



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**HELLEN CÁSSIA MAZZOTTINI DOS SANTOS**

**MORFOANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DE  
SEMENTES E PLÂNTULAS DE PALMEIRAS DO  
CERRADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Morfologia Vegetal

**BELO HORIZONTE – MG**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**HELLEN CÁSSIA MAZZOTTINI DOS SANTOS**

**MORFOANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DE  
SEMENTES E PLÂNTULAS DE PALMEIRAS DO  
CERRADO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração Morfologia Vegetal**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Maria Trombert de Oliveira  
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro  
Universidade Estadual de Montes Claros**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2017**

043

Santos, Hellen Cássia Mazzottini dos.

Morfoanatomia e ultraestrutura de sementes e plântulas de palmeiras do cerrado [manuscrito] / Hellen Cássia Mazzottini dos Santos. - 2017.

68 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Denise Maria Trombert de Oliveira. Coorientador: Leonardo Monteiro Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Fisiologia vegetal - Teses. 2. Germinação - Teses. 3. Sementes - Dormência - Teses. 4. Palmeiras. I. Oliveira, Denise Maria Trombert de. II. Ribeiro, Leonardo Monteiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**  
Universidade Federal de Minas Gerais  
ICB - Departamento de Botânica

UFMG

Tese defendida e aprovada em 22 de fevereiro de 2017, pela  
Banca Examinadora constituída pelos professores:

**Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira (UFMG)**

**Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro (Universidade Estadual de Campinas)**

**Dra. Letícia Silva Souto (Universidade Federal de São Carlos)**

**Dra. Luzia Valentina Modolo (UFMG)**

**Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes (UFMG-ICA)**

*Aos  
meus pais, Rita e Delvan,  
exemplos de amor e dedicação.*

## **Agradecimentos**

A Deus, por tudo que proporcionou em minha vida.

Aos meus pais, Rita e Delvan, pelo amor incondicional e por me conduzirem ao caminho reto.

Aos meus irmãos, demais familiares e amigos, pelo carinho e incentivo.

Ao meu esposo, George, pelo amor e companheirismo.

Aos Professores Denise Maria Trombert de Oliveira e Leonardo Monteiro Ribeiro, pela valiosa orientação, pelo compartilhamento de seus conhecimentos e pela demonstração de ética e profissionalismo na arte de ensinar e pesquisar.

Aos Professores Élder Antônio Sousa e Paiva, Rosy Mary dos Santos Isaias, Luzia Valentina Modolo, Maria Olívia Mercadante Simões e Paulo Sérgio Nascimento Lopes, pela atenção, disponibilização dos laboratórios para elaboração de trabalhos e pelas importantes colaborações.

Aos colegas da Pós-graduação em Biologia Vegetal, especialmente Cibele Bedetti, Renê Carneiro e Sarah Reis; e aos colegas dos Laboratórios de Anatomia Vegetal e de Micropropagação, da Unimontes, especialmente Daiane Dias, Anne Caroline e Mayara, pela amizade e por compartilharem suas experiências.

Aos técnicos do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFMG e da Unimontes, Wagner e Cleide, respectivamente, pela importante e essencial assistência.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal e ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de aprendizado.

À Unimontes, pela parceria e disponibilização de estrutura para elaboração de trabalhos.

À CAPES e à FAPEMIG, pela concessão de bolsa de Doutorado e de recursos financeiros para realização da pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e me incentivaram para que eu conseguisse vencer mais uma importante etapa da vida, meus sinceros agradecimentos. Obrigada!

## Sumário

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPÍTULO I – Alterações estruturais e fisiológicas na região micropilar e superação da dormência em sementes de palmeiras do bioma Cerrado.....	10
Resumo.....	12
Introdução.....	12
Material e métodos.....	15
Resultados.....	19
Discussão.....	21
Conclusões.....	26
Referências.....	27
Figuras e tabelas.....	32
CAPÍTULO II – Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of <i>Acrocomia aculeata</i> (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation.....	41
CAPÍTULO III – Aspectos citológicos da mobilização de reservas seminais em <i>Acrocomia aculeata</i> (Arecaceae).....	42
Resumo.....	44
Introdução.....	44
Material e métodos.....	46
Resultados.....	47
Discussão.....	49
Conclusões.....	55
Referências.....	56
Figuras.....	59

## RESUMO

No Cerrado, são descritas mais de 50 espécies de palmeiras que, devido às particularidades desse bioma, apresentam características adaptativas interessantes. Dentre elas, pode-se citar a dormência seminal e a grande quantidade de compostos de reserva em suas sementes. O embrião linear possui eixo microscópico incluso no pecíolo cotiledonar, e a porção distal é diferenciada no haustório altamente especializado, estrutura envolvida com a mobilização de reservas endospermicas para a plântula em crescimento, embora informações sobre como esse processo ocorre ainda são incipientes. Nesse trabalho, foram avaliados aspectos fisiológicos, anatômicos, citoquímicos e ultraestruturais em sementes de três espécies de palmeiras neotropicais, importantes economicamente. No primeiro capítulo, procurou-se avaliar o efeito dos componentes do opérculo de *Acrocomia aculeata*, *Attalea vitrivir* e *Butia capitata* sobre a germinação, bem como o efeito da embebição, do tempo de cultivo e da aplicação de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) sobre o crescimento embrionário e sobre a estrutura do endosperma micropilar. Evidenciou-se que o nível de dormência é crescente entre as sementes de *A. vitrivir*, *B. capitata* e *A. aculeata*, sendo o grau de resistência do opérculo ao deslocamento maior em *A. aculeata*. Nas sementes de *A. vitrivir* e *A. aculeata*, o crescimento do embrião está diretamente relacionado ao deslocamento do opérculo, cuja resistência, nas três espécies, diminui com a embebição, não é influenciada pelo GA<sub>3</sub> e não está relacionada à atividade de endo-β-mananase. Embora o efeito mecânico do crescimento do embrião seja determinante, o perfil péctico da lamela mediana na linha de fraqueza do endosperma micropilar e a remodelagem da parede celular, os quais são diferentes entre as espécies estudadas, podem ser considerados importantes componentes do controle da germinação de sementes de palmeiras. O segundo capítulo envolveu a definição de fases do desenvolvimento da plântula de *A. aculeata* e elucidação dos papéis do haustório e do endosperma durante a mobilização de reservas. A mobilização de reservas inicia-se no haustório durante a germinação e, subsequentemente, ocorre no endosperma adjacente ao haustório, formando a zona de digestão de modo gradual. Os primeiros compostos a serem mobilizados são as proteínas e os polissacarídeos, seguidos pelos lipídios e por constituintes da parede. O haustório ativa e controla a mobilização, formando reservas transitórias, translocando-as para o eixo vegetativo; o endosperma possui papel ativo, atuando como sítio de intensa atividade enzimática, associada aos



corpos proteicos. O desenvolvimento de plântulas de *A. aculeata* pode ser descrito em seis fases ao longo de 150 dias, aproximadamente, processo que exhibe alternância entre estágios de acúmulo e de consumo de reservas no haustório. No terceiro capítulo, procurou-se caracterizar as variações celulares relacionadas à mobilização das reservas embrionárias e endospermas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *A. aculeata*. Verificou-se que, no haustório, os corpos lipídicos associam-se a glioxissomos e a vacúolos proteicos, organelas envolvidas na mobilização lipídica. No endosperma, o padrão de mobilização é similar ao do haustório, mas não há evidências da participação direta de organelas; os carboidratos da parede são hidrolisados e as células perdem sua integridade, acumulando-se em torno do haustório. O haustório não possui características citológicas que indiquem função secretora de enzimas que atuem sobre o endosperma, mas é uma estrutura que tem função inicial de reserva e que desempenha o papel de absorção. O endosperma possui função de armazenamento e de autodegradação, sendo as enzimas hidrolíticas e os produtos de hidrólise transportados via apoplasto.

**Palavras-chave:** Germinação, opérculo, embrião, endosperma, mobilização de reservas, corpos proteicos, corpos lipídicos, lipase, endo- $\beta$ -mananase, Cerrado, Arecaceae.

## ABSTRACT

The Cerrado contains more than 50 described species of palm trees that, due to the unique characteristics of this biome, possess intriguing adaptive characteristics. Among these is seminal dormancy and large amounts of reserve compounds. The embryo is linear, possessing a microscopic axis within the cotyledonary petiole and a distal portion that is differentiated into a highly specialized haustorium, which is a structure involved in the mobilization of endospermic reserves for the growing seedling; however, information about how this process occurs is still incipient. This work evaluates the physiology, anatomy, cytochemistry and ultrastructure of the seeds of three economically important Neotropical palm species. The first chapter aims to address the effect of the components of the operculum on the germination of *Acrocomia aculeata*, *Attalea vitrivir* and *Butia capitata*, as well as the effect of inhibition, cultivation time and the application of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on embryonic growth and the structure of micropylar endosperm. The level of dormancy was found to increase among the seeds *A. vitrivir*, *B. capitata* and *A. aculeata*, with *A. aculeata* having a greater degree of resistance to displacement of the operculum. The seeds of *A. vitrivir* and *A. aculeata* experience embryonic growth that is directly related to the displacement of the operculum, whose resistance, in the three studied species, decreases with imbibition, is not influenced by GA<sub>3</sub> and is not related to the activity of endo-β-mannanase. Although the mechanical effect of embryonic growth is determinant, the pectic profile of the median lamella in the line of weakness of the micropylar endosperm and the remodeling of the cell wall, which differ among the studied species, can be considered important components of the control of germination in palm seeds. The second chapter involves the definition of developmental stages for seedlings of *A. aculeata* and the elucidation of the roles of the haustorium and endosperm during mobilization of reserves. Reserves mobilization begins in the haustorium during germination and subsequently occurs in the endosperm adjacent to the haustorium, gradually forming a digestive zone. The first compounds to be mobilized are proteins and polysaccharides, followed by lipids and cell wall components. The haustorium activates and controls mobilization, forming transitory reserves and translocating them to the vegetative axis; the endosperm has an active role in serving as a site of intense enzymatic activity associated with protein bodies. The development of seedlings of *A. aculeata* can be described to have

six phases that occur over approximately 150 days, a process that exhibits alternation between stages of accumulation and consumption of haustorium reserves. The third chapter aimed to describe cellular variation related to the mobilization of embryonic and endospermic reserves during germination and the initial development of seedlings of *A. aculeata*. The haustorium was found to contain lipid bodies associated with glyoxysomes and proteinaceous vacuoles, which are organelles involved in lipid mobilization. The pattern of mobilization of endosperm is similar to that of the haustorium, but there is no evidence of direct involvement of organelles; the carbohydrates in the wall hydrolyze and the cells lose their integrity and accumulate around the haustorium. The haustorium does not possess cytological characteristics indicative of a function of secreting enzymes that act on the endosperm, but it is a structure that has the initial function of reserve storage and plays a role in the absorption and storage of transient reserves throughout the establishment of the seedling. The endosperm has storage and self-degradation functions, with hydrolytic enzymes and products of hydrolysis being transported via apoplast.

**Keywords:** Germination, operculum, embryo, endosperm, reserve mobilization, protein bodies, lipid bodies, lipase, endo- $\beta$ -mannanase, Cerrado, Arecaceae.

## INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a maior parte das espécies nativas de palmeiras está distribuída em ambientes úmidos, especialmente na Amazônia e Mata Atlântica. No entanto, no Cerrado, bioma caracterizado pela sazonalidade climática e heterogeneidade edáfica, são descritas mais de 50 espécies de Arecaceae, dentre as quais muitas são importantes economicamente, além de apresentarem distintas estratégias adaptativas, ainda pouco compreendidas (Lorenzi et al. 2010).

*Acrocomia aculeata* Lodd. ex Mart., conhecida como macaúba, possui ampla distribuição no Brasil, sendo encontrada desde o Pará até São Paulo (Lorenzi et al. 2010), onde grandes maciços ocorrem em cerradões e matas semidecíduas de Minas Gerais, comumente em áreas antropizadas (Motta et al. 2002; Lorenzi et al. 2010). A espécie é considerada uma das oleaginosas mais produtivas, apontada como promissora fonte de recursos renováveis em regiões tropicais secas, associada à sua elevada adaptação à escassez hídrica (Hiane et al. 2005; Pires et al. 2013; Mazzottini-dos-Santos et al. 2015). *Attalea vitrivir* Zona, o babaçu, possui distribuição restrita, encontrada apenas nos estados de Minas Gerais e Bahia, especialmente em ambientes mais úmidos (Anderson e Balick 1988; Lorenzi et al. 2010). Frutos e sementes da espécie são amplamente utilizados na elaboração de artesanatos por populações tradicionais, além do endocarpo e o óleo das sementes serem recursos potenciais para produção de agroenergia (Costa e Marchi 2008; Lorenzi et al. 2010; Rubio-Neto et al. 2012). *Butia capitata* (Mart.) Becc., o coquinho-azedo, ocorre nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás, especialmente em áreas arenosas do cerrado e cerradão, apresentando baixa exigência hídrica. A espécie possui potencial paisagístico e é amplamente utilizada no setor alimentício (Faria et al. 2008; Tonietto et al. 2009; Lorenzi et al. 2010).

As três espécies apresentam dormência pronunciada em suas sementes, que apesar de ser uma característica ecológica importante, é considerada um fator limitante para a produção de mudas; em condição de viveiro, essas sementes apresentam germinação lenta e irregular ao longo do tempo, podendo levar anos para que a germinação aconteça (Neves et al. 2010; Fior et al. 2011; Ribeiro et al. 2012). Estudos têm indicado que a dormência em palmeiras possui importante componente estrutural, sendo característica a presença de

endosperma rígido, devido às paredes espessas ricas em mananos, que envolve completamente o embrião, e que pode funcionar como barreira física para a germinação (DeMason et al. 1985; Sekhar e DeMason 1988; Gong et al. 2005; Moura et al. 2010). As características estruturais do opérculo são descritas para *Phoenix dactylifera* (Gong et al. 2005), *A. aculeata*, *A. vitrivir* e *B. capitata* e (Carvalho et al. 2015), indicando que essa estrutura influencia, negativamente, a germinação das sementes de palmeiras. Segundo Gong et al. (2005), a presença da linha de fraqueza no opérculo de *P. dactylifera* está associada à germinação, sem que haja influência significativa da atividade de endo- $\beta$ -mananase no processo. Porém, não há trabalhos que elucidem que alterações são necessárias para que ocorra o deslocamento do opérculo e a concretização da germinação.

Eventos pós-germinativos são complexos, especialmente devido às particularidades das sementes de palmeiras, que, em muitas espécies, são ricas em reservas e possuem embrião linear; o eixo embrionário é microscópico e encontra-se inserido no pecíolo cotiledonar, além do limbo cotiledonar ser desenvolvido no haustório, estrutura altamente especializada. A mobilização de reservas embrionárias durante o crescimento cotiledonar, particularmente no nível subcelular, é descrita apenas para *P. dactylifera* e *Washingtonia filifera* (DeMason 1984, 1988; Sekhar e Demason 1988) e mecanismos ocorridos no haustório e no endosperma durante a degradação dos compostos armazenados, assim como o padrão de mobilização dessas reservas para o eixo vegetativo em crescimento, são processos ainda pouco esclarecidos.

Considerando-se que Arecaceae abrange mais de 2.700 espécies (Dransfield et al. 2008) e a importância ecológica e econômica da família, trabalhos aprofundados sobre germinação e plântulas de palmeiras são ainda escassos e limitados a poucas espécies (DeMason 1984; DeMason et al. 1985; Alang et al. 1988; Oliveira et al. 2013). Dessa forma, a proposta deste trabalho constitui contribuição para o avanço do conhecimento sobre a biologia das sementes ortodoxas com dormência e o desenvolvimento de plântulas, especialmente em palmeiras típicas do Cerrado. O primeiro capítulo compreende estudos fisiológicos, anatômicos, histoquímicos e imunocitoquímicos sobre as principais alterações no opérculo, que estão associadas à concretização da germinação de *A. aculeata*, *A. vitrivir* e *B. capitata*, o que permite ampliar a compreensão do processo de superação da dormência em sementes de palmeiras. No segundo capítulo deste trabalho, foram avaliados aspectos

anatômicos, histoquímicos, bioquímicos e fisiológicos da semente de *A. aculeata*, durante a germinação e o desenvolvimento das plântulas. A relevância desse trabalho reside na geração de informações inéditas sobre a dinâmica da mobilização das reservas seminais e ainda sobre o papel do haustório e do endosperma durante esse processo, características importantes para compreender o sucesso reprodutivo da espécie. O terceiro capítulo apresenta a análise ultraestrutural do haustório e do endosperma de *A. aculeata* durante a germinação e o desenvolvimento da plântula. Esse estudo evidencia as particularidades da mobilização das reservas seminais, esclarecendo como ocorre a transferência de substâncias para o eixo em crescimento, e permite destacar características citológicas associadas às funções do haustório e do endosperma.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alang ZC, Moir GF, Jones LH (1988) Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Annals of Botany* 61:261–268.
- Anderson AB, Balick MJ (1988) Taxonomy of the Babassu Complex (*Orbignya* spp.: Palmae). *Systematic Botany* 13:32–50.
- Carvalho VS, Ribeiro LM, Lopes PSN, Agostinho CO, Matias LJ, Mercadante-Simões MO, Correia LNF (2015) Dormancy is modulated by seed structures in palms of the cerrado biome. *Australian Journal of Botany* 63:444–454.
- Costa CJ, Marchi ECS (2008) Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de Agroenergia. *Informativo ABRATES* 18:39–50.
- DeMason DA (1984) Growth parameters in the cotyledon of date seedlings. *Botanical Gazette* 145:176–183.
- DeMason DA (1988). Seedling development in *Washingtonia filifera* (Arecaceae). *Botanical Gazette* 149:45–56.
- DeMason DA, Sexton R, Gorman M, Reid JSG (1985) Structure and biochemistry of endosperm breakdown in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Protoplasma* 126:159–167.
- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CBA, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE (2008) *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Kew Publishing, Kew, UK.
- Faria JP, Arellano DB, Grimaldi R, Silva LCR, Vieria RF, Silva DB, Agostini-Costa TS (2008) Caracterização química da amêndoa de coquinho-azedo (*Butia capitata* var. *capitata*). *Revista Brasileira de Fruticultura* 30:549–552.
- Fior CS, Rodrigues LR, Leonhardt C, Schwarz SF (2011) Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. *Ciência Rural* 41:1150–1153.
- Gong X, Bassel GW, Wang A, Greenwood JS, Bewley JD (2005) The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- $\beta$ -mannanase activity. *Annals of Botany* 96:1165–1173.
- Hiane PA, Ramos-Filho MM, Ramos MIL, Macedo MLR (2005) Pulp and seed oil of bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.: characterization and composition of fat acids. *Brazilian Journal of Food Technology* 8:256–259.
- Lorenzi H, Noblick L, Kahn F, Ferreira E (2010) *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 384p.
- Mazzottini-dos-Santos HC, Ribeiro LM, Mercadante-Simões MO, Sant’Anna-Santos BF (2015) Ontogenesis of the pseudomonomerous fruits of *Acrocomia aculeata*

- (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits. *Trees* 29:199–214.
- Motta PEF, Curi N, Oliveira-Filho AT, Gomes JBV (2002) Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relações com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37:1023–1031.
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Scientia Agricola* 67:375–495.
- Neves SC, Ribeiro LM, Silva PO, Andrade IG (2010) 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* 7:47–54.
- Oliveira NCC, Lopes PSN, Ribeiro LM, Mercadante-Simões MO, Oliveira LAA, Silvério FO (2013a) Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees* 27:1633–1645.
- Pires TP, Souza ES, Kuki KN, Motoike SY (2013) Ecophysiological traits of the macaw palm: a contribution towards the domestication of a novel oil crop. *Industrial Crops and Products* 44:200–210.
- Ribeiro LM, Oliveira DMT, Garcia QS (2012) Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. *Trees* 26: 851–863.
- Rubio-Neto A, Freitas BSM, Souza AL, Silva FG, Sales JF, Pires LL (2012) *In vitro* germination and growth of babassu (*Orbygnia phalerata* Mart.) embryos subjected to different drying temperatures. *African Journal of Biotechnology* 11:10605–10610.
- Sekhar KNC, DeMason DA (1988) A comparison of endosperm and embryo proteins of the palm *Washingtonia filifera*. *American Journal of Botany* 75:338–342.
- Tonietto A, Schlindwein G, Tonietto SM (2009) Usos e potencialidades do butiazeiro. Porto Alegre: FEPAGRO, 2009. 28p. (Circular Técnica, 26).



## **Capítulo I**

### **Alterações estruturais e fisiológicas na região micropilar e superação da dormência em sementes de palmeiras do bioma Cerrado\***

---

\* Artigo a ser encaminhado para o periódico Trees.

ARTIGO ORIGINAL

**Alterações estruturais e fisiológicas na região micropilar e superação da dormência em sementes de palmeiras do bioma Cerrado**

**Hellen Cássia Mazzottini-dos-Santos<sup>1</sup> · Leonardo Monteiro Ribeiro<sup>2</sup> · Denise Maria Trombert Oliveira<sup>1</sup>**

✉ Leonardo M. Ribeiro  
leonardo.ribeiro@unimontes.br  
Phone: 55 38 3229-8154  
Fax: 55 38 3229-8180

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, 39401-089, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil

**Título conciso:** Germinação de palmeiras do Cerrado

## Resumo

Em sementes de palmeiras, a dormência recebe forte influência de componentes estruturais, cujas alterações responsáveis pela conclusão da germinação ainda são pouco compreendidas. Objetivou-se avaliar aspectos fisiológicos, anatômicos e citoquímicos da região micropilar em sementes das palmeiras neotropicais *Acrocomia aculeata*, *Attalea vitrivir* e *Butia capitata*. Avaliou-se o efeito dos componentes do opérculo sobre a germinação, e da embebição, do tempo de cultivo e da aplicação de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) sobre o crescimento embrionário e sobre a estrutura do endosperma micropilar. O nível de dormência foi crescente entre as sementes de *A. vitrivir*, *B. capitata* e *A. aculeata*, sendo que em *A. aculeata*, a resistência ao deslocamento do opérculo foi maior, seguida por *A. vitrivir* e *B. capitata*. A remoção mecânica do opérculo promoveu a superação da dormência na maioria das sementes das três espécies, enquanto que a remoção do tegumento opercular e a aplicação de GA<sub>3</sub> foram efetivas em *A. aculeata* e *A. vitrivir*. Nas sementes de *A. aculeata* e *A. vitrivir*, o crescimento do embrião esteve diretamente relacionado ao deslocamento do opérculo, cuja resistência, nas três espécies, diminuiu com a embebição, não foi influenciada pelo GA<sub>3</sub> e não esteve relacionada à atividade de endo- $\beta$ -mananase. O deslocamento do opérculo ocorreu com a separação das células na linha de fraqueza do endosperma micropilar. Embora o efeito mecânico do crescimento do embrião seja determinante, o perfil péctico da lamela mediana na linha de fraqueza do endosperma micropilar e sua remodelagem, os quais foram diferentes entre as espécies estudadas, podem ser considerados importantes componentes do controle da germinação de sementes de palmeiras.

**Palavras-chave:** Arecaceae, embrião, endosperma micropilar, opérculo, germinação.

## Introdução

Em palmeiras, a germinação é um processo complexo devido a particularidades na estrutura das sementes, as quais são tipicamente albuminosas, com embrião linear e eixo embrionário microscópico incluso no pecíolo cotiledonar (Orozco-Segovia et al. 2003; Magalhães et al. 2013; Mazzottini-dos-Santos et al. 2015). Em muitas espécies, a germinabilidade é restrita em função de pronunciada dormência, que tem sido associada à imaturidade e ou baixo

potencial de crescimento do embrião, incapaz de superar as restrições mecânicas proporcionadas pelos envoltórios (Orozco-Segovia et al. 2003; Baskin e Baskin 2004; Carvalho et al. 2015).

A elucidação dos mecanismos de superação da dormência em Arecaceae é dificultada pela germinação errática dentro das populações de sementes (Bicalho et al. 2015), possivelmente devido à sua heterogeneidade estrutural e fisiológica, de forma que os eventos que levam à conclusão da germinação ocorrem em poucos indivíduos em determinado período. Estudo recente realizado com sementes de palmeiras do bioma Cerrado constatou que a dormência é modulada por variações na anatomia do opérculo (Carvalho et al. 2015), estrutura normalmente cônica, constituída pelo tegumento opercular e endosperma micropilar (Fig. 1) que restringe o crescimento do embrião (Ribeiro et al. 2011, 2013, 2015; Oliveira et al. 2013; Neves et al. 2013). Por outro lado, estudos sobre o controle do crescimento embrionário, outro componente do balanço de forças que define a germinação, são incipientes (Ribeiro et al. 2015; Norsazwan et al. 2016), o que tem dificultado a classificação da dormência na família (Baskin e Baskin 2014).

Em sementes de palmeiras, o endosperma micropilar possui células vivas, com paredes espessas e ricas em mananos (Gong et al. 2005; Buckeridge 2010), o que levanta a hipótese de que o enfraquecimento dessa estrutura possa contribuir para que ocorra o deslocamento do opérculo, baseado em modelos consolidados para sementes de diversas espécies de monocotiledôneas (Bewley et al. 2013). Nesse caso, giberelinas poderiam atuar na indução de hidrolases que promoveriam o enfraquecimento das paredes celulares (Finch-Savage e Leubner-Metzger 2006). Entretanto, em estudo realizado com sementes da palmeira *Phoenix dactylifera* constatou-se que não há efetiva participação de endo- $\beta$ -mananase (uma das principais hidrolases ativas em sementes) no deslocamento do opérculo, processo este favorecido pela existência de uma linha de fraqueza no endosperma micropilar (Gong et al. 2005). Embora a linha de fraqueza tenha sido identificada no endosperma micropilar de outras espécies de palmeiras (Neves et al. 2013; Carvalho et al. 2015; Mazzottini-dos-Santos et al. 2015), ainda são escassos os estudos aprofundados sobre a estrutura do opérculo e sobre a dinâmica de processos que possam alterar a resistência deste tecido e influenciar a germinação (Carvalho et al. 2015; Ribeiro et al. 2015).

Homogalacturanos (HGAs) são as pectinas mais abundantes da parede primária e estão envolvidas com várias propriedades da célula, tais como rigidez, flexibilidade, porosidade e separação (Willats et al. 2001; Carneiro et al. 2015; Scheler et al. 2015). Recentemente, a imunocitoquímica tem sido utilizada para identificação de pectinas e de alterações em sua constituição na parede celular de sementes, o que tem contribuído para elucidar a funcionalidade da parede durante a germinação (Müller et al. 2013; Scheler et al. 2015; Steinbrecher e Leubner-Metzger 2017). No entanto, não há trabalhos que identifiquem essas substâncias no opérculo de sementes de palmeiras, o que poderá adicionar informações relevantes para a compreensão sobre o controle da germinação em *Arecaceae*.

No Brasil, embora a maior parte das espécies de palmeiras esteja distribuída nos domínios da Amazônia e Mata Atlântica, o ambiente de clima sazonal do Cerrado abriga mais de 50 espécies, muitas delas com elevado potencial econômico e características adaptativas interessantes (Henderson 2006; Lorenzi et al. 2010). *Acrocomia aculeata* Lodd. ex Mart., conhecida como macaúba, possui ampla distribuição no Brasil, sendo os maiores maciços encontrados em áreas antropizadas, o que denota sua alta capacidade adaptativa (Motta et al. 2002; Lorenzi et al. 2010). A espécie apresenta notável importância agroindustrial, pois se destaca como uma das maiores produtoras de óleo de qualidade, armazenado no mesocarpo e na semente (Hiane et al. 2005; Pires et al. 2013; Mazzottini-dos-Santos et al. 2015). *Attalea vitrivir* Zona, o babaçu, ocorre especialmente em áreas antes ocupadas por matas de galeria, o que caracteriza sua maior exigência com relação à umidade (Anderson e Balick 1988; Lorenzi et al. 2010). Além de oferecer diversos produtos de subsistência para populações tradicionais, a espécie possui elevado potencial para geração de agroenergia, pois o endocarpo volumoso e pétreo constitui matéria prima para produção de carvão vegetal e o óleo armazenado em grande quantidade nas sementes pode ser utilizado para produção de biodiesel (Costa e Marchi 2008; Lorenzi et al. 2010; Rubio-Neto et al. 2012). *Butia capitata* (Mart.) Becc., o coquinho-azedo, ocorre principalmente em áreas arenosas, o que a caracteriza como espécie tolerante ao déficit hídrico; é uma planta exuberante e empregada no paisagismo, e os frutos são amplamente utilizados no setor alimentício, para a produção de sucos e sorvetes (Faria et al. 2008; Tonietto et al. 2009; Lorenzi et al. 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos estruturais e fisiológicos em sementes de *A. aculeata*, *A. vitrivir* e *B. capitata* durante o processo germinativo. Objetivou-se: (i) avaliar os efeitos da embebição, do tempo de cultivo e da aplicação exógena de GA<sub>3</sub> sobre o crescimento do embrião e a estrutura do opérculo, e (ii) caracterizar anatomicamente o processo de deslocamento do opérculo. A partir dos dados obtidos, discutiu-se como particularidades no balanço de forças na região micropilar são determinantes para a diversidade de níveis de dormência nas sementes das espécies estudadas.

## **Material e métodos**

### Material botânico e procedimentos preliminares

Frutos maduros, recém-dispersos, de *A. aculeata*, *A. vitrivir* e *B. capitata* foram coletados de plantas nativas do bioma Cerrado, localizado na região Norte de Minas Gerais, Brasil. Os frutos de *A. aculeata* foram coletados no município de Montes Claros (16°42'34"S; 43°52'48"W) e armazenados em caixas abertas, em temperatura ambiente, por 3 a 4 meses, de modo a permitir a extração de sementes intactas. As sementes foram extraídas do pirênio utilizando-se torno de bancada. Os frutos de *A. vitrivir* foram coletados na Área de Preservação Ambiental do Rio Pandeiros, localizada no município de Januária (15°26'10"S; 44°40'44"W), e as sementes foram extraídas do pirênio com auxílio de machado. Os frutos de *B. capitata* foram coletados no município de São João da Lagoa (16°43'43.9"S; 44°10'03.5"W) e despulpados em liquidificador de baixa rotação. As sementes envolvidas pelo pirênio pétreo foram armazenadas em condições ambientais durante 15 dias, sendo então as sementes extraídas do pirênio utilizando-se martelo. A viabilidade dos lotes de sementes das três espécies foi avaliada a partir de cultivo de embriões, em meio de cultura MS (Murashing e Skoog 1962) com 75% da concentração original, em cinco repetições de dez embriões. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 6%, durante 15 minutos, enxaguadas três vezes em água destilada e armazenadas em condições ambientais, até a montagem dos experimentos.

### Efeito dos componentes do opérculo sobre a germinação

Para cada espécie, sementes intactas foram desinfestadas novamente, conforme descrito anteriormente, e submersas em água destilada durante cinco dias. Cinco repetições de 20 sementes foram submetidas a três tratamentos: controle (sementes intactas), remoção do tegumento opercular (Ribeiro et al. 2011) e remoção completa do opérculo (Neves et al. 2013). As sementes foram dispostas em recipientes de polietileno com tampa, contendo vermiculita esterilizada e umedecida com água destilada (80% da capacidade de campo). O material foi mantido em câmara de germinação (Nova Ética, BOD 411/FPD, Brasil), a 30°C. A germinação foi avaliada semanalmente, durante 21 dias, sendo considerado o alongamento de cerca de 2mm do pecíolo cotiledonar como indicativo da conclusão da germinação (Ribeiro et al. 2011, 2015). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### Efeito do GA<sub>3</sub> sobre a germinação e o comprimento do embrião

Sementes foram submetidas à imersão em soluções de GA<sub>3</sub> nas concentrações de 1000, 1000 e 2000 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, para *A. vitrivir* (Neves et al. 2013), *B. capitata* (Dias et al. 2013) e *A. aculeata* (Ribeiro et al. 2011). As aplicações de GA<sub>3</sub> foram repetidas após 7, 15 e 30 dias de cultivo. O cultivo e a avaliação da germinação foram realizados conforme descrito acima, porém pelo período de 60 dias.

O comprimento de cinco repetições de 10 embriões foi avaliado em sementes secas, sementes submetidas à imersão em água destilada por sete dias e sementes submetidas ou não à aplicação de GA<sub>3</sub> e cultivadas por 15, 30 e 60 dias. Devido ao elevado percentual de germinação, a avaliação de sementes de *A. vitrivir* aos 60 dias não foi realizada.

#### Efeito da embebição, do tegumento opercular e do GA<sub>3</sub> sobre a resistência do opérculo

Em sementes secas e em sementes embebidas por cinco dias, foram usadas sementes intactas e sementes nas quais o tegumento opercular foi removido, para mensurar a força necessária para o deslocamento do opérculo. A avaliação foi realizada também em sementes submetidas aos tratamentos com GA<sub>3</sub>, descritos anteriormente. As sementes foram seccionadas paralelamente ao opérculo e o pecíolo cotiledonar foi removido com

auxílio de agulha. A força necessária para o deslocamento do opérculo foi mensurada utilizando-se um dinamômetro digital (Impac, IP-90DI, Brasil), acoplado a sondas com diâmetro correspondente ao do pecíolo cotiledonar dos embriões de cada espécie. A sonda foi inserida pelo interior da semente, pela parte seccionada, e foi empurrada até que o opérculo fosse removido. Foram avaliadas quatro repetições de 10 sementes, exceto para *B. capitata*, para a qual foram utilizadas quatro repetições de 25 (obtenção de quantidade suficiente para realizar avaliação da atividade enzimática posteriormente). Devido ao elevado índice de germinação de sementes de *A. vitrivir*, foram desconsiderados os tempos 30 e 60 dias no caso das sementes submetidas ao cultivo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### Atividade de endo- $\beta$ -mananase

Amostras de opérculos e pecíolos cotiledonares oriundas de sementes submetidas a tratamentos similares aos descritos para o experimento com aplicação de GA<sub>3</sub> foram armazenadas a -20°C e utilizadas para avaliar a atividade de endo- $\beta$ -mananase, conforme protocolo estabelecido por Pinho et al. (2014). Amostras de 5mg foram maceradas em cadinho, utilizando nitrogênio líquido, e homogeneizadas em tampão acetato de sódio 1molL<sup>-1</sup>. O material foi centrifugado, durante 45 minutos, a 16000 g e 4°C. O sobrenadante foi retirado, adicionado à solução de galactomanano Locust Bean Gum (Sigma, USA) e mantido em banho-maria a 40°C, por 3 horas. Os açúcares redutores formados foram submetidos à reação com solução de hidrazida ácida *p*-hidroxibenzoico (Sigma, USA), sob fervura a 95°C, durante cinco minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Agilent Cary, 60 UV/Visible, Austrália), com absorvância de 398 nm. Os resultados foram comparados com a curva padrão obtida a partir de reações com concentrações crescentes de galactomanano na presença de endo- $\beta$ -mananase (Megazyme, Ireland). Os valores foram convertidos em  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores  $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$  de massa fresca e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



## Anatomia e histoquímica

Amostras de opérculo e pecíolo cotiledonar de sementes secas, sementes cultivadas por 30 dias e de sementes recém-germinadas foram submetidas à avaliação anatômica e histoquímica. Os materiais foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965), desidratados em série etanólica e incluídos em (2-hidroxietil)-metacrilato (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), de acordo com Paiva et al. (2011). Secções transversais (7-10  $\mu\text{m}$  de espessura) foram obtidas usando micrótomo rotativo (Atago, Tokio, Japão). As secções foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien et al. 1964, modificado) e as lâminas foram montadas com resina acrílica (Itacril, Itaquaquecetuba, Brasil). Para as avaliações histoquímicas, foram realizados testes com vermelho de rutênio (Chamberlain 1932) para pectinas; solução ácido periódico e reagente de Schiff (PAS) (Feder e O'Brien 1968), para polissacarídeos; e Xylidine-Ponceau (Vidal 1970), para proteínas. O registro fotográfico foi obtido com fotomicroscópio (Zeiss Axio Vision LE, Oberkochen, Germany).

## Imunocitoquímica em paredes celulares do endosperma micropilar

Três opérculos de *A. aculeata*, *A. vitirivir* e *B. capitata*, obtidos de sementes secas e de sementes após 30 dias de cultivo foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) e seguiu-se procedimento semelhante ao descrito para a avaliação anatômica. As lâminas contendo os cortes foram imersas em solução bloqueadora com 3% (w/v) de leite em pó diluído em solução salina de tampão fosfato (PBS) por 30 min. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpos monoclonais JIM5, JIM7 e LM19 (Center for Plant Sciences, University of Leeds, UK) diluídos em solução PBS, por 2 horas, em temperatura ambiente. Esses anticorpos são usados, respectivamente, para identificação de epitopos de ligação de HGAs de baixa metilesterificação (Knox et al. 1990; Willats et al. 2001) HGAs de média metilesterificação (Knox et al. 1990; Willats et al. 2001) e HGAs não esterificados (Verhertbruggen et al. 2009). Os cortes foram lavados com solução PBS e incubados em anticorpos secundário anti-rat IgG - FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído in PBS por 2 horas, no escuro e em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados

novamente com PBS e lâminas temporárias foram montadas em glicerina 50%. As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Zeiss, 510 META), com excitação de 488nm e filtros de 505-530nm (Carneiro et al. 2015).

## Resultados

### Efeito do opérculo, do GA<sub>3</sub> e da atividade de endo-β-mananase sobre a germinação

A germinabilidade indicou nível de dormência crescente, quando são analisadas sementes intactas de *A. vitrivir*, *B. capitata* e *A. aculeata*, nessa ordem (Fig. 3a–c). A remoção do opérculo promoveu a superação da dormência na maioria das sementes das três espécies, sendo o tegumento opercular mais importante no controle da germinação em *A. aculeata* (Fig. 3c) e *A. vitrivir* (Fig. 3a). A aplicação de GA<sub>3</sub> promoveu incremento na germinabilidade em sementes de *A. vitrivir* e *A. aculeata* (Fig. 3d, f), porém com menor efeito que a remoção do opérculo. A aplicação de GA<sub>3</sub> em sementes de *B. capitata* não mostrou efeito significativo (Fig. 3e).

O embrião de *A. vitrivir* é, respectivamente, 2,8 e 2,4 vezes maior que o de *B. capitata* e *A. aculeata* (Fig. 4). A avaliação das distribuições de frequência mostrou que, embora a embebição não tenha afetado a média dos comprimentos, ela levou ao alongamento de uma pequena proporção dos embriões nas três espécies, promovendo o surgimento de uma classe de comprimento não observada na avaliação de sementes secas. As médias dos comprimentos dos embriões do tratamento controle, assim como daqueles oriundos das sementes tratadas com GA<sub>3</sub>, ao longo do tempo de cultivo, não diferiram em relação à condição inicial e à embebição em *A. vitrivir* (Fig. 4a–d) e *B. capitata* (Fig. 4e–i). Em *A. aculeata*, ocorreram aumentos dos comprimentos médios dos embriões, em relação à condição inicial e à embebição, a partir dos 15 dias de cultivo, no caso das sementes tratadas com GA<sub>3</sub>, e a partir dos 30 dias, no tratamento controle (Fig. 4j–n). Em *A. aculeata* (Fig. 4k–n) o aumento da média do comprimento dos embriões esteve associado ao aparecimento de classes adicionais de embriões com maiores comprimentos, em relação à condição inicial e à embebição, especialmente em decorrência da aplicação de GA<sub>3</sub>.

A resistência do opérculo ao deslocamento, nas sementes secas de *A. aculeata* foi, respectivamente, 1,7 e 2,7 vezes maior que em *A. vitrivir* e *B. capitata* (Fig. 5a–c). A embebição reduziu a resistência do opérculo nas três espécies. O tegumento opercular representou 67,4% e 45,5% da força necessária ao deslocamento do opérculo, respectivamente, em sementes secas e embebidas de *A. vitrivir*, sendo esses valores iguais a 49,4% e 19,4% para *B. capitata* e 36% e 63% para *A. aculeata*. Para *A. aculeata*, a associação da embebição e remoção do tegumento opercular proporcionou maior efeito em relação às outras espécies. O tempo de cultivo e a aplicação de GA<sub>3</sub> não afetaram a resistência do opérculo nas sementes das três espécies (Fig. 6a–c).

Em sementes de *B. capitata* e *A. aculeata*, os níveis de atividade de endo- $\beta$ -mananase no opérculo e no pecíolo cotiledonar foram baixos e não foram influenciados pela embebição, tempo de cultivo ou aplicação de GA<sub>3</sub> (Fig. 7a, b). Em *A. aculeata*, a atividade da enzima foi maior no opérculo em relação ao pecíolo cotiledonar (Fig. 7b).

#### Estrutura, histoquímica e imunocitoquímica do opérculo durante a germinação

Nas três espécies, entre o endosperma micropilar e o endosperma lateral, há uma zona distinta (região de fraqueza), com células menores e parede celular de composição pectínica, além de algumas células vacuoladas sem conteúdo de reserva, e células mortas colapsadas (Fig. 8a–c). O endosperma micropilar possui abundante reserva proteica, armazenada em corpos proteicos (Fig. 8d–f). A partir da embebição e durante o plantio das sementes, as proteínas de reserva, particularmente na região de fraqueza, foram mobilizadas, resultando em células com vacúolos de tamanhos variados e com resíduos de proteína (Fig. 8g–i). A conclusão da germinação foi evidenciada pelo deslocamento parcial do opérculo, que inicialmente ocorreu em regiões específicas (Fig. 9a). Esse processo está associado à separação das células da região de fraqueza do endosperma micropilar pela ruptura da lamela mediana, com manutenção da integridade das paredes celulares (Fig. 9b, c). Em *A. vitrivir* e *B. capitata* (Fig. 9d, e), as células do endosperma, na região de fraqueza, apresentam paredes pectínicas mais espessas que as de *A. aculeata* (Fig. 9f).

Durante o cultivo, ocorrem alterações nas paredes celulares na região de fraqueza, registradas pelas diferentes composições pectínicas observadas. Os resultados das avaliações

imunocitoquímicas estão representados na Tabela 1. HGAs de baixa metilesterificação, identificados pelo JIM5, são evidenciados apenas no opérculo de sementes secas de *A. vitrivir* e *B. capitata* (Fig. 10a–c); após 30 dias de cultivo, estas pectinas são registradas apenas em *A. vitrivir* e *A. aculeata* (Fig. 10d–f). HGAs de média metilesterificação, identificados pelo JIM7, são evidenciados no opérculo de sementes secas das três espécies (Fig. 10g–i), porém são mais destacados em *A. vitrivir* (Fig. 10g), na qual a reação não ocorre após 30 dias de cultivo (Fig. 10j); para *B. capitata* (Fig. 10h, k) e *A. aculeata* (Fig. 10i, l) não há alteração na reação entre sementes secas e após cultivo de 30 dias. HGAs não esterificadas, identificadas pelo LM19, são registradas no opérculo de sementes secas das três espécies (Fig. 10m–o), nas quais a reação apresenta sutil redução após 30 dias de cultivo (Fig. 10p–r).

## Discussão

*Acrocomia aculeata*, *Attalea vitrivir* e *Butia capitata* formam sementes com diferentes níveis de dormência. Enquanto as sementes de *A. vitrivir* germinam com relativa facilidade (Neves et al. 2013), a germinação em *A. aculeata* (Ribeiro et al. 2011; Bicalho et al. 2015) e *B. capitata* (Oliveira et al. 2013; Dias et al. 2017) é lenta e irregular, podendo demandar anos para ocorrer sob condições naturais.;

### Crescimento do embrião

Nas espécies estudadas, em sementes que não concluíram a germinação, o crescimento inicial do embrião ocorre de modo variável, estando diretamente associado à germinação em *A. vitrivir* e, parcialmente, em *A. aculeata*. A embebição, o tempo de cultivo e a aplicação de GA<sub>3</sub> não afetaram o comprimento dos embriões no interior das sementes não germinadas de *A. vitrivir* e *B. capitata*. Como praticamente todas as sementes de *A. vitrivir* tratadas com GA<sub>3</sub> germinaram em até 60 dias, pode-se concluir que, nesta espécie, o crescimento do embrião promoveu, diretamente, o deslocamento do opérculo. Em sementes de *A. aculeata*, observou-se discreto crescimento do embrião no interior das sementes não germinadas (acréscimo de 11% na média do comprimento dos embriões). A aplicação de

GA<sub>3</sub> promoveu a germinação em mais de 60% das sementes, mas não proporcionou diferenças no comprimento dos embriões no interior das sementes, em relação ao tratamento controle (20% de germinação) ao longo do cultivo. Desta forma, também nessa espécie, a maior parte do crescimento do embrião foi associada à germinação. Em *B. capitata*, no entanto, não foi observado crescimento embrionário no interior das sementes, o que pode ser relacionado ao baixo percentual de germinação observado e à ausência do efeito da aplicação do GA<sub>3</sub>.

O maior tamanho do embrião de *A. vitrivir* é considerado um fator que contribui para o menor nível de dormência, em relação às demais espécies estudadas aqui, sendo que a variação no tamanho do embrião numa população, provavelmente, modula a dormência em sementes de palmeiras, dados que corroboram o descrito por Carvalho et al. (2015) e Dias et al. (2017). O crescimento dos embriões no interior de sementes não germinadas de *A. aculeata* e, em casos isolados, identificados pela distribuição de frequência em *B. capitata*, poderia ser interpretado como evidência de dormência morfofisiológica, como definida por Baskin e Baskin (2014). Neste caso, conforme identificado para as palmeiras *Pritchardia remota* (Pérez et al. 2008) e *Elaeis guineenses* (Murugesan et al. 2015), os embriões pequenos necessitam de um período de crescimento no interior da semente, anterior à conclusão da germinação, até adquirirem força suficiente para promoverem o deslocamento do opérculo. Embora esta possibilidade possa ser importante em diásporos em bancos de sementes e no longo prazo, aspecto que ainda carece de comprovação, acredita-se que este crescimento, moderado e relativamente rápido, observado no presente trabalho, está relacionado à propensão natural ao crescimento inerente aos embriões, comprovada pela alta germinabilidade das sementes nas quais os opérculos foram retirados e também quando os embriões isolados são cultivados *in vitro* (Ribeiro et al. 2011, 2012; Magalhães et al. 2012; Carvalho et al. 2015). Nas sementes dormentes, este crescimento inicial é bloqueado pelo opérculo, como demonstrado neste trabalho, resultados estes que são condizentes com o descrito para *A. aculeata* por Ribeiro et al. (2013), que sugerem não existir inibição química por parte do tegumento opercular ou do endosperma micropilar, apenas inibição física. Contudo, a aplicação de giberelinas pode induzir o crescimento de embriões que não estão restritos mecanicamente (Ribeiro et al. 2013), uma vez que esses hormônios estão envolvidos com a expansão celular, podendo, também, promover a

mobilização de reservas ou enfraquecimento de estruturas do envoltório seminal (Buckeridge 2010; Nonogaki et al. 2010; Bewley et al. 2013). Desse modo, sugere-se aqui que o efeito do crescimento dos embriões soma-se ao efeito de alterações ocorrentes nas paredes das células da região de fraqueza, o que reduz a restrição mecânica, fato que ocorre de forma isolada, em alguns indivíduos, no banco de sementes. É importante destacar também que, em alguns estudos, a germinação tem sido relacionada ao papel ativo do endosperma micropilar, o qual é capaz de captar sinais ambientais ou hormonais e ativar eventos bioquímicos, tal como o crescimento embrionário (Lee et al. 2010; Yan et al. 2014).

### Resistência do opérculo

A ordenação do nível de dormência esteve relacionada ao grau de resistência do opérculo ao deslocamento nas sementes das espécies estudadas. O tegumento opercular e a remodelagem péctica da parede celular na região de fraqueza do endosperma micropilar estão envolvidos no controle da germinação. Os dados aqui apresentados indicam que, embora a embebição proporcione redução significativa da força requerida para o deslocamento do opérculo, o tegumento opercular é a estrutura que, de forma determinante, restringe a germinação de *A. vitrivir* e *B. capitata*. Em *A. aculeata*, contudo, o endosperma micropilar desempenha papel mais importante, o que pode estar relacionado à sua maior espessura em relação às outras espécies aqui estudadas, como também observado por Carvalho et al. (2015). Em espécies de diferentes famílias, o endosperma micropilar tem sido considerado a maior barreira física para a conclusão da germinação, especialmente pela presença de células com paredes espessas e ricas em mananos (Buckeridge 2010; Nonogaki et al. 2010; Steinbrecher e Leubner-Metzger 2016).

Embora as alterações específicas que promovem o enfraquecimento dos envoltórios embrionários sejam pouco compreendidas em sementes de palmeiras, acredita-se que a efetivação da germinação envolva a ação de várias enzimas, como já registrado em sementes de algumas leguminosas, café e tomate (Nonogaki et al. 2010; Scheler et al. 2015), muitas das quais são induzidas ou sintetizadas a partir da ação de giberelinas (Bewley et al. 2013). É interessante notar que, apesar da quantidade de mananos nas paredes celulares do

endosperma de *A. aculeata* e *B. capitata*, não foi observada aqui a evolução da atividade de endo- $\beta$ -mananase, principal enzima envolvida na hidrólise dos mananos. Resultado similar foi diagnosticado em sementes de *P. dactylifera*, nas quais a atividade dessa enzima não influencia, positivamente, o deslocamento do opérculo, sendo este evento relacionado às características estruturais do endosperma micropilar, que apresenta uma região de fragilidade conspícua (Gong et al. 2005). A baixa atividade de endo- $\beta$ -mananase no endosperma micropilar dessas espécies, durante a germinação, reforça a proposição de que alterações de outros componentes da parede celular estejam envolvidas no processo de enfraquecimento e deslocamento do opérculo. A região de fraqueza foi identificada no opérculo de *A. aculeata*, *A. vitrivir* e *B. capitata*, reconhecendo-se células com parede mais pecticas em relação às do endosperma micropilar e lateral, como também observado por Neves et al. (2013), Oliveira et al. (2013), Carvalho et al. (2015) e Mazzottini-dos-Santos et al. (2015). Contudo, até o momento, permaneciam desconhecidas as alterações estruturais e ou fisiológicas ocorridas no opérculo dessas espécies, que elucidem como ocorre o seu deslocamento. A partir de análises histoquímicas e imunocitoquímicas, aqui realizadas, identificaram-se diferentes padrões de deposição de pectina nas paredes de células no opérculo durante o cultivo das sementes. Em *A. aculeata*, notadamente, as paredes pecticas das células da região de fraqueza, são mais delgadas em relação a *A. vitrivir* e *B. capitata*, enquanto as células do endosperma micropilar e lateral são mais espessas e ricas em mananos.

Em *A. aculeata*, *A. vitrivir* e *B. capitata*, o deslocamento do opérculo é decorrente da separação celular, o que ocorre, inicialmente, em regiões específicas do opérculo. As alterações de HGAs, associadas à mobilização de proteínas no endosperma micropilar, indicam que, em *A. vitrivir* e *B. capitata*, ocorre remodelagem da parede, possivelmente por ação de pectinases, promovendo a redução da adesão celular em menor espaço de tempo, enquanto que em *A. aculeata*, as alterações na parede requerem maior tempo. A redução da metilesterificação, possivelmente promovida por pectina-metilesterases (PMEs), altera significativamente o grau de adesão entre as células (Wolf et al. 2009). O endosperma micropilar pode desempenhar importante função reguladora da germinação, atuando sobre o afrouxamento da parede celular, que pode ser induzida por alterações ambientais ou hormonais (Lee et al. 2010; Dekkers et al. 2013; Yan et al. 2014; Steinbrecher e Leubner-

Metzger 2016). As modificações nas paredes celulares do endosperma micropilar são consideradas estratégias para regular a germinação, processo no qual enzimas com função remodeladora são importantes (Yan et al. 2014; Steinbrecher e Leubner-Metzger 2016). Nossos dados indicam que, em *A. vitrivir*, a germinação ocorre mais rapidamente, influenciada pela notável redução de HGA de média metilesterificação, identificada pelo anticorpo JIM7; em *B. capitata*, a germinação é intermediária, associada à redução de HGA de baixa metilesterificação, identificado pelo JIM5. Os resultados obtidos indicam que a remodelagem da parede ocorre por meio de enzimas, possivelmente PMEs, que podem ser sintetizadas ou ativadas após 30 dias de cultivo, podendo estar relacionadas à mobilização de proteínas dos corpos proteicos, que, segundo Mazzottini-dos-Santos et al. (2017), são organelas que apresentam importante função de reserva enzimática no endosperma de *A. aculeata*. Segundo Scheleret al. (2015), a presença de HGAs não esterificadas, identificadas nas três espécies, pelo LM19, indica que as PMEs estão amplamente ativas e que são reguladas pelo nível de ácido abscísico (ABA). O ABA, presente no opérculo de *A. aculeata*, segundo relatado por Ribeiro et al. (2015), é inibidor da ação de enzimas relacionadas ao afrouxamento da parede celular, e o catabolismo desse hormônio inicia-se com a embebição (Bewley et al. 2013; Ribeiro et al. 2015). Recentes trabalhos têm identificado ação de PMEs sobre a remodelagem da parede durante a germinação em algumas espécies, nas quais o padrão de metilesterificação é considerado fator crítico, que influencia várias características bioquímicas e fisiológicas da parede (Müller et al. 2013; Scheler et al. 2015). O tegumento opercular de *A. aculeata*, *A. vitrivire* e *B. capitata* é constituído por células mortas e ricas em compostos fenólicos (Carvalho et al. 2015). Dessa forma, a separação das células do tegumento opercular pode ser influenciada por ação de enzimas, que, segundo Scheleret al. (2015), podem ser secretadas pelo endosperma micropilar, promovendo o enfraquecimento da parede celular do tegumento. Para as espécies estudadas aqui, especialmente *A. aculeata*, a possível ação de enzimas no enfraquecimento do tegumento opercular, além da influência dos abundantes compostos fenólicos ali armazenados, como descrito por Carvalho et al. (2015), sobre a germinação, constituem instigantes temas para investigação.



## Conclusões

O nível de dormência foi crescente entre as sementes de *A. vitrivir*, *B. capitata* e *A. aculeata*, o que esteve relacionado ao grau de resistência do opérculo ao deslocamento. A remoção mecânica do opérculo promoveu a superação da dormência na maioria das sementes das três espécies, enquanto que a remoção do tegumento opercular e a aplicação de GA<sub>3</sub> foram efetivas em *A. vitrivir* e *A. aculeata*. Nas sementes de *A. vitrivir* e *A. aculeata*, o crescimento do embrião esteve diretamente associado ao deslocamento do opérculo, cuja resistência, nas três espécies, diminuiu com a embebição, não foi influenciada pelo GA<sub>3</sub> e não esteve relacionada à atividade de endo-β-mananase. O deslocamento do opérculo ocorreu com a separação das células na linha de fraqueza do endosperma micropilar. Embora o efeito mecânico do crescimento do embrião seja determinante, o perfil péctico da lamela mediana das células da linha de fraqueza do endosperma micropilar e sua remodelagem, os quais diferiram entre as espécies estudadas, podem ser considerados importantes componentes no controle da germinação em sementes de palmeiras.

**Agradecimentos** Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil, processo CRA-APQ-01335-13), pelo suporte financeiro e ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pelo uso dos equipamentos e obtenção de imagens. A Rosy Mary dos Santos Isaias e Maria Olívia Mercadante Simões por permitirem o uso de equipamentos e reagentes em seus laboratórios, bem como pelo suporte teórico. A Cibele Bedetti de Sousa e ao Wagner Afonso Rocha, pelo indispensável apoio técnico nas análises imunocitoquímicas. H.C.M.S. agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil) pela bolsa de doutorado recebida, e D.M.T.O. e L.M.R. agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil, processos 308117/2014-0 e 304627/2015-1, respectivamente), pela bolsa de produtividade em pesquisa.

## Referências

- Anderson AB, Balick MJ (1988) Taxonomy of the Babassu Complex (*Orbignya* spp.: Palmae). *Syst Bot* 13:32–50
- Baskin JM, Baskin CC (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Sci Res* 14:1–16
- Baskin JM, Baskin CC (2014) What kind of seed dormancy might palms have *Seed Sci Res* 24:17–22
- Bewley D, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) *Seeds – Physiology of development, germination and dormancy*. Springer, New York, USA
- Bicalho EM, Pintó-Marijuan M, Morales M, Müller M, Munné-Bosch S, Garcia QS (2015) Control of macaw palm seed germination by the gibberellin/abscisic acid balance. *Plant Biology* 17:990–996
- Buckeridge MS (2010) Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiol* 154:1017–1023
- Carneiro RGS, Pacheco P, Isaias RMS (2015) Could the extended phenotype extend to the cellular and subcellular levels in insect-Induced galls? *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0129331
- Carvalho VS, Ribeiro LM, Lopes PSN, Agostinho CO, Matias LJ, Mercadante-Simões MO, Correia LNF (2015) Dormancy is modulated by seed structures in palms of the cerrado biome. *Aust J Bot* 63:444–454
- Chamberlain CJ (1932). *Methods in plant histology*, University of Chicago Press, Chicago
- Costa CJ, Marchi ECS (2008) Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. *Embrapa Cerrados, Planaltina*
- Dekkers BJ, Pearce S, van Bolderen-Veldkamp RP, Marshall A, Widera P, Gilbert J, Drost HJ, Bassel GW, Müller K, King JR, Wood ATA, Grosse I, Quint M, Krasnogor N, Leubner-Metzger G, Holdsworth MJ, Bentsink L (2013) Transcriptional dynamics of two seed compartments with opposing roles in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 163:205–215
- Dias DS, Lopes PSN, Ribeiro LM, Oliveira LAA, Mendes EV, Carvalho VS (2013). Effects of seed structures, sucrose and gibberellic acid on the germination of *Butia capitata* (Arecaceae). *Seed Sci Technol* 41:371–382
- Faria JP, Arellano DB, Grimaldi R, Silva LCR, Vieira RF, Silva DB, Agostini-Costa TS (2008). Caracterização química da amêndoa de coquinho-azedo (*Butia capitata* var. *capitata*). *Rev Bras Frutic* 30:549–552

- Feder N, O'Brien TP (1968) Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am J Bot* 55:123–142
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 171:501–523
- Gong X, Bassel GW, Wang A, Greenwood JS, Bewley JD (2005) The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- $\beta$ -mannanase activity. *Anna Bot* 96:1165–1173
- Henderson F (2006) Morphology and anatomy of palm seedlings. *Bot Rev* 72:273–329
- Hiane PA, Ramos-Filho MM, Ramos MIL, Macedo MLR (2005) Pulp and seed oil of bocaiúva, *Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd.: characterization and composition of fat acids. *Braz J Food Technol* 8:256–259
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137A–138A
- Knox JP, Linstead PJ, King J, Cooper C, Roberts K (1990) Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of roots apices. *Planta* 181:512–521
- Lee KP, Piskurewicz U, Tureckova V, Strnad M, Lopez-Molina L (2010) A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds. *Proc Natl Acad Sci* 107:19108–19113
- Lorenzi H, Noblick L, Kahn F, Ferreira (2010) *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)*. Instituto Plantarum, Nova Odessa
- Magalhães HM, Lopes PSN, Ribeiro LM, Sant'Anna-Santos BF, Oliveira DMT (2013) Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees* 27:273–283
- Mazzottini-dos-Santos HC, Ribeiro LM, Mercadante-Simoes MO, Sant'Anna-Santos BF (2015) Ontogenesis of the pseudomonorous fruits of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits. *Trees* 29:199–214
- Mazzottini-dos-Santos HC, Ribeiro LM, Oliveira DMT (2016) Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. *Protoplasma*. doi:10.1007/s00709-016-1048-x

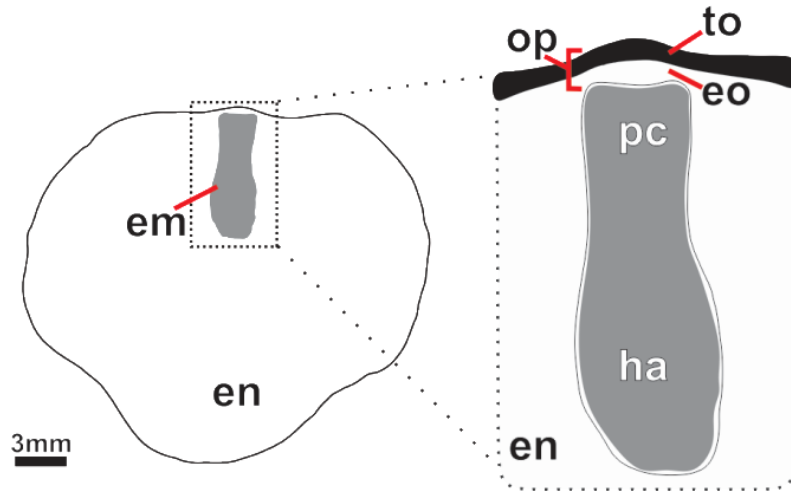
- Motta Pd, Curi N, Oliveira-Filho AD, Gomes JBV (2002). Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesq Agropecu Bras* 37:1023–1031
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Sci Agr* 67:375–495
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Murugesan P, Ravichandran G, Shareef M (2015) Seed germination and ultrastructural changes in oil palm (*Elaeis guineensis*) hybrid seed influenced by heat treatments. *Indian J Agr Sci* 85:1419–1423
- Müller K, Levesque-Tremblay G, Bartels S, Weitbrecht K, Wormit A, Usadel B, Haughn G, Kermodé AR (2013) Demethylesterification of cell wall pectins in *Arabidopsis* plays a role in seed germination. *Plant Physiol* 161:305–316
- Neves SC, Ribeiro LM, Cunha IRG, Pimenta MAS, Mercadante-Simões MO, Lopes PSN (2013) Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Attalea vitrivir*). *Flora* 208:68–78
- Norsazwan MG, Puteh AB, Rafil MY (2016) Oil palm (*Elaeis guineensis*) seed dormancy type and germination pattern. *Seed Sci Technol* 44:15–26
- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD (2010) Germination – still a mystery. *Plant Sci* 179:574–581
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373
- Oliveira NCC, Lopes PSN, Ribeiro LM, Mercadante-Simões MO, Oliveira LAA, Silvério FO (2013) Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees* 27:1633–1645
- Orozco-Segovia A, Batis AI, Rojas-Aréchiga M, Mendoza A (2003) Seed biology of palms: a review. *Palms* 47:79–94
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT (2011) Large plant samples: how to process for GMA embedding? In: Chiarini-Garcia H, Melo RCN (eds) *Light microscopy: methods and protocols*. Springer/Humana Press, New York, pp. 37–49
- Pérez HE, Criley RA, Baskin CC (2008) Promoting germination in dormant seeds of *Pritchardia remota* (Kuntze) Beck., an endangered palm endemic to Hawaii. *Nat Area J* 28:251–260

- Pires TP, Souza ES, Kuki KN, Motoike SY (2013) Ecophysiological traits of the macaw palm: a contribution towards the domestication of a novel oil crop. *Ind Crop Prod* 44:200–210
- Pinho GP, Matoso JRM, Silvério FO, Mota WC, Lopes PSN, Ribeiro LM (2014) A new spectrophotometric method for determining the enzymatic activity of endo- $\beta$ -mannanase in seeds. *J Brazil Chem Soc* 25:1246–1252
- Ribeiro LM, Garcia QS, Müller M, Munné-Bosch S (2015) Tissue specific hormonal profiling during dormancy release in macaw palm seeds. *Physiol Plantarum* 153:627–642
- Ribeiro LM, Oliveira DMT, Garcia QS (2012) Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae). *Trees* 26:851–863
- Ribeiro LM, Silva PO, Andrade IG, Garcia QS (2013) Interaction between embryo and adjacent tissues determines the dormancy in macaw palm seeds. *Trees* 26:851–863. *Seed Sci Technol* 41:345–356
- Ribeiro LM, Souza PP, Rodrigues AG Jr, Oliveira TGS, Garcia QS (2011) Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical species with potential for use as biofuel. *Seed Sci Technol* 39:303–317
- Rubio-Neto A, Freitas BSM, Souza AL, Silva FG, Sales JF, Pires LL (2012). *In vitro* germination and growth of babassu (*Orbygnia phalerata* Mart.) embryos subjected to different drying temperatures. *African J Biotechnol* 11:10605–10610
- Scheler C, Witbrech K, Pearce SP, Hampstead A, Büttner-Mainik A, Lee KJD, Voegelé A, Oracz K, Dekkers BJW, Wang X, Wood ATA, Bentsink L, King JR, Knox JP, Holdsworth MJ, Müller K, Leubner-Metzger (2015) Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. *Plant Physiol* 167:200–215
- Steinbrecher T, Leubner-Metzger (2017) The biomechanics of seed germination. *J Exp Bot* 68:765–783
- Tonietto G, Schlindwein G, Tonietto SM (2009). Usos e potencialidades do butiazeiro. FEPAGRO, Circular Técnica, 26
- Vidal BC (1970) Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Ann Histochim* 15:289–296
- Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP (2009) An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydr Res* 344:1858–1862
- Yan D, Duermeyer L, Leoveanu, Nambara E (2014) The functions of the endosperm during seed germination. *Plant Cell Physiol* 9: 1521–1533

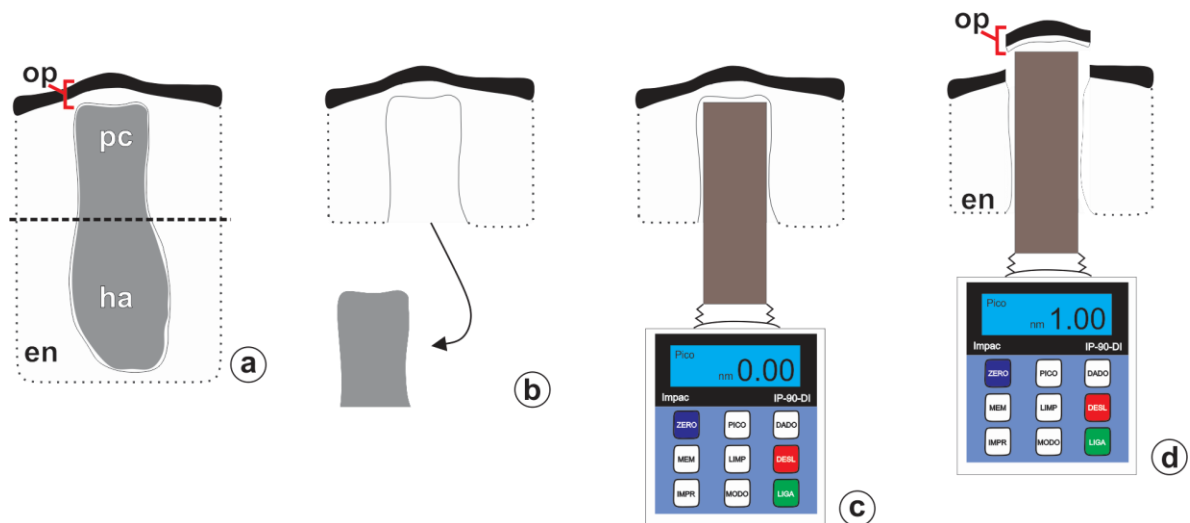
Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, Alebeek GWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP (2001) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls: implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J Biol Chem* 276:19404–19413

Wolf S, Mouille G, Pelloux J (2009) Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol Plant* 2:851–860

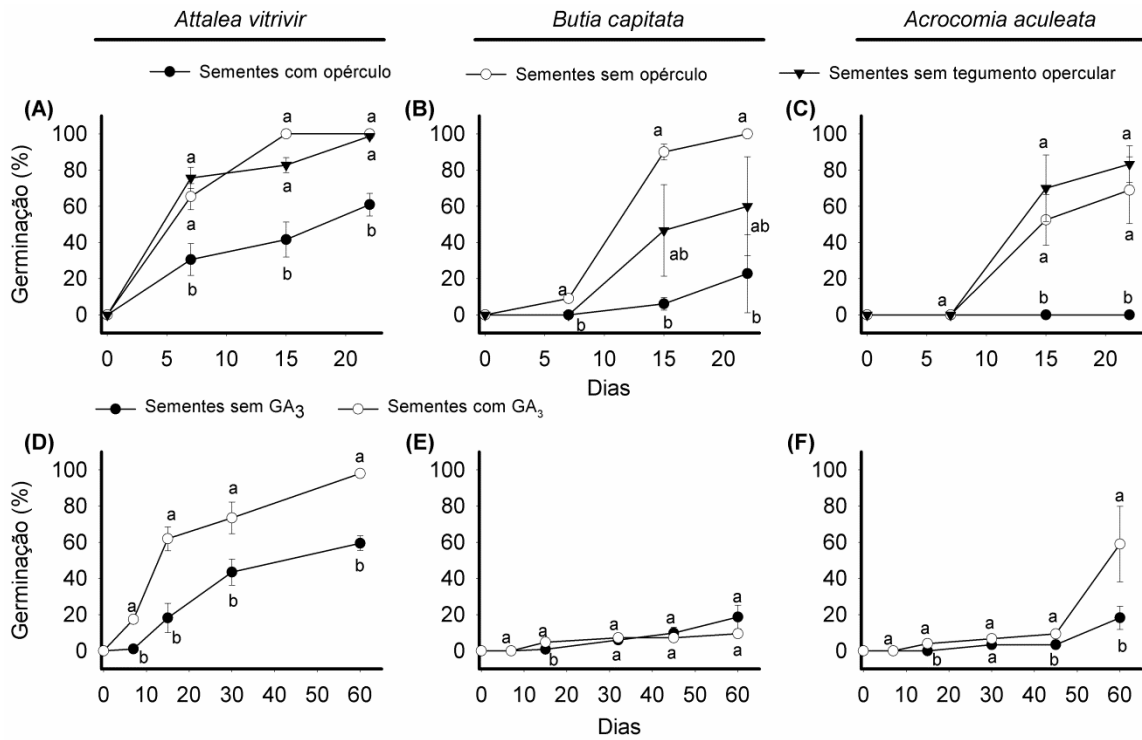
## Figuras



**Fig. 1** Diagrama da semente de *Acrocomia aculeata*, com ampliação da região micropilar, à direita, onde está destacado o embrião linear (*em* cinza), envolvido pelo endosperma e subjacente ao opérculo, o qual é constituído pelo tegumento opercular e endosperma micropilar. *em* embrião, *en* endosperma, *eo* endosperma micropilar, *ha* haustório, *op* opérculo, *pc* pecíolo cotiledonar, *to* tegumento opercular

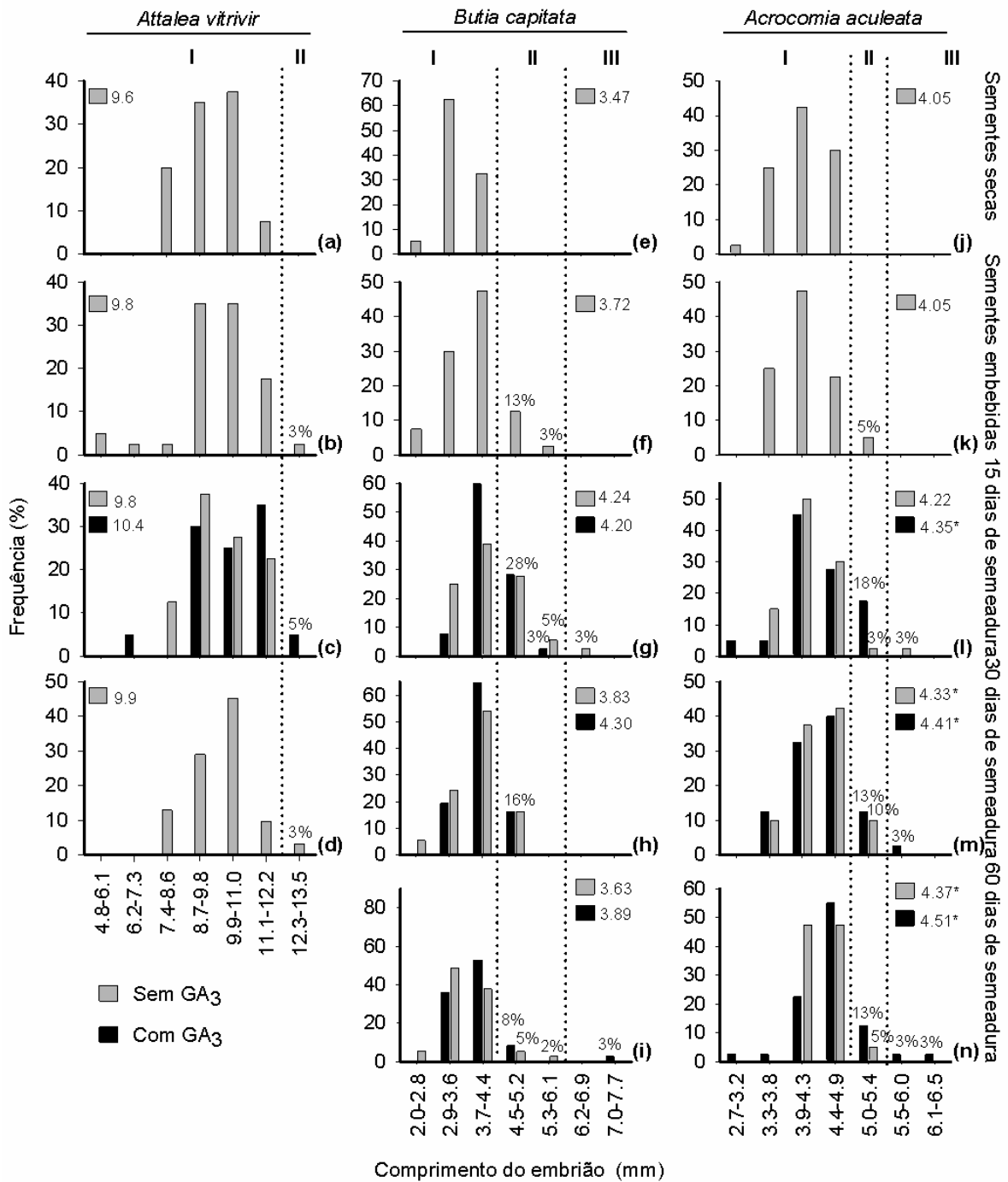


**Fig. 2** Esquema do método aplicado para a mensuração da força necessária para o deslocamento do opérculo. (a) A semente é seccionada paralelamente ao opérculo (*linha tracejada*), separando o pecíolo do haustório. (b) O pecíolo é removido do fragmento que contém o opérculo (*seta*). (c) Uma sonda (*marrom*), com diâmetro semelhante ao do pecíolo, acoplada ao dinamômetro (*azul*), é introduzida na cavidade onde o pecíolo se localizava. (d) A sonda é empurrada até que a resistência do opérculo seja superada, removendo-o, procedendo-se à leitura do dinamômetro. *en* endosperma, *ha* haustório, *op* opérculo, *pc* pecíolo cotiledonar



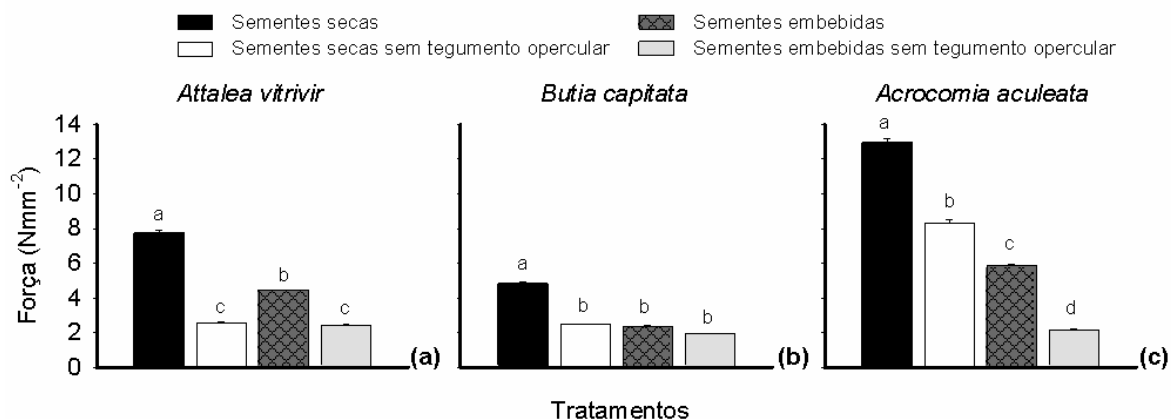
**Fig. 3** Percentuais de germinação de sementes de *Attalea vitrivir*, *Butia capitata* e *Acrocomia aculeata*. (a–c) Percentual de germinação em sementes com e sem opérculo e sem tegumento opercular. (d–f) Percentual de germinação em sementes sem e com aplicação de GA<sub>3</sub>. Letras iguais indicam ausência de diferença entre os tratamentos em cada tempo de avaliação, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As barras longitudinais indicam o erro padrão da média.



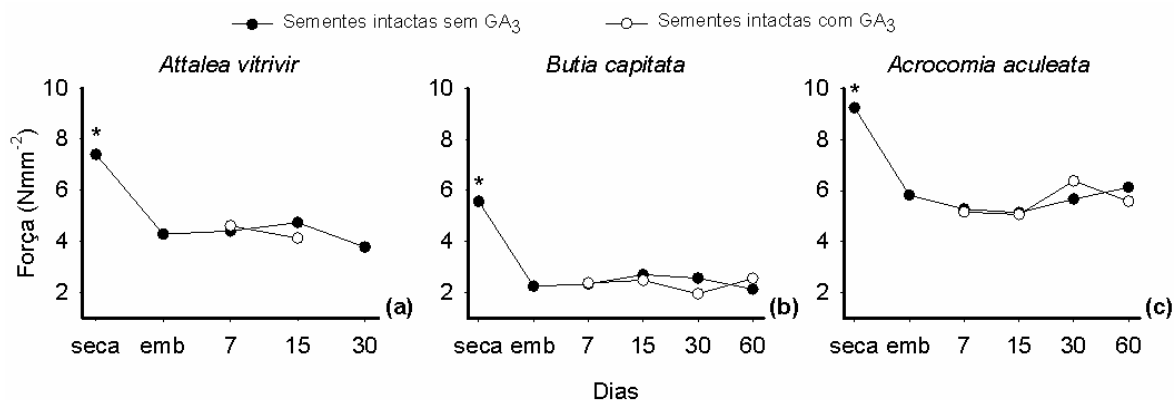


**Fig. 4** Distribuição de frequência do comprimento dos embriões de *Attalea vitrivor*, *Butia capitata* e *Acrocomia aculeata* em sete intervalos, em sementes submetidas ou não à aplicação de GA<sub>3</sub>. Na lateral esquerda estão dispostos os períodos de avaliação correspondentes a cada linha: (a, e, j) Sementes secas. (b, f, k) Sementes embebidas. (c, g, l) Sementes após 15 dias de cultivo. (d, h, m) Sementes após 30 dias de cultivo. (i, n) Sementes após 60 dias de cultivo. Linhas longitudinais pontilhadas delimitam as avaliações I (intervalos ocorrentes em sementes secas), II (intervalos correspondentes ao efeito da embebição sobre o crescimento embrionário) e III (intervalos correspondentes ao

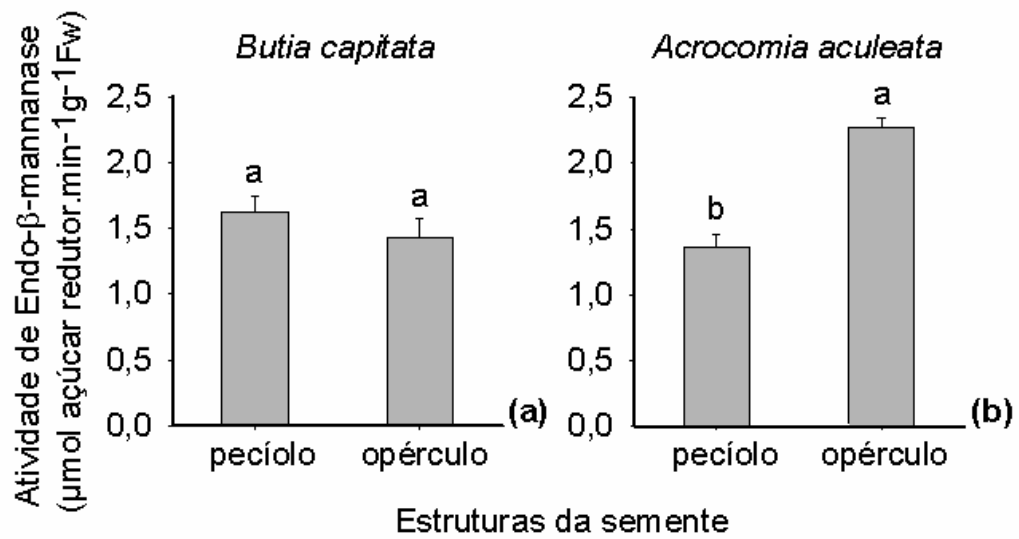
crescimento embrionário após embebição). Os valores junto aos retângulos correspondem às médias e (\*\*) indicam diferença significativa em relação à condição inicial e à embebição, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



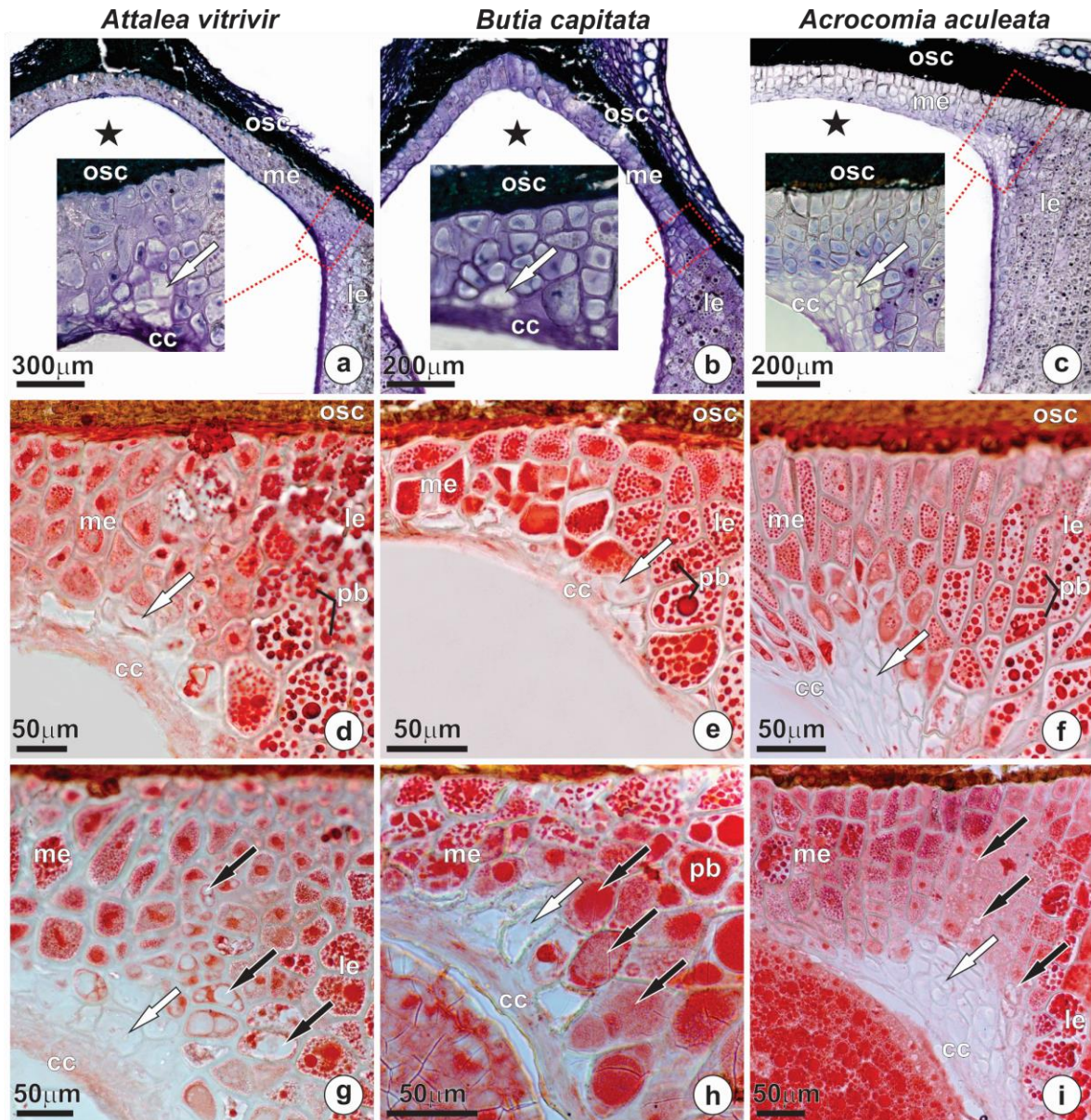
**Fig. 5** Força necessária para o deslocamento do opérculo em sementes secas, submetidas à embebição e à retirada do tegumento opercular de *Attalea vitrivir* (a), *Butia capitata* (b) e *Acrocomia aculeata* (c). Letras iguais indicam ausência de diferença entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As barras longitudinais indicam o erro padrão da média (algumas barras não são visíveis, dadas sua pequena dimensão).



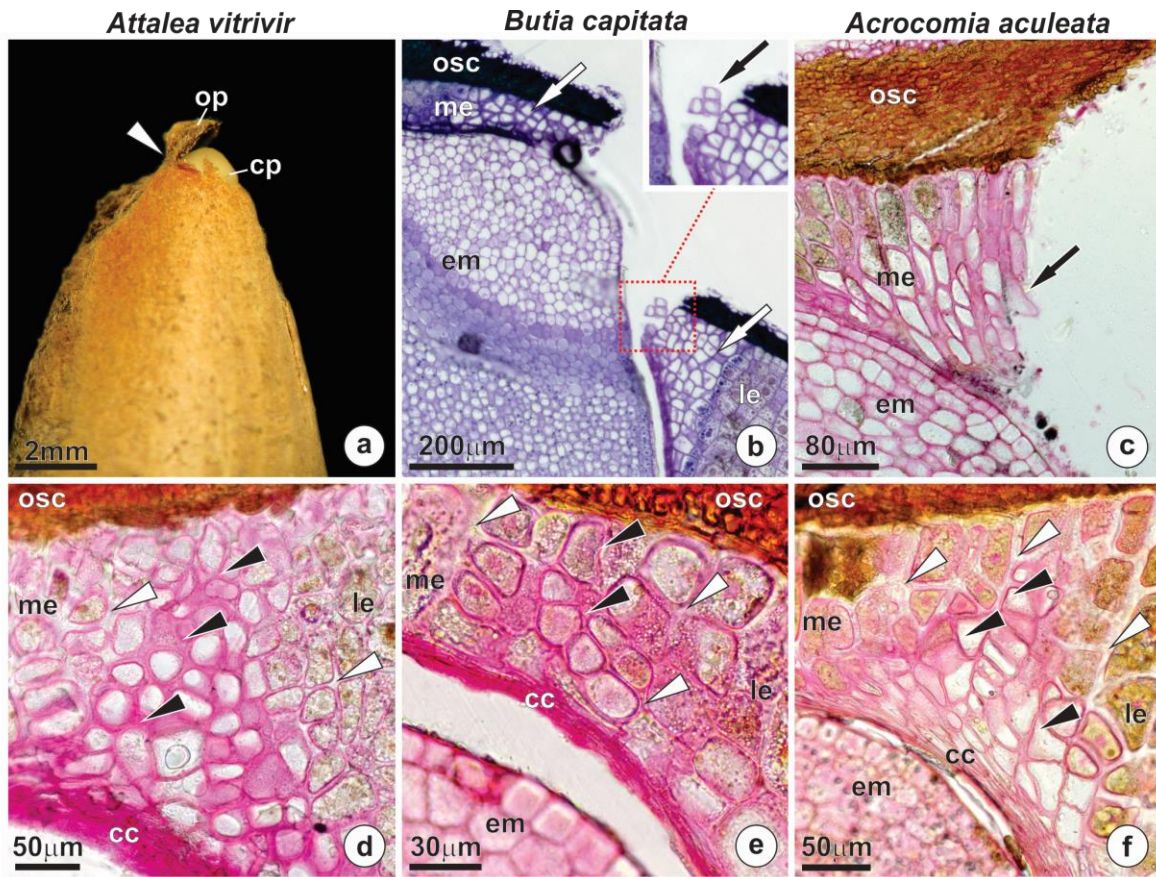
**Fig. 6** Força necessária para o deslocamento do opérculo em sementes secas, embebidas e cultivadas durante 7, 15 e 30 dias, após serem submetidas ou não à aplicação de GA<sub>3</sub>, de *Attalea vitrivir* (a), *Butia capitata* (b) e *Acrocomia aculeata* (c). Os asteriscos indicam diferença significativa da condição inicial em relação aos demais tratamentos, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As barras longitudinais, que indicam o erro padrão da média, não são visíveis, dadas a sua pequena dimensão.



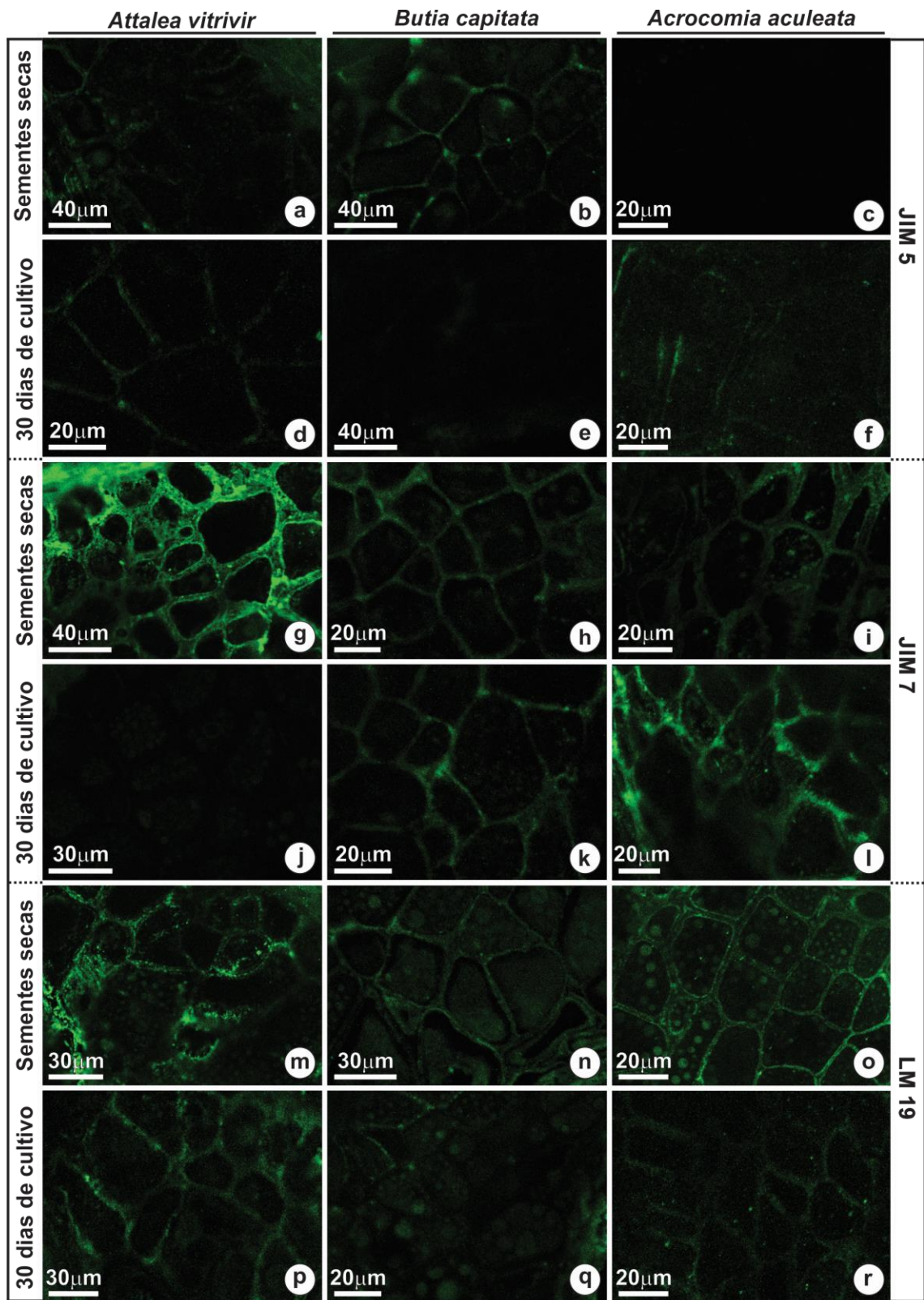
**Fig. 7** Atividade de endo-β-mananase no pecíolo e no opérculo em sementes de *Butia capitata* (a) e *Acrocomia aculeata* (b). Letras diferentes indicam diferença significativa entre estruturas seminais pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As barras longitudinais indicam o erro padrão da média.



**Fig. 8** Secções longitudinais da região micropilar de sementes de *Attalea vitrivir* (a, d, g), *Butia capitata* (b, e, h) e *Acrocomia aculeata* (c, f, i) (Arecaceae). (a–c) Opérculos indicando a zona de transição entre endosperma lateral e micropilar, o que corresponde à região de fraqueza (*retângulos/destaques*); notar células mortas e vazias (*setas brancas*) e células colapsadas; as cavidades (*estrelas*) correspondem ao local onde o embrião ficava inserido. (d–f) Células endospermicas com grande quantidade de proteínas armazenadas em corpos proteicos, reveladas pela coloração vermelha obtida no teste com XP. (g–h) Células vacuoladas (*setas pretas*), contendo ou não resíduos de proteínas nos vacúolos, indicando o início da mobilização de proteínas na região de fraqueza do opérculo. *en* endosperma lateral, *me* endosperma micropilar, *op* opérculo, *pb* corpo proteico, *pc* pecíolo cotiledonar, *osc* tegumento opercular



**Fig. 9** Morfologia (a) e anatomia (b–f, em secções longitudinais) da região micropilar de sementes de *Attalea vitrivir* (a, d), *Butia capitata* (b, e) e *Acrocomia aculeata* (c, f) (Arecaceae). (a) Semente indicando germinação efetiva, observada pelo deslocamento parcial do opérculo (*ponta de seta branca*). (b) Região do opérculo com células vacuoladas (*setas brancas*), indicando mobilização de reservas na região de fraqueza; mtar células intactas (em destaque, *seta preta*) na região de fraqueza, após delocamento do opérculo. (c) Região do opérculo mostrando células intactas (*black arrow*) na região de fraqueza, após deslocamento do opérculo. (d–f) Secções de opérculos mostrando pectinas, coradas de rosa pelo vermelho de rutênio; notar as células da região de fraqueza (*pontas de setas pretas*), com paredes contendo pectinas mais evidente do que na região do endosperma micropilar e lateral (*pontas de setas brancas*). (f) Opérculo com parede celular delgada na região de fraqueza, indicando diferente deposição de pectinas (*pontas de setas pretas*) comparando com as outras espécies. cc células colapsadas, cp pecíolo cotiledonar, em embrião, le endosperma lateral, me endosperma micropilar, op opérculo, osc tegumento opercular



**Fig. 10** Fotomicrografias da linha de fraqueza do endosperma micropilar de *Attalea vitrivir*, *Butia capitata* e *Acrocomia aculeata* após a aplicação de imunomarcadores para

identificação de pectinas na parede celular do opérculo, tanto em sementes seca quanto cultivadas por 30 dias, vistas em secções longitudinais. (a–f) HGAs de baixa metilesterificação. (g–l) HGAs de média metilesterificação. (m–r) HGAs não esterificadas.

## Tabela

**Tabela 1** Análises imunocitoquímicas na linha de fraqueza do endosperma micropilar de *Attalea vitrivir*, *Butia capitata* e *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). Reação presente (++) , pouco presente (+), ausente (–), em relação às secções não incubadas no anticorpo (*branco*). T0, semente seca e T30, semente após 30 dias de cultivo.

Anticorpo	<i>Attalea vitrivir</i>		<i>Butia capitata</i>		<i>Acrocomia aculeata</i>	
	T0	T30	T0	T30	T0	T30
JIM5	+	+	+	-	-	+
JIM7	++	-	+	+	++	++
LM19	++	+	++	+	++	+

## Capítulo II

### **Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation<sup>†</sup>**

---

<sup>†</sup> Artigo publicado no periódico Protoplasma doi:10.1007/s00709-016-1048-x



## Capítulo III

### Aspectos citológicos da mobilização de reservas seminais em *Acrocomia aculeata* (Arecaceae)<sup>‡</sup>

---

<sup>‡</sup> Artigo a ser encaminhado para o periódico Protoplasma

**Aspectos citológicos da mobilização de reservas seminais em *Acrocomia aculeata* (Arecaceae)**

**Hellen Cássia Mazzottini-dos-Santos<sup>1</sup> · Leonardo Monteiro Ribeiro<sup>2</sup> ·  
Denise Maria Trombert Oliveira<sup>1</sup> · Elder Antônio Sousa Paiva<sup>1</sup>**

✉ Elder Antonio Sousa Paiva  
epaiva@icb.ufmg.br  
Telefone: (31) 3409-2683  
Fax: (31) 3409-2671

<sup>1</sup> Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, 39401-089, Brasil

**Resumo** Sementes de diversas espécies de palmeiras são ricas em compostos de reservas, cuja mobilização é complexa e pouco compreendida, uma vez que são escassas as informações sobre aspectos citológicos deste processo. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar variações celulares relacionadas à mobilização das reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Acrocomia aculeata*, importante palmeira oleaginosa neotropical. O haustório de plântulas, em diferentes fases de desenvolvimento, e o endosperma da zona de digestão foram fixados e processados por métodos usuais para avaliações ultraestruturais. Tanto no haustório quanto no endosperma, as proteínas são armazenadas em corpos proteicos, e os lipídios, em corpos lipídicos. As análises ultraestruturais confirmam que a mobilização das reservas embrionárias inicia-se durante a germinação, sendo as proteínas as primeiras a serem metabolizadas, seguidas pelos lipídios. No haustório, os corpos lipídicos associam-se a glioxissomos e a vacúolos proteicos, organelas envolvidas na mobilização lipídica. No endosperma, a mobilização das reservas inicia-se após a protrusão do pecíolo cotiledonar, em camadas de células adjacentes ao haustório, constituindo a zona de digestão. O padrão de mobilização é similar ao do haustório, mas não há evidências da participação direta de organelas; os carboidratos da parede são hidrolisados e as células perdem sua integridade, acumulando-se em torno do haustório. A estrutura das células que compõem o haustório mostra-se compatível com as funções deste na absorção e armazenamento transitório de reservas, não havendo indícios de síntese de enzimas que possam atuar na mobilização de reservas do endosperma. O endosperma possui função de armazenamento e de autodegradação, sendo os produtos de hidrólise transportados via apoplasto.

**Palavras-chave** Corpos lipídicos · Corpos proteicos · Germinação · Palmeiras

## **Introdução**

Sementes de palmeiras possuem peculiaridades, associadas à natureza dos compostos de reserva e à estrutura do embrião. Em geral, essas sementes possuem endosperma volumoso e rígido, com ampla reserva lipídica, proteica e de carboidratos (DeMason 1988; Sekhar e Demason 1988), especialmente mananos, encontrados na parede celular (Buckeridge 2010).

O embrião é linear e possui duas regiões distintas: a proximal, que corresponde ao pecíolo cotiledonar, onde se encontra inserido o eixo embrionário, e a distal, que corresponde ao haustório (DeMason e Thomson 1981; Sekhar e DeMason 1988; Moura et al. 2010; Mazzottini-dos-Santos et al. 2015). A partir da germinação ocorre o desenvolvimento da plântula, a partir do eixo embrionário, concomitantemente ao pronunciado crescimento do haustório, que atua na mobilização das reservas endospermicas (DeMason 1984; Alang et al. 1988; Sugimuma e Murakami 1990; Mazzottini-dos-Santos et al. 2017).

Arecaceae compreende cerca de 2.700 espécies, muitas das quais apresentam elevada importância ecológica e econômica, notadamente associada ao elevado teor de óleo nos frutos e sementes (Dransfield et al. 2008; Oliveira et al. 2013; Mazzottini-dos-Santos et al. 2015). A germinação e o desenvolvimento de plântulas de palmeiras são processos complexos e podem ser variáveis em relação ao ambiente onde essas plantas ocorrem, podendo ser vistos como estratégias adaptativas (Orozco-Segovia et al. 2003; Henderson 2006). No entanto, estudos ultraestruturais sobre a mobilização de reservas seminais em Arecaceae estão restritos àqueles desenvolvidos com *Phoenix dactylifera* (DeMason 1985; DeMason et al. 1985) e *Washingtonia filifera* (DeMason 1988; Sekhar e Demason 1988).

As funções do haustório e do endosperma durante o processo de mobilização de reservas nas sementes de palmeiras não estão completamente elucidadas, especialmente pelo fato do local de síntese de enzimas atuantes no endosperma ainda não ter sido identificado. De modo similar, são pouco conhecidas as particularidades da mobilização lipídica em sementes de palmeiras, especialmente no haustório, bem como do transporte de produtos da hidrólise. Com base em análises estruturais, tem sido apontado que o haustório pode ser o responsável por sintetizar enzimas hidrolíticas, que atuam sobre o endosperma (Oo e Stumpf 1983; Sugimuma e Murakami 1990; Verdeil e Rocher 2002). Entretanto, há indícios de que o endosperma tenha certa autonomia no que se refere a digestão e mobilização de suas reservas, sendo sugerida a presença de enzimas hidrolíticas nos corpos proteicos (Sekhar e DeMason 1990, Zienkiewicz et al. 2014, Mazzottini-dos-Santos et al. 2017), de modo similar ao observado na camada de aleurona de sementes amiláceas (Bewley et al. 2013). Há, ainda, evidências de que os corpos proteicos têm relação com a mobilização lipídica e de mananos. Contudo, os mecanismos pelos quais os corpos

proteicos atuam sobre essas reservas, bem como a forma pela qual os produtos da hidrólise são transportados do endosperma para o haustório e, posteriormente para o eixo vegetativo em crescimento, ainda são desconhecidos para as palmeiras.

A macaúba (*Acrocomia aculeata* Lodd. ex Mart.) é conhecida pelo seu potencial como fonte de recurso para produção de biodiesel no Brasil (Pires et al. 2013). Esta espécie apresenta ampla distribuição em regiões de clima tropical, sobretudo no bioma Cerrado (Dransfield et al. 2008; Lorenzi et al. 2010) e constitui modelo para estudos de germinação de sementes de palmeiras, devido à presença de dormência e de abundantes reservas lipídicas (Moura et al. 2010; Pires et al. 2013).

Foram realizados estudos ultraestruturais, referentes à mobilização de reservas seminais em *A. aculeata*, a fim de responder as seguintes questões: 1) Quais estruturas celulares estão envolvidas na mobilização de reservas seminais? 2) Quais são as particularidades observadas na mobilização das reservas embrionárias e das endospermicas? 3) Existem características citológicas indicativas da função do haustório e do endosperma na mobilização de reservas seminais? 4) Como ocorre o transporte dos produtos da hidrólise das reservas seminais?

## **Material e métodos**

Frutos recém-dispersos de *A. aculeata* foram coletados de espécimes nativos, no município de Montes Claros, MG, Brasil (16°42'34"S; 43°52'48"W). Os frutos foram armazenados por 3–4 meses em caixas plásticas abertas e em temperatura média de 25°C, a fim de permitir a remoção de sementes intactas do pirênio. As sementes foram extraídas utilizando torno manual, desinfestadas pela imersão em solução de hipoclorito de sódio 6% por 15 min., lavadas em água destilada, secas em ambiente sombreado e armazenadas em sacos plásticos por 15–30 dias, em condições ambientais.

Sementes intactas foram cultivadas a partir do método adotado por Mazzottini-dos-Santos et al. (2017). O desenvolvimento das plântulas foi monitorado durante 150 dias, considerando as alterações morfológicas, dentre as quais foram selecionadas sete fases para a coleta das amostras: (I) semente seca; (II) semente embebida; (III) pecíolo cotiledonar com 5mm de comprimento; (IV) pecíolo cotiledonar com 10mm de comprimento; (V)

emissão da primeira bainha foliar; (VI) folha com 50mm de comprimento; (VII) folha com 100mm de comprimento. A Fig. 1 ilustra as características morfológicas observadas em cada fase, tendo sido adaptada de Mazzottini-dos-Santos et al. (2017).

Em cada fase em estudo, foram removidas amostras da região periférica do haustório. No endosperma, as amostras foram removidas da zona de digestão, amostrando-se a fase IV, que é a primeira em que se evidencia essa camada, sendo representativa das demais (Fig. 2). As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965) durante 24–48 h, desidratadas em série etanólica e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 (Roland 1978). Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12-Spirit TEM (Philips/FEI Company, Eindhoven, Netherlands) a 80 kV. Todas as imagens foram processadas usando o programa Corel Graphics Application (CorelDraw, x6, Canadá).

## **Resultados**

### **Ultraestrutura de células do haustório**

As células da protoderme do haustório (na fase I, Fig. 1) possuem paredes delgadas, exceto a face periclinal externa (Fig. 3a), e numerosos plasmodesmos conectam células epidérmicas entre si e entre células vizinhas; o citoplasma é denso, possui numerosos corpos lipídicos posicionados em torno dos corpos proteicos (Fig. 3a, b). Durante a embebição (na fase II, Fig. 1), inicia-se a mobilização proteica no haustório, evidenciada por vacúolos contendo resquícios de proteína (Fig. 3c, d); plastídios com reduzidos grãos de amido ocorrem nessa fase (Fig. 3d). Após a protrusão do pecíolo cotiledonar (fase III, Fig. 1), as células epidérmicas do haustório permanecem com citoplasma denso, com várias organelas, especialmente mitocôndrias, proplastídios e retículo endoplasmático (Fig. 4a, b). Os dictiossomos são pouco numerosos e distribuídos aleatoriamente; apresentam cisternas compactas, liberando vesículas pequenas e pouco densas (Fig. 4b). Os corpos lipídicos são numerosos, muitos dos quais são associados a vacúolos proteicos (Fig. 4c). Há fusão de pequenos vacúolos que contêm remanescentes de proteína, com aspecto floculado (Fig. 4a)

e, frequentemente, massas lipídicas e resíduos de membranas ocorrem em seu interior (Fig. 4d).

O citoplasma das células epidérmicas do haustório (fase IV, Fig. 1) permanecerá em organelas (Fig. 5a). Notadamente adjacente à membrana plasmática, há proliferação de retículo endoplasmático, geralmente associado aos ribossomos (Fig. 5b); nessa região da célula também são encontradas pequenas vesículas (Fig. 5b) e sinuosidades da membrana plasmática, com material de aspecto granular no espaço periplasmático (Fig. 5c). Plastídios com sistema de membranas internas evidentes acumulam grãos de amido (Fig. 5a, c). Há proliferação de organelas, especialmente mitocôndrias e proplastídios; pequenos vacúolos contêm resquícios de proteínas e gotas lipídicas (Fig. 5a, d). Glioxissomos com matriz granular ocorrem no citoplasma, geralmente próximo aos vacúolos proteicos e corpos lipídicos (Fig. 5e).

Na fase V (Fig. 1), ocorre acúmulo de produtos da mobilização endospermica adjacente à epiderme do haustório (Fig. 6a, b). No espaço periplasmático, há grande quantidade de substâncias e a membrana plasmática é sinuosa (Fig. 6b), o que evidencia a ampliação de superfície de membrana. Nessa fase, no citoplasma, há conspícua redução de reserva lipídica e os corpos lipídicos encontram-se associados aos vacúolos proteicos (Fig. 6a). Com o crescimento do haustório, uma camada de células, subjacente à epiderme, acumula grande quantidade de amido (Fig. 6c) e, na região interna, forma-se aerênquima de origem esquizógena (Fig. 6d). As células do aerênquima são volumosas e vacuoladas, podendo apresentar pequenas gotas de lipídios internas ao vacúolo; pequenos grãos de amido ocorrem no citoplasma (Fig. 6d).

Na fase VI (Fig. 1), em que a mobilização de reservas endospermicas é bastante pronunciada, há formação de espaços na parede celular epidérmica, na face periclinal externa (Fig. 6e) e nas faces anticlinais (Fig. 6f), indicando o afrouxamento da parede. Nessa fase, há destacado acúmulo de lipídios nas células da epiderme e os vacúolos apresentam conteúdo mais denso (Fig. 6f). Na fase VII (Fig. 1), a parede apresenta camadas com eletrondensidades variadas e a membrana plasmática é notadamente sinuosa (Fig. 6g). Nessa fase, as células do aerênquima não possuem reservas, exceto os poucos e pequenos grãos de amido; o vacúolo central possui escasso conteúdo de aspecto floculado (Fig. 6h).

## **Ultraestrutura das células do endosperma**

O endosperma apresenta células com paredes espessas, citoplasma pouco denso, com baixa população de organelas, mas rico em corpos lipídicos e proteicos (Fig. 7a). As alterações celulares que ocorrem durante a mobilização das reservas são observadas na zona de digestão, adjacente ao haustório, seguindo um gradiente da região mais externa para a mais interna (Fig. 2a, b). As proteínas são as primeiras substâncias a serem mobilizadas, processo identificado pela redução da eletrodensidade dos corpos proteicos, que é ladeado por corpos lipídicos, os quais se mantêm íntegros (Fig. 7a). Ocorre fusão dos corpos proteicos, formando um único corpo proteico central contendo proteínas e várias inclusões cristaloides (Figs. 2b e 7a). No citoplasma, há mitocôndrias com cristas pouco desenvolvidas (Fig. 7b). Concomitante à mobilização proteica, a partir do espaço periplasmático, ocorre difusão de substâncias eletrodensas pela parede celular (Fig. 7a–e). Os corpos proteicos apresentam contínua redução de proteínas de reserva e de inclusões, e seu conteúdo adquire aspecto floculado (Fig. 7d, e). A dissolução da parede celular é identificada pela perda da eletrodensidade, que se inicia na camada mais interna (Fig. 7f, g). Próximo ao haustório, na zona de digestão, após mobilização das proteínas de reserva, pode haver ruptura da membrana vacuolar culminando com a perda da integridade celular (Fig. 7g) ou a célula mantém único vacúolo central, que pode conter resquícios de substâncias (Fig. 7h). Após a mobilização de lipídios, a parede celular encontra-se parcialmente colapsada; o núcleo e as organelas são degradados e há acúmulo de resíduos de membranas no citoplasma periférico (Fig. 7h). Ao final da degradação citoplasmática, células com paredes colapsadas se acumulam em torno do haustório (Fig. 2b) e há acúmulo de substâncias, especialmente lipídios, nos espaços intercelulares (Fig. 7d, h).

As alterações que ocorrem nas células epidérmicas do haustório e no endosperma durante a germinação e desenvolvimento das plântulas são resumidas nas Tabelas 1 e 2.

## **Discussão**

### **Mobilização de reservas em células embrionárias e endospermicas**



Embora haja diferença temporal em relação ao início da mobilização de reservas e haja ação de diferentes estruturas celulares no haustório e no endosperma de *A. aculeata*, a dinâmica do processo é semelhante para ambos. A partir de análises ultraestruturais, confirmou-se que as proteínas de reserva são as primeiras a serem mobilizadas, seguidas pelos lipídios. Dados semelhantes foram verificados, histoquímica e bioquimicamente, em embrião e endosperma de *P. dactylifera* (DeMason 1985; DeMason et al. 1985), *W. filifera* (DeMason 1988), *B. capitata* (Oliveira et al. 2013) e *A. aculeata* (Bicalho et al. 2016; Mazzottini-dos-Santos et al. 2017). Em geral, a reserva proteica do embrião é importante inicialmente, como fonte de energia para a germinação, além de ser fornecedora de aminoácidos para biossíntese de novas proteínas estruturais ou enzimas; a reserva lipídica, por outro lado, é essencial durante o crescimento da plântula (Tan-Wilson e Wilson 2012; Bewley et al. 2013). Em *A. aculeata*, além das mitocôndrias, a mobilização de reservas do haustório envolve notável ação de corpos proteicos e de glioxissomos, enquanto que, no endosperma, há especial participação dos corpos proteicos. A proliferação de mitocôndrias e glioxissomos na epiderme do haustório é evidenciada apenas após o alongamento do pecíolo cotiledonar, que marca a conclusão da germinação, o que justifica a tardia mobilização lipídica. Glioxissomos também ocorrem na epiderme do haustório de *P. dactylifera* e *W. filifera*, sempre associados a corpos lipídicos (DeMason 1985, 1988). Durante o desenvolvimento de plântulas de *Elaeis guineensis*, foram detectadas isocitratoliase e malatosintetase no haustório, enzimas específicas dos glioxissomos e que são envolvidas com a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e o ciclo do glioxilato (Oo e Stumpf 1983; Alang et al. 1988; Hayashi et al. 2001; Graham 2008).

No haustório e no endosperma de *A. aculeata*, a mobilização lipídica envolve a participação direta dos corpos proteicos. No presente trabalho, evidenciou-se que durante o desenvolvimento das plântulas, após a mobilização das proteínas de reserva, os corpos proteicos passam a assumir função de vacúolos líticos, podendo haver interiorização de corpos lipídicos nessas organelas. No nível subcelular, a descrição desse tipo de interação entre estruturas de reserva seminal é inédita para sementes de palmeiras. A interiorização de corpos lipídicos em vacúolos proteicos contendo enzimas é relatada em cotilédone de sementes germinadas de *Arabidopsis* (Poxleitner et al. 2006) e de *Olea europaea* (Zienkiewicz et al. 2014). De acordo com Poxleitner et al. (2006) e Zienkiewicz et al.

(2014), a interação dos corpos lipídicos com a membrana dos vacúolos proteicos, nas espécies por eles estudadas, é mediada por caleosinas, proteínas que contribuem para o rompimento da camada fosfolipídica dos corpos lipídicos. Em *A. aculeata*, análises prévias apontaram que os corpos proteicos armazenam lipases (Mazzottini-dos-Santos et al. 2017), o que sugere que essa interiorização viabiliza a degradação dos triacilgliceróis (Huang 1996; Hayashi et al. 2001; Poxleitner et al. 2006).

No endosperma de *A. aculeata*, após a mobilização das proteínas de reserva, ocorre fusão de vacúolos proteicos. Em diversas espécies, esse processo é comum durante a germinação, e está envolvido com a formação de vacúolos com propriedades líticas (Poxleitner et al. 2006) de origens variadas: pela fusão de vacúolos contendo enzimas hidrolíticas pré-formadas (Bewley e Black 1994); por meio da ativação de enzimas armazenadas (Jiang et al. 2001); ou pela síntese de enzimas hidrolíticas, que são enviadas para os vacúolos proteicos por vesículas de dictiossomos ou do retículo endoplasmático (Herman e Larkis 1999). Em *A. aculeata*, a inconspícua ocorrência de dictiossomos e retículos endoplasmáticos, a precoce mobilização proteica, associada à intensificação da degradação das demais reservas durante o crescimento da plântula, sugerem que as enzimas hidrolíticas são rapidamente ativadas, e não sintetizadas. Essa característica é considerada energeticamente mais eficiente, uma vez que sintetizar enzimas demandaria maior tempo e gasto energético durante o crescimento da plântula (Buckeridge 2010). De acordo com Jiang et al. (2001), o compartilhamento de funções variadas do corpo proteico, ora como organela de reserva ora como vacúolo lítico, requer uma separação funcional durante o desenvolvimento e maturação da semente, o que pode proporcionar uma fonte rápida de enzimas para iniciar os processos de degradação durante o início da germinação.

### **Características citológicas e função do haustório e do endosperma**

A partir de avaliações ultraestruturais, é evidente que o haustório de *A. aculeata* é altamente especializado em absorção. É notório que, inicialmente, o haustório desempenha papel de reserva; corpos proteicos e corpos lipídicos são estruturas celulares que denotam essa função, conforme observado por Mazzottini-dos-Santos et al. (2017). Embriões de sementes ortodoxas, tipicamente, apresentam grandes quantidades de reservas,

especialmente lipídios e proteínas (Panza et al. 2004; Moura et al. 2010), como ocorre em algumas espécies de palmeiras (DeMason 1988; Sekhar e DeMason 1988; Alang et al. 1988; Oliveira et al. 2013) e é o caso de *A. aculeata*. Durante desenvolvimento de plântulas dessa espécie, concomitantemente à degradação dos lipídios, há armazenamento temporário de amido no haustório, o que também foi identificado, por meio de análises bioquímicas (Bicalho et al. 2016) e histoquímicas (Mazzottini-dos-Santos et al. 2017). Dados semelhantes foram obtidos para *P. dactylifera* (DeMason 1985), *W. filifera* (DeMason 1988) e *B. capitata* (Oliveira et al. 2013), embora não haja inferência sobre quais estruturas celulares estejam envolvidas com a conversão de compostos, identificadas neste trabalho. A presença de glioxissomos no haustório, os quais foram amplamente registrados aqui, está relacionada com o acúmulo de carboidratos a partir da degradação dos lipídios. Esse processo ocorre por meio da gluconeogênese (Alang et al. 1988; Graham 2008) e elucida a função de conversão de compostos no haustório de *A. aculeata*, já sugerida por Mazzottini-dos-Santos et al. (2017).

Com base em nossos resultados, não há nenhuma evidência citológica de que o haustório tenha função de secretar enzimas para o endosperma. Os poucos dictiossomos, presentes nas células da epiderme do haustório de *A. aculeata*, possivelmente, estão associados com a formação de novas paredes celulares, devido às constantes mitoses e crescimento celular na epiderme dessa estrutura, como observado por Mazzottini-dos-Santos et al. (2017). Relação semelhante foi verificada durante crescimento do haustório de *P. dactylifera* (DeMason 1985). O retículo endoplasmático, associado a ribossomos, pode estar envolvido com síntese de novas enzimas, essenciais para a degradação de amido e lipídios, que se acumulam no haustório, aspecto também verificado por métodos histoquímicos nas fases em que há intensificação da mobilização de reservas endospermicas (Mazzottini-dos-Santos et al. 2017). Associado à ausência de estruturas celulares indicativas de secreção para o endosperma (tais como vesículas oriundas do retículo endoplasmático ou dictiossomos), o afrouxamento das paredes das células epidérmicas, as conspícuas sinuosidades da membrana plasmática e o acúmulo de substâncias no haustório, evidenciam a eficiência de absorção dessa estrutura.

Os dados aqui registrados confirmam que, durante a mobilização de reservas, as células do endosperma de *A. aculeata* não possuem população de organelas que as capacite

a sintetizar novas enzimas, mas é evidente a participação dos corpos proteicos na mobilização de reservas. Devido às características celulares, Moura et al. (2010) sugeriram que o endosperma de *A. aculeata* seja considerado apenas como um tecido de reserva, contudo, neste trabalho, o endosperma foi identificado como tecido altamente dinâmico, corroborando o sugerido por Mazzottini-dos-Santos et al. (2017). Em *P. dactylifera*, a ausência de retículo endoplasmático, dictiossomas e ribossomos nas células do endosperma também foi relacionada à incapacidade de ocorrer síntese enzimática nesse tecido (DeMason et al. 1983). Contudo, há proteínas embrião-endosperma específicas, o que é consistente com a hipótese de que o endosperma armazena enzimas hidrolíticas, possivelmente nos corpos proteicos (Sekhar e DeMason 1988). As alterações celulares que ocorrem no endosperma após a germinação, tais como a difusão de substâncias pela parede celular, a redução de reservas dos corpos proteicos, e o início da dissolução da parede celular na face periplasmática, constituem evidências de que enzimas hidrolíticas estão armazenadas no próprio tecido endospermico. Análises histoquímicas no endosperma de sementes de *A. aculeata* comprovaram que os corpos proteicos são sítios de lipases, que são transferidas para o citoplasma e atuam na superfície dos corpos lipídicos (Mazzottini-dos-Santos et al. 2017), semelhante ao que foi observado durante a germinação de *O. europaea* (Zienkiewicz et al. 2014). Endo- $\beta$ -mananase e  $\alpha$ -galactosidase, enzimas envolvidas com a hidrólise de galactomananos, ocorrem no endosperma de sementes secas de *A. aculeata* e, no endosperma adjacente ao haustório, sua atividade é elevada (Bicalho et al. 2016; Mazzottini-dos-Santos et al. 2017). No endosperma de *P. dactylifera*, foram diagnosticadas diversas enzimas, dentre as quais, por meio de imunocitoquímica, identificou-se que o sítio de  $\alpha$ -galactosidase é o corpo proteico (DeMason et al. 1985; Sekhar e DeMason 1990). No endosperma de *P. dactyliferae W. filifera*, a fosfatase ácida, enzima envolvida com a mobilização de carboidratos e fosfatos, também está armazenada nos corpos proteicos (DeMason et al. 1989).

### **Transferência de reservas no haustório e no endosperma**

Os compostos de reserva do endosperma são hidrolisados, os produtos são transportados para o haustório, onde podem ficar armazenados na forma de amido transitório, e,

posteriormente, enviados para o eixo vegetativo em crescimento. No endosperma de *A. aculeata*, as substâncias são transportadas pela rota apoplástica, através da parede celular. Por outro lado, no haustório, há evidências de transporte simplástico, por meio de numerosos plasmodesmos. Redução na eletrondensidade e formação de espaços na parede das células do haustório, bem como o acúmulo de substâncias no espaço periplasmático e as sinuosidades da membrana plasmática parecem indicar a rota de absorção dos produtos do endosperma. Há inferências de que as ampliações da membrana plasmática, também verificadas em *P. dactylifera*, estejam relacionadas com o transporte de solutos do apoplasto para o simplasto, sendo posteriormente translocados via plasmodesmos (Demason 1985). Contudo, as associações dessas alterações celulares não são descritas para outras palmeiras estudadas, de modo que a forma como ocorre a absorção de substâncias do endosperma pelo haustório ainda não é bem esclarecida. Acredita-se que a formação de espaços, associada às alterações na eletrondensidade nas paredes das células epidérmicas, podem estar relacionadas com o aumento da porosidade e afrouxamento da parede, o que facilita a absorção direta de compostos do endosperma, tais como lipídios. Nossos resultados mostram que, com a intensificação da mobilização de reservas endosperáticas, há concentração de substâncias, especialmente lipídios, na superfície haustorial, os quais são identificados novamente na epiderme do haustório em fases posteriores. Estudos prévios confirmaram, com base em análises histoquímicas, o acúmulo de lipídios no haustório, o que sugere que sua absorção seja facilitada pela pressão exercida entre a estrutura do haustório em crescimento e o endosperma rígido, que o envolve (Mazzottini-dos-Santos et al. 2017). A pressão exercida pela expansão do haustório contra o endosperma parece explicar a passagem de lipídios pela barreira imposta pela parede celular. O efeito de pressão como facilitadora para a passagem de lipídios pela parede é descrito por Paiva (2016) para explicar a liberação de óleos de células secretoras; sem tal pressão o óleo não atravessaria a parede, reconhecidamente hidrofílica.

Nas células do endosperma de *A. aculeata*, os plasmodesmos são inconspícuos, assim como verificado por Moura et al. (2010). As alterações gradativas da matriz dos corpos proteicos, associadas à formação de camadas eletrodensas, que se disseminam por toda a extensão da parede, evidenciam o possível transporte de enzimas e produtos da hidrólise entre as células via apoplasto. O transporte de enzimas dos corpos proteicos para

células adjacentes via parede é congruente com o previamente observado em *P. dactylifera* que, embora possua plasmodesmos nas paredes espessadas do endosperma, também apresenta disseminação de enzimas através da parede (Sekhar e DeMason 1990).

## **Conclusões**

Tanto no endosperma quanto no haustório, este trabalho registrou que as proteínas estão armazenadas em corpos proteicos e são as primeiras reservas a serem mobilizadas, seguindo-se os lipídios, armazenados em corpos lipídicos. Os corpos proteicos e os glioxissomos são organelas envolvidas com a mobilização de lipídios no haustório, enquanto que apenas os corpos proteicos exercem essa função no endosperma. Não há evidências citológicas de que o haustório atue na secreção de enzimas hidrolíticas para o endosperma, mas apenas como estrutura de reserva e de absorção. O endosperma possui estrutura celular de armazenamento, mas também desempenha importante função durante a mobilização de lipídios e de carboidratos da parede, com possível atividade enzimática. No haustório, o transporte de substâncias entre as células ocorre via simplasto, enquanto no endosperma, via apoplasto.

**Agradecimentos** Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil, processo CRA-APQ-01335-13) pelo apoio financeiro; ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (<http://www.microscopia.ufmg.br>), pelo processamento das amostras, uso dos equipamentos e obtenção de imagens; à Dra. Maria Olívia Mercadante Simões, pela cessão de equipamentos e pelo apoio em várias etapas deste trabalho. H.C.M.S. agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brasil), pelas bolsas de doutorado. D.M.T.O., E.A.S.P. e L.M.R. agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil, processos 308117/2014-0, 306790-2015-7 e 304627/2015-1), pelas bolsas de produtividade em pesquisa.

## Referências

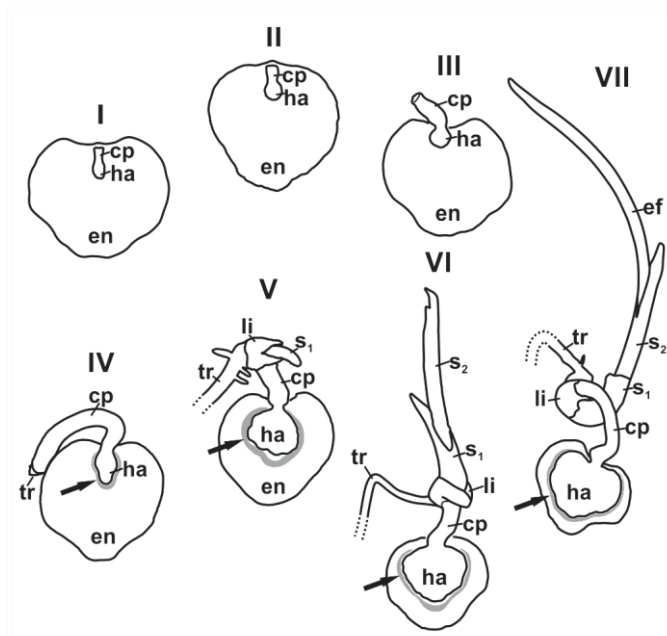
- Alang ZC, Moir GFJ, Jones LH (1988) Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Ann Bot* 61:261–268
- Berton LHC, Azevedo Filho A, Siqueira WJ, Colombo CA (2013) Seed germination and estimates of genetic parameters of promising macaw palm (*Acrocomia aculeata*) progenies for biofuel production. *Ind Crop Prod* 51:258–266
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. London: Plenum Press
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer, New York, USA
- Bicalho EM, Motoike SY, Borges EEL, Ataíde GM, Guimarães VM (2016) Enzyme activity and reserve mobilization during macaw palm (*Acrocomia aculeata*). *Acta Bot Bras* 30:437–444
- Buckeridge MS (2010) Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiol* 154:1017–1023
- DeMason DA (1984) Growth parameters in the cotyledon of date seedlings. *Bot Gaz* 145:176–183
- DeMason DA (1985) Histochemical and ultrastructural changes in the haustorium of date (*Phoenix dactylifera* L.). *Protoplasma* 126:168–177
- DeMason DA (1988) Seedling development in *Washingtonia filifera* (Arecaceae). *Bot Gaz* 149:45–56
- DeMason DA, Sexton R, Gorman M, Reid JSG (1985) Structure and biochemistry of endosperm breakdown in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Protoplasma* 126:159–167
- DeMason DA, Thomson WW (1981) Structure and ultrastructure of the cotyledon of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Bot Gaz* 142:320–328
- DeMason DA, Sexton R, Grant Reid JS (1983) Structure, composition and physiological state of the endosperm of *Phoenix dactylifera* L. *Ann Bot* 52:71–80
- DeMason DA, Stillman JI, Ellmore GS (1989) Acid phosphatase localization in seedling tissues of the palms, *Phoenix dactylifera* and *Washingtonia filifera*, and its relevance to controls of germination *Can J Bot* 67:1103–1110

- Dransfield J, Uhl NW, Asmussen CBA, Baker WJ, Harley MM, Lewis CE (2008) *Genera palmarum: the evolution and classification of palms*. Kew Publishing, Kew, UK
- Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* 59:115–142
- Hayashi Y, Hayashi M, Hayashi H, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2001) Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of the *Arabidopsis thaliana ped1* mutant. *Protoplasma* 218:83–94
- Henderson F (2006) Morphology and anatomy of palm seedlings. *Bot Rev* 72:273–329
- Herman EM, Larkins BA (1999) Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11:601–613
- Huang AHC (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol* 110:1055–1061
- Jiang L, Phillips TE, Hamm CA, Drozdowicz YM, Rea PA, Maeshima M, Rogers SW, Rogers JC (2001) The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *J Cell Biol* 155:991–1002
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137–138
- Lorenzi H, Noblick L, Kahn F, Ferreira E (2010) *Flora Brasileira: Arecaceae (palmeiras)*. Instituto Plantarum, Nova Odessa
- Mazzottini-dos-Santos HC, Ribeiro LM, Mercadante-Simões MO, Sant’Anna-Santos BF (2015) Ontogenesis of the pseudomonomerous fruit of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): a new approach to the development of pyrenarium fruits. *Trees* 29:199–214
- Mazzottini-dos-Santos HC, Ribeiro LM, Oliveira DMT (2017) Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae): dynamics of reserve mobilization and accumulation. *Protoplasma* 254:1563–1578
- Moura EF, Ventrella MC, Motoike SY (2010) Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Sci Agr* 67:375–495
- Oliveira NCC, Lopes PSN, Ribeiro LM, Mercadante-Simões MO, Oliveira LAA, Silvério FO (2013) Seed structure, germination, and reserve mobilization in *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees* 27:1633–1645
- Oo KC, Stumpf PK (1983) Some enzymic activities in the germinating oil palm (*Elaeis guineensis*) seedling. *Plant Physiol* 73:1028–1032
- Orozco-Segovia A, Batis AI, Roja-Aréchiga M, Mendoza A (2003) Seed biology of palms: a review. *Palms* 47:79–94

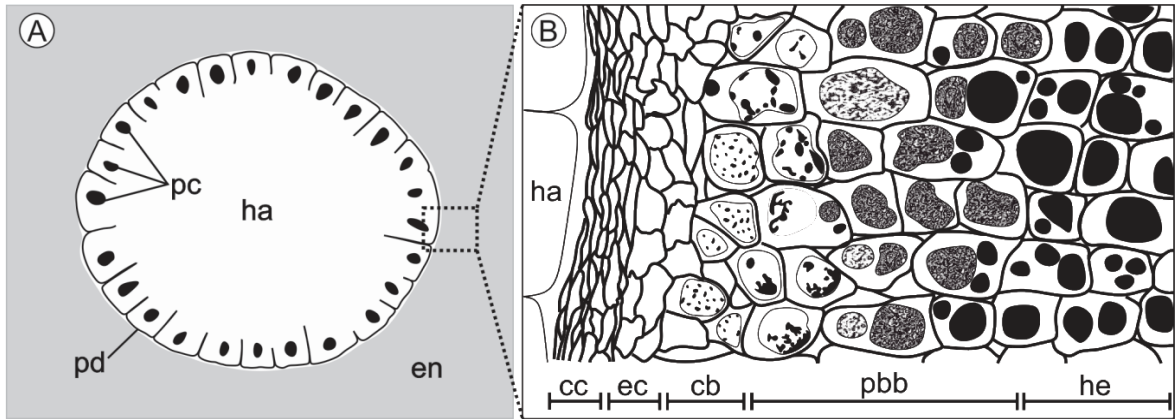


- Paiva EAS (2016) How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Ann Bot* 117: 533-540
- Panza V, Láinez V, Maldonado S (2004) Seed structure and histochemistry in the palm *Euterpe edulis*. *Bot J Linn Soc* 145:445–453
- Poxleitner M, Rogers SW, Samuels AL, Browse J, Rogers JC (2006) A role of caleosin in degradation of oil-body storage lipids during seed germination. *Plant J* 47:917–933
- Pires TP, Souza ES, Kuki KN, Motoike SY (2013) Ecophysiological traits of the macaw palm: a contribution towards the domestication of a novel oil crop. *Ind Crop Prod* 44:200–210
- Roland AM (1978) General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL (ed.), *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. Elsevier, New York
- Sekhar KNC, DeMason DA (1988) Quantitative ultrastructure and protein composition of date palm (*Phoenix dactylifera*) seeds: a comparative study of endosperm vs. embryo. *Am J Bot* 75:323–329
- Sekhar KNC, DeMason DA (1990) Identification and immunocytochemical localization of  $\alpha$ -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Planta* 181:53–61
- Sugimura Y, Murakami T (1990) Structure and function of the haustorium in germinating coconut palm seed. *JpnAgr Res Q* 24:1–14
- Tan-Wilson AL, Wilson K (2012) Mobilization of seed protein reserves. *Physiol Plantarum* 145:140–153
- Verdeil JL, Hocher V (2002) Digestion and absorption of food in plants: a plant stomach. *Trends Plant Sci* 7:280–281
- Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rejón JD, Alché JD, Castro AJ, Rodríguez-García MI (2014) Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *J Exp Bot* 65:103–115

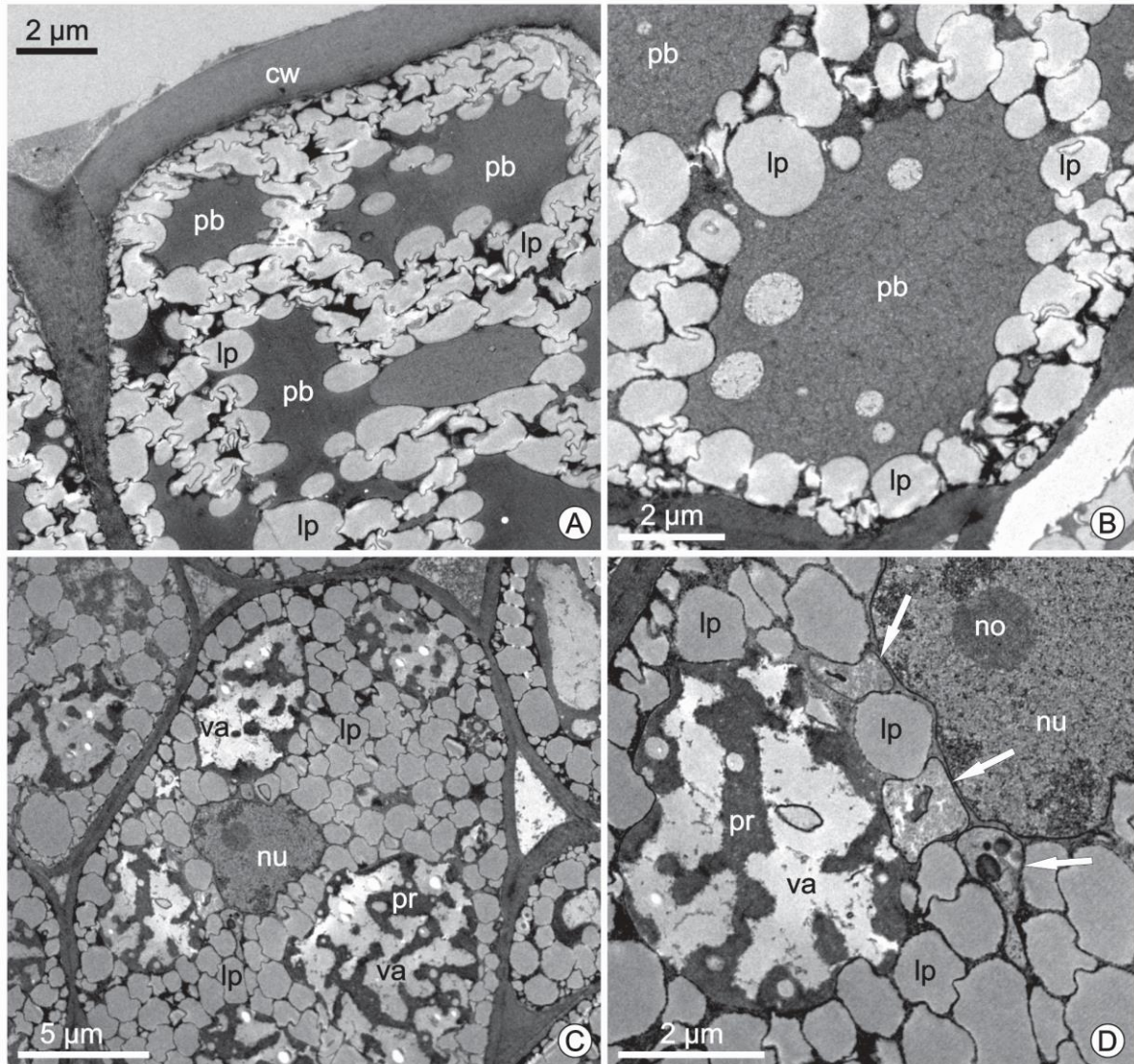
## Figuras



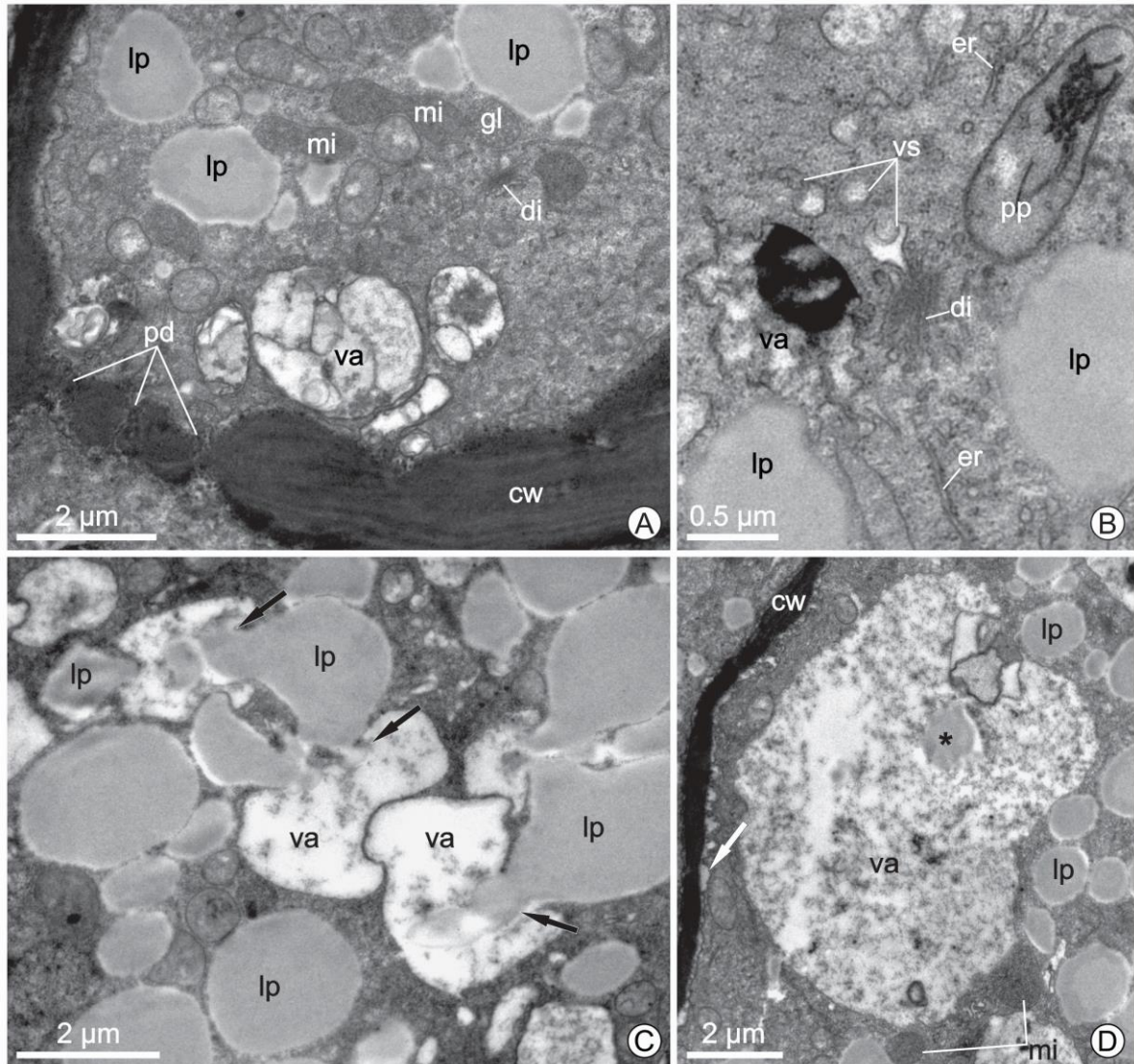
**Fig. 1** Diagramas de sementes e plântulas ao longo do desenvolvimento de *Acrocomia aculeata* (fases I–VII), adaptados de Mazzottini-dos-Santos et al. (2017). I Semente seca com embrião linear. II Semente embebida. III Semente germinada, evidenciado alongamento do pecíolo cotiledonar. IV Plântula com pecíolo cotiledonar alongado e raiz principal emitida. IV–VII Zona de digestão do endosperma adjacente ao haustório (*setas pretas*); notar aumento do tamanho do haustório conforme endosperma é consumido. V Plântula com primeira bainha foliar envolvida pela lígula. VI Plântula com segunda bainha foliar emitida. VII Plântula com primeiro eofilo. *cp* pecíolo cotiledonar; *ef* eofilo; *en* endosperma; *há* haustório; *li* lígula; *s1* primeira bainha foliar; *s2* segunda bainha foliar; *tr* raiz principal



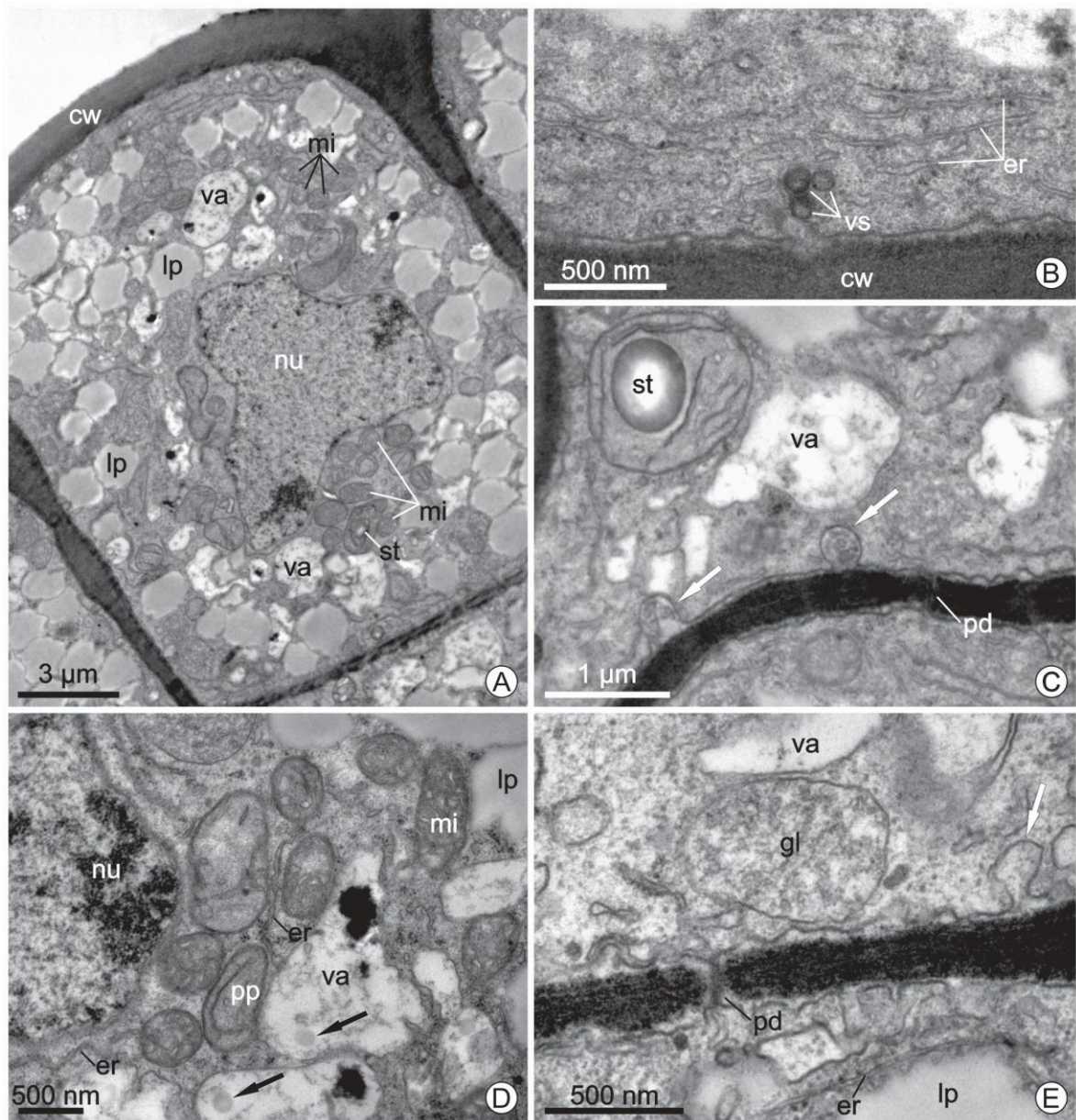
**Fig. 2** Diagramas da semente de *Acrocomia aculeata* em secção transversal, adaptados de Mazzottini-dos-Santos et al. (2017). **a** Haustório com invaginações na protoderme e envolvido pelo endosperma (cinza); a zona de digestão do endosperma é adjacente ao haustório (retângulo pontilhado). **B** Zona de digestão do endosperma com cinco regiões distintas: região mais externa com endosperma rígido (*he*); região intermediária onde ocorre degradação dos corpos proteicos (*pbb*) seguida pela região onde o citoplasma é degradado (*cb*); região mais interna onde há o esgotamento celular (*ec*), seguida pela região onde há acúmulo de células com parede celular colapsada em torno do haustório (*cc*). Notar gradiente de alterações dos corpos proteicos a partir das regiões externas: corpos proteicos densos; de aspecto granular; com reduzida quantidade de proteínas de reserva e vacúolo com resquícios de proteínas. *en* endosperma; *há* haustório; *pc* cordões procambiais; *pd* protoderme



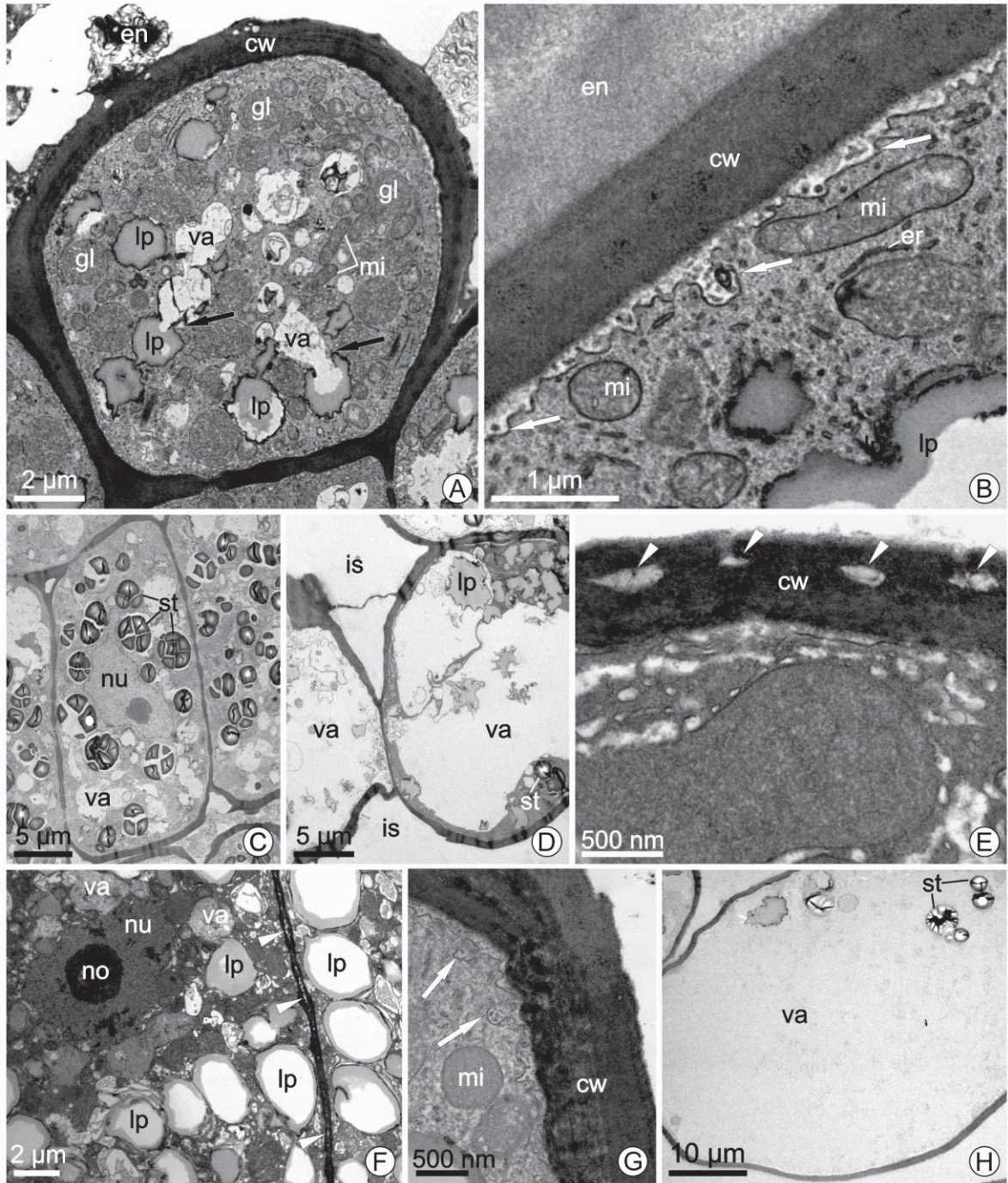
**Fig. 3** Protoderme do haustório de *Acrocomia aculeata* nas fases I e II. **a, b** fase I; **c, d** fase II. **a** Célula com parede da face periclinal externa mais espessa em relação às demais; citoplasma denso contendo corpos proteicos e corpos lipídicos. **b** Periferia da célula destacando corpo proteico com matriz eletrondensa e envolvido por corpos lipídicos. **c** Célula contendo vacúolos proteicos e corpos lipídicos íntegros. **d** Região central da célula evidenciando o núcleo com nucléolo evidente; vacúolo contendo resquícios de proteínas (*seta preta*), indicando início da mobilização proteica durante a embebição; notar amiloplastos (*seta branca*). *Cw* parede celular; *lp* corpos lipídicos; *pb* corpos proteicos; *no* nucléolo; *nu* núcleo; *va* vacúolo proteico



**Fig. 4** Epiderme do haustório de *Acrocomia aculeata* na fase III. Periferia da célula, destacando: **a** Plasmodesmos conectando células epidérmicas, proliferação de mitocôndriase proplastídios e fusão de pequenos vacúolos. **b** Dictiossomos liberando vesículas, vacúolos contendo compostos fenólicos, retículos endoplasmáticos e proplastídios. **c** Vacúolos com remanescente de proteínas envolvendo corpos lipídicos (*setas pretas*). **d** Sinuosidades na membrana plasmática (*setas brancas*) e inclusão lipídica no vacúolo proteico (\*). *cw* parede celular; *di* dictiossomo; *er* retículo endoplasmático; *gl* glioxissomo; *lp* corpos lipídicos; *mi* mitocôndria; *pd* plasmodesmos; *pp* proplastídios; *va* vacúolo; *vs* vesículas



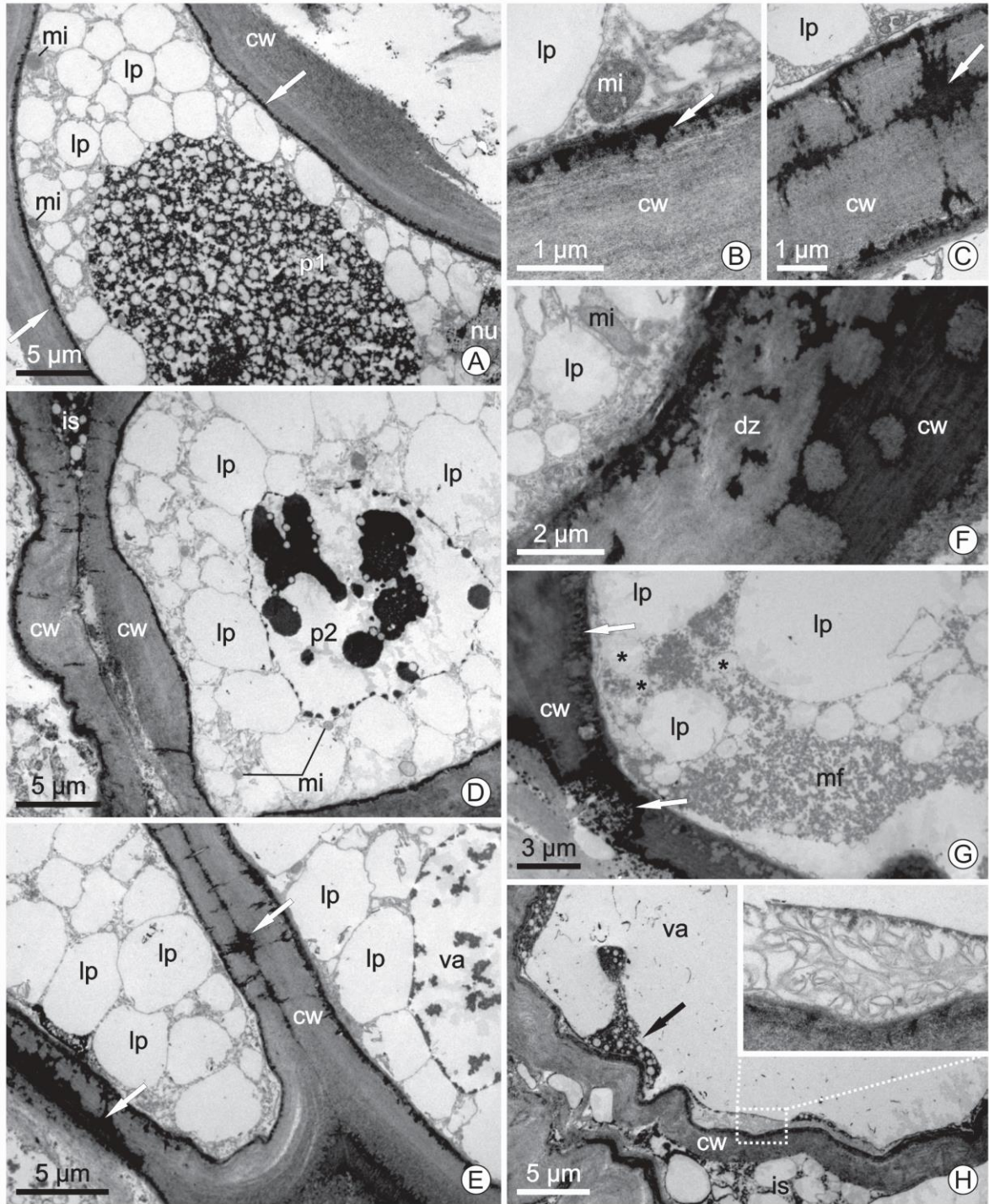
**Fig. 5** Epiderme do haustório de *Acrocomia aculeata* na fase IV. **a** Célula com citoplasma denso e proliferação de organelas. Periferia da célula, destacando: **b** Concentração de retículo endoplasmático e vesículas, próximos à membrana plasmática. **c** Substâncias acumuladas no espaço periplasmático, sinuosidades da membrana plasmática (*setas brancas*) e amiloplasto com grão de amido. **d** Detalhe da região central da célula, próximo ao núcleo: notar as numerosas mitocôndrias, proplastídios e pequenos vacúolos contendo gotas lipídicas (*setas pretas*). **e** Periferia da célula, destacando plasmodesmo, sinuosidade na membrana plasmática (*seta branca*) e glioxissomo com matriz granular, próximo ao vacúolo proteico. *Cw* parede celular; *er* retículo endoplasmático; *gl* glioxissomo; *lp* corpos lipídicos; *mi* mitocôndria; *nu* núcleo; *pd* plasmodesmos; *pp* proplastídios; *st* amido; *va* vacúolo; *vs* vesículas



**Fig. 6** Haustório de *Acrocomia aculeata* nas fases V–VII. **a–d** fase V; **e–f** fase VI; **g–h** fase VII. **a** Célula epidérmica com notável redução de corpos lipídicos; vacúolos associados a corpos lipídicos (*setas pretas*) e proliferação de glioxissomos. **b** Detalhe da periferia da célula, revestida por resíduos do endosperma; notar o acúmulo de substâncias no espaço periplasmático e destacada sinuosidade da membrana plasmática (*setas brancas*). **c** Células subjacentes à epiderme com acúmulo de amido. **d** Células da camada interna do haustório com grandes espaços intercelulares, vacúolos volumosos contendo lipídios e grãos de amido no citoplasma. **e–f** Células epidérmicas com espaços na parede celular (*pontas de*

*setas*) e conspícuo acúmulo de lipídios no citoplasma. **g** Parede celular com notáveis camadas de diferentes eletrodensidade e destacada sinuosidade da membrana plasmática (*setas brancas*). **h** Camada interna do haustório: célula contendo um grande vacúolo central com conteúdo fibrilar e pequenos grãos de amido. *cw* parede celular; *en* endosperma; *er* retículo endoplasmático; *gl* glioxissomo; *is* espaço intercelular; *lp* corpos lipídicos; *mi* mitocôndria; *no* nucléolo; *nu* núcleo; *st* amido; *va* vacúolo





**Fig. 7** Endosperma de *Acrocomia aculeata* na fase IV. **A** Célula localizada na região intermediária da zona de digestão (*pbb*) com destaque do conteúdo eletrondenso no citoplasma adjacente à parede celular (*setas brancas*), indicando início de mobilização de compostos pela parede; citoplasma contendo mitocôndrias, numerosos corpos lipídicos e um único e volumoso corpo proteico no centro da célula; notar aspecto granular do corpo proteico (*p1*). **b, c** Periferia da célula destacando mitocôndria e alteração no padrão de

eletrodensidade da parede, indicando mobilização de composto através da parede celular. **d** Célula localizada na região intermediária da zona de digestão (*pbb*), apresentado corpo proteico com reduzida quantidade de proteínas de reserva (*p2*); notar conteúdo no espaço intercelular. **e** Células localizadas na região intermediária da zona de digestão, mais próximas do haustório (*cb*), mostrando vacúolo com resquícios de proteína (*va*), envolvido por corpos lipídicos íntegros, e alterações na eletrondensidade da parede (*setas brancas*); **f** periferia da célula, destacando zona de digestão da parede celular; **g** alteração da integridade dos corpos lipídicos (\*), com estágio avançado da dissolução da parede celular (*setas brancas*). **h** Célula localizada na região interna da zona de digestão do endosperma (*ec*), destacando grande vacúolo central com restante de compostos (*seta preta*); notar remanescentes de membranas no fino citoplasma (*retângulo e destaque*), parede celular parcialmente colapsada e acúmulo de compostos, especialmente lipídios, no espaço intercelular. *cw* parede celular; *dz* zona de dissolução; *is* espaço intercelular; *lp* corpos lipídicos; *mf* material fibrilar; *mi* mitocôndria; *in* inclusões; *va* vacúolo

## Tabelas

**Tabela1** Alterações celulares que ocorrem na epiderme do haustório de *Acrocomia aculeata* durante o desenvolvimento de plântulas. (+) raro, (++) pouco frequente; (+++) frequente

Estruturas celulares	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V	Fase VI	Fase VII
Amiloplasto	+	++	++	+++	++	++	++
Corpo lipídico	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
Corpo proteico	+++	++	+	+	+	+	+
Dictiossomo	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Glioxissomo	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Mitocôndria	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Retículo endoplasmático	+	+	+++	+++	+++	+++	+++

**Tabela 2** Alterações celulares que ocorrem na zona de digestão do endosperma de *Acrocomia aculeata* durante a mobilização de reservas. *he* região mais externa com endosperma rígido; *pbb* região intermediária onde ocorre degradação dos corpos proteicos; *cb* região onde o citoplasma é degradado; *ec* região mais interna onde há o esgotamento celular; *cc* região onde há acúmulo de células com parede celular colapsada. (+) raro, (++) pouco frequente; (+++) frequente.

Estruturas celulares	He	Pbb	Cb	Ec	Cc
Amiloplasto	+	+	+	+	+
Corpo lipídico	+++	+++	++	+	+
Corpo proteico	+++	+++	++	+	+
Dictiossomo	+	+	+	+	+
Glioxissomo	+	+	+	+	+
Mitocôndria	++	+++	+++	++	+
Retículo endoplasmático	+	+	+	+	+