (%)	Calo embriogênico (%)	Calo Friável (%)	Folha interna (%)
0	4 a	0 b	1 a	19 a
1,5	13 a	19 a	0 a	6 b
3	9 a	13 a	0 a	10 b
Média	9	11	0	12

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

Fonte: Autor da pesquisa, 2018.

6. CONCLUSÃO

- O substrato mais favorável para a germinação de embriões zigóticos de açaizeiro é o Murashige e Skoog, 1962;
- A germinação de embriões zigóticos (EZ) de açaizeiro, se inicia com o intumescimento total do embrião zigótico seguido da protrusão da parte aérea. Em seguida os embriões zigóticos apresentam oxidações em suas regiões distais. A protrusão da parte radicular acontece após as três etapas citadas acima. A parte aérea se caracteriza em plúmula formando as folhas;
- Embriões zigóticos são explantes mais responsivos quanto a formação de calos embriogênicos quando comparados com seguimentos foliares jovens obtidos de plântulas regeneradas *in vitro*;
- A embriogênese somática em EZ de açaizeiro inicia-se com o intumescimento dos explantes seguido do surgimento de calos primários e nodulares que se diferenciam em calos embriogênicos. O aparecimento de calos friáveis, vitrificados, mucilaginosos e esponjosos foi constatado, no entanto, esses não houve formação de calos embriogênicos a partir destes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. F. P. DE. **Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart .) e atemoia (*Annona squamosa* L . x *Annona cherimola* Mill .) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae.** Tese, [s.l.], nº March 2009, 2009.
- ARAUJO, D. do N. **ANÁLISE DOS FATORES DE COMPETITIVIDADE DA CADEIA PRODUTIVA DA POLPA DO AÇAÍ DO NORDESTE PARAENSE.** *Journal of Personality and Social Psychology*, [s.l.], v. 1, nº 1, p. 179, 2017. ISBN: 1053-8100, ISSN: 0092-6566, DOI: 10.1111/j.1469-7610.2010.02280.x.
- BALICK, M. J. **Systematics and economic botany of the *Oenocarpus-Jessenia (Palmae)* complex.** *Advances in Economic Botany*, [s.l.], v. 3, p. 1–140, 1986. ISBN: 0893273112.
- BALZON, T. A. **Aperfeiçoamento da embriogênese somática, reprodução e análise molecular de retrocruzamentos interespecíficos em palma de óleo (*Elaeis spp.*).** v. 1, 123 p. - UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, 2017.
- BELLINTANI, M. C. et al. **Estabelecimento in vitro de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil.** *Revista Brasileira de Biociências*, [s.l.], v. 5, p. 1101–1103, 2007.
- BENTES, E. dos S.; HOMMA, A. K. O.; SANTOS, C. A. N. Dos. **Exportações de polpa de açaí do Estado do Pará: situação atual e perspectivas.** *Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*, [s.l.], v. 1, p. 18, 2017.
- BONETTI, K. A. D. P. **GERMINAÇÃO IN VITRO E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO HÍBRIDO DE DENDEZEIRO BRS MANICORÉ (*Elaeis guineensis* (Jacq) x *E. oleifera*).** 97 p. - Universidade Federal do Paraná, 2015.
- BRONDÍZIO, E. **The Amazonian Caboclo and the Açaí palm: Forest Farmers in the Global Market.** [s.l.]: Departamento de Jardim Botânico de Nova York, 2008.
- CALZAVARA, B. B. G. **As possibilidades do açaizeiro no estuário amazônico.** FCAP. [s.l.]: [s.n.], 1972. 103 p.
- CANTO, S. A. E. **Processo Extrativista do Açaí: Contribuição da Ergonomia com Base na Análise Postural Durante a Coleta dos Frutos.** 114 p. - Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.
- CARVALHO, J. E. U. DE; NASCIMENTO, W. M. O. DO. **Technological innovations in the propagation of Açaí palm and Bacuri.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, [s.l.], v. 40, nº 1, 2018. ISSN: 1806-9967, DOI: 10.1590/0100-29452018679.
- CARVALHO SILVA, R.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.).** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [s.l.], 2012. ISBN: 1124001201705, ISSN: 01676857, DOI: 10.1007/s11240-012-0170-5.

COSTA, F. H. D. S. et al. **EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE CARVÃO ATIVADO E N6 -BENZILAMINOPURINA NA PROPAGAÇÃO IN VITRO DE BANANEIRA, CV. GRAND NAINÉ (AAA)**. *Rev. Bras. Frutic.*, [s.l.], v. 28, p. 280–283, 2006. ISSN: 10000054.

FAGUNDES, C. de M. et al. **Carvão ativado no estabelecimento in vitro de cultivares de framboeseira**. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, [s.l.], v. 16, nº 4, p. 406–413, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.5965/223811711642017406>.

FARIAS NETO, J. T. et al. **Variabilidade Genética Em Progênes Jovens De Açaizeiro**. *Revista Cerne*, [s.l.], v. 11, p. 336–341, 2005.

FEHÉR, A. **The initiation phase of somatic embryogenesis: What we know and what we don't**. In: *Acta Biologica Szegediensis*. [s.l.]: [s.n.], 2008. ISBN: 1588-385X, ISSN: 1588385X.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. *Ciência e Agrotecnologia*, [s.l.], v. 35, nº 6, p. 1039–1042, 2011. ISBN: 1413-7054, ISSN: 1413-7054, DOI: 10.1590/S1413-70542011000600001.

FERREIRA, F. F. **GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (Astrocaryum aculeatum MEYER ARECACEAE)**. 61 p. - Universidade Federal do Amazonas, 2012.

FREITAS, I. D. O. **MORFOANATÔMICAS E POR CITOMETRIA DE FLUXO EM AÇAIZEIRO (Euterpe oleracea Mart .) MORFOANATÔMICAS E POR CITOMETRIA DE FLUXO EM AÇAIZEIRO (Euterpe oleracea Mart .)**. 73 p. - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2014. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/17665/1/2014_ElineadeOliveiraFreitas_Parcial.pdf>. Acesso em: 18/out./17.

GRANJA, M. M. C. et al. **Explant origin and culture media factors drive the somatic embryogenesis response in Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart., an emerging oil crop in the tropics**. *Industrial Crops and Products*, [s.l.], v. 117, nº March, p. 1–12, 2018. ISSN: 09266690, DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.02.074.

GUEYE, B. et al. **Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [s.l.], 2009. ISSN: 01676857, DOI: 10.1007/s11240-009-9573-3.

HENDERSON, A. **The genus Euterpe in Brazil**. *Sellowia*, [s.l.], 2000. ISSN: 0375-1651.

HENDERSON, A.; GALEANO, G. **Euterpe, Prestoea and Neonicholsonia (Palmae : Euterpeinae)**. 72 ed. New York: New York Botanical Garden, 1996. ISBN: 9780893274092.

HOMMA, A. K. O. et al. **AÇAÍ: NOVOS DESAFIOS E TENDÊNCIAS**. *Amazônia: Ci.*

& *Desenv.*, [s.l.], v. 1, n° 2, p. 113–127, 2006.

_____. **Programa de Desenvolvimento da Cadeia Produtiva do Açaí no Estado do Pará - PROAÇAÍ – PA.** Belém: Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e da Pesca, 2016., [s.l.], p. 71, 2016.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** *Levantamento sistemático da produção agrícola*, [s.l.], v. 29, n° 1, p. 1–83, 2015. ISBN: 0103-443X, DOI: ISSN 0103-443X.

JARDIM, M. A. G.; OLIVEIRA, F. G. **Morfologia floral de duas etnovariedades de *Euterpe oleracea* Mart . do estado do Pará.** *Biota Amazonia*, [s.l.], v. 4, n° 4, p. 6–9, 2014. ISSN: 21795746, DOI: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n4p6-9.

JEFFREY, C.; CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants.** *Kew Bulletin*, [s.l.], 1984. ISBN: 0231038801, ISSN: 00755974, DOI: 10.2307/4108577.

JONES, D. L.; DRANSFIELD, J. **Palms throughout the world.** Smithsonian ed. Washington: Reed Books Chatswood, 1995. 410 p.

KURUP, S. S. et al. **Rapid in vitro regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Kheneizi using tender leaf explant.** *Emirates Journal of Food and Agriculture*, [s.l.], 2014. ISSN: 20790538, DOI: 10.9755/ejfa.v26i6.18051.

LAKSHMANAN, P. **Somatic embryogenesis in sugarcane—An addendum to the invited review ‘sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities,’ in vitro cell.** *Dev. Biol. Plant* **41(4):345–363; 2005. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, [s.l.], v. 42, n° 3, p. 201–205, 2006. ISBN: 1054-5476, ISSN: 1054-5476, DOI: 10.1079/IVP2006772.**

LEDO, A. et al. **Cultura in vitro de embriões zigóticos de açaizeiro.** *Embrapa Acre*, [s.l.], v. 23, n° 271, p. 468–472, 2001. ISSN: 0100-2945, DOI: 10.1590/S0100-29452001000300003.

LEDO, A. da S. et al. **Somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Euterpe oleracea* Mart.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, [s.l.], v. 24, n° 3, p. 601–603, 2002. ISSN: 0100-2945, DOI: 10.1590/S0100-29452002000300004.

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O. A.; MENEZES, li. C. **Embriogênese Somática e Regeneração de Plantas em Açaizeiro.** *Embrapa Acre*, [s.l.], v. 1, p. 23, 2002.

LIMA, S. cristina de sousa. **ASPECTOS MORFOANATÔMICOS DA SEMENTE DE CAIAUÉ *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés E EVENTOS DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.** 97 p. - Universidade Federal do Amazonas, 2018.

LUIS, Z. G. **Estratégias para a embriogênese somática e conservação ex situ de germoplasma de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]**

Universidade de Brasília, [s.l.], p. 136, 2013.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. **An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [s.l.], 2014. ISSN: 01676857, DOI: 10.1007/s11240-014-0500-x.

MACEDO, M. **Contribuição ao estudo de plantas econômicas no Estado de Mato Grosso.** UFMT. [s.l.]: [s.n.], 1995. 70 p.

MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Additives.** *Anthocyanins As Food Colors*. [s.l.]: [s.n.], 1982. ISBN: 9780124725508, ISSN: 0124-7255, DOI: 10.1016/B978-0-12-472550-8.50013-5.

MARTINS-CORDER, M. P.; SALDANHA, C. W. **GERMINAÇÃO DE SEMENTES E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS.** *Revista Árvore*, [s.l.], v. 30, p. 353–361, 1999.

MEIRA, F. S. **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) A PARTIR DE TECIDOS FOLIARES DE PLANTAS ADULTAS.** [s.l.], p. 88, 2015.

MIAO, L. et al. **Colored light-quality selective plastic films affect anthocyanin content, enzyme activities, and the expression of flavonoid genes in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit.** *Food Chemistry*, [s.l.], v. 207, p. 93–100, 2016. ISBN: 0308-8146, ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.077.

MOURA, E. F. et al. **Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos.** *Scientia Horticulturae*, [s.l.], 2009. ISBN: 0304-4238, ISSN: 03044238, DOI: 10.1016/j.scienta.2008.08.033.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.** *Physiologia Plantarum*, [s.l.], 1962. ISBN: 0031-9317, ISSN: 13993054, DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

NASCIMENTO, W. M. O. Do; CARVALHO, J. E. U. De; OLIVEIRA, M. do S. P. De. **Produção de Mudas de Açaizeiro a partir de Perfilhos.** *Belém: Embrapa Amazônia*, [s.l.], v. Comunicado, p. 4, 2011.

NETO, J. T. D. F.; VASCONCELOS, M. A. M.; SILVA, F. C. F. Da. **Cultivo, Processamento, Padronização E Comercialização Do Açaí Na Amazônia.** *FRUTAL AMAZÔNIA/X Flor Pará*, [s.l.], p. 1–113, 2010.

NOGUEIRA, O. L. **Regeneração, manejo e exploração de açaizais nativos de várzea do estuário amazônico.** *Universidade Federal do Pará*, [s.l.], p. 157, 1997.

NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; MÜLLER, A. A. **Açaí.** *Embrapa Amazônia Oriental*, [s.l.], v. 4, p. 137, 2005.

NUNES, C. F. et al. **Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de**

pinhão-manso. *Pesq. agropec. bras.*, [s.l.], v. 43, n° 1, p. 9–14, 2008. ISSN: 0100-204X, DOI: 10.1590/S0100-204X2008000100002.

OLIVEIRA, M. do S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O. **AÇAÍ (Euterpe oleracea Mart.).** *Embrapa Amazônia Oriental*, [s.l.], p. 49, 2000.

OLIVEIRA, M. do S. P. De et al. **Cultivo do açaizeiro para produção de frutos.** *Circular Técnica, Embrapa Amazônia Oriental*, [s.l.], v. 26, n° 1, p. 1, 2002. ISBN: ISSN 1517-211X.

OLIVEIRA, M. do S. P.; NETO, J. T. de F.; QUEIROZ, J. A. L. **AÇAIZEIRO: CULTIVO E MANEJO PARA PRODUÇÃO DE FRUTOS.** *Embrapa Amazônia Oriental*, [s.l.], p. 22, 2015.

OLIVERA FREITAS, E. et al. **Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos of the açaí palm (Euterpe oleracea): Induction of embryogenic cultures, morphoanatomy and its morphological characteristics.** *Scientia Horticulturae*, [s.l.], v. 212, p. 126–135, 2016. ISSN: 03044238, DOI: 10.1016/j.scienta.2016.09.044.

PADILHA, J. H. D. **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM Acrocomia aculeata (JACQ.) LODD. EX MART. UTILIZANDO A TÉCNICA DO TCL (“THIN CELL LAYER”).** 68 p. - Universidade Federal do Paraná, 2013.

PRANCE, G.T.; SILVA, M. F. da. **Árvores de Manaus.** *Embrapa Roraima (CPAF-RR)*, [s.l.], p. 312, 1975. ISSN: 00030996.

RIBEIRO, L. M. et al. **Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento in vitro de coquinho-azedo.** *Rev. Ceres*, [s.l.], v. 58, n° 2, p. 133–139, 2011.

RODRIGUES, R. B. et al. **Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], 2006. ISBN: 0021-8561 (Print)r0021-8561 (Linking), ISSN: 00218561, DOI: 10.1021/jf058169p.

ROGEZ, H. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação.** [s.l.]: EDUFPA, 2000. 300 p. ISBN: 9788524702020.

ROOSMALEN, M. G. M. VAN. **Fruits of the Guianan flora.** *Institute of Systematic Botany and Silvicultural Department of Wageningen Agricultural University*. [s.l.]: [s.n.], 1985. 483 p. ISBN: 9090009884.

SALEH, E. O. L. **Fisiologia da germinação in vitro, embriogênese somática e conservação ex situ de babaçu (Attalea speciosa Mart. ex Spreng).** 133 p. - UnB, 2016.

SANCHES, E. de N. M.; OLIVEIRA, M. do S. P. **CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE AÇAÍ BRANCO POR MARCADORES RAPD.** *15º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA*. 2011.

SANTANA, A. L. De. **Tecnologias para inovação nas cadeias Euterpe**. In: PESSOA, J. D. C.; TEIXEIRA, G. H. D. A. (Orgs.). Brasília: [s.n.], 2012. 344 p. ISBN: 9788570350893.

SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny E. et al. **Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique**. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, [s.l.], 2010. ISBN: 1054-5476, ISSN: 10545476, DOI: 10.1007/s11627-010-9279-6.

SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson et al. **Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (Euterpe oleracea)**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [s.l.], v. 109, nº 3, p. 501–508, 2012. ISSN: 01676857, DOI: 10.1007/s11240-012-0115-z.

SILVA, R. de C. et al. **Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)**. *Journal of Proteomics*, [s.l.], 2014. ISBN: 1874-3919, ISSN: 18767737, DOI: 10.1016/j.jprot.2014.03.013.

SILVEIRA, T. F. F. DA. **PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF AÇAÍ PULP (Euterpe oleracea Mart.): EFFECT OF HIGH PRESSURE PROCESSING IN COMPARISON TO THERMAL PASTEURIZATION OF PURPLE AÇAÍ PULP AND A STUDY ON “WHITE AÇAÍ”**. 228 p. - Universidade Estadual de Campinas Biblioteca, 2017. Disponível em: <<http://www.albayan.ae>>.

SOUSA, A. M. De; OLIVEIRA, M. do S. P. De; NETO, J. T. de F. **VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE PROGÊNIES DE AÇAÍ BRANCO PARA CARACTERES DA PLANTA**. 19º Seminário de Iniciação Científica e 3º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 2015.

STEFANELLO, R. et al. **Germinação E No Vigor De Sementes De Anis**. *Revista Brasileira Agrociência*, [s.l.], v. 12, nº 1, p. 45–50, 2006.

STEINMACHER, D. A. et al. **Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos**. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, [s.l.], 2007. ISBN: 1054-5476, ISSN: 10545476, DOI: 10.1007/s11627-007-9032-y.

TAGORE, M. D. P. B. **O AUMENTO DA DEMANDA DO AÇAÍ E AS ALTERAÇÕES SOCIAIS, AMBIENTAIS E ECONÔMICAS: O CASO DAS VÁRZEAS DE ABAETETUBA, PARÁ**. 155 p. - Universidade Federal do Pará, 2017.

TAVARES, G. dos S.; HOMMA, A. K. O. **Comercialização Do Açai No Estado Do Pará: Alguns Comentários**. *Observatorio de la economía latinoamericana*, [s.l.], p. 1–13, 2015.

TEXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. **Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, [s.l.], v. 34, nº 1, p. 227–233, 1993. ISBN: 0167-6857, ISSN: 01676857, DOI:

10.1007/BF00045908.

TISSERAT, B. **Palm**. *Cultura de células e tecidos na silvicultura*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 339–356.

TORRES, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. In: EMBRAPA, 1998 (Org.). [s.l.]: Embrapa, 1998. 864 p. ISBN: 9788573830446.

VALLES, C. M. A. **Impacto Da Dinâmica Da Demanda Dos Frutos De Açaí Nas Relações Socioeconômicas E Composição Florística No Estuário Amazônico**. *Dissertação de Mestrado*, [s.l.], v. 1, p. 109, 2013. ISBN: 9788578110796, ISSN: 1098-6596, DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

VENTURIERI, G. R. **ECOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DO AÇAIZEIRO (Euterpe oleracea) COM E SEM A INTRODUÇÃO DE COLÔNIAS DA ABELHA URUÇU-AMARELA (Melipona flavolineata) Florianópolis**. 122 p. - Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. et al. **Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review**. *Food Chemistry*. [s.l.]: Elsevier Ltd, 2015. v. 179, 137-151 p. ISBN: 5592990367, ISSN: 18737072, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.055.

ZIMMERMAN, J. **Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants**. *The plant cell*, [s.l.], 1993. ISBN: 1532-298X (Electronic)r1040-4651 (Linking), ISSN: 1532-298X, DOI: 10.1105/tpc.5.10.1411.