

DAIANE SOUZA DIAS

ARMAZENAMENTO E DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias

Orientador: Paulo Sergio Nascimento Lopes

Montes Claros

2012

Dias, Daiane Souza.

M118d
2013

Armazenamento e dormência de sementes de *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae)/Daiane Souza Dias. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2013.

63 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientador: Prof. Paulo Sérgio Nascimento Lopes.

Banca examinadora: Renato Mendes Guimarães, Letícia Renata de Carvalho, Leonardo Monteiro Ribeiro, Paulo Sérgio Nascimento Lopes.

Inclui bibliografia: f. 57-63.

1. Armazenamento – Semente. 2. Dormência – Germinação. 3. Coquinho Azedo. I. Lopes, Paulo Sérgio Nascimento. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 543

DAIANE SOUZA DIAS

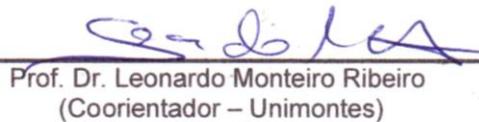
ARMAZENAMENTO E DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae)



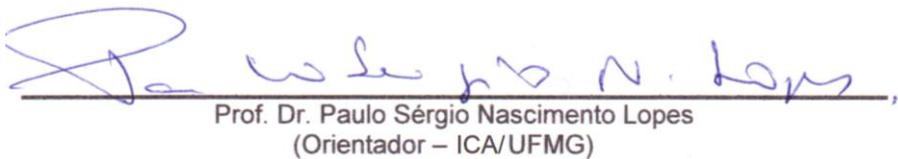
Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães
(UFLA)



Prof. Dra. Leticia Renata de Carvalho
(ICA/UFMG)



Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro
(Coorientador – Unimontes)



Prof. Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes
(Orientador – ICA/UFMG)

Aprovada em 21 de dezembro de 2012.

Montes Claros
2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu fiel amigo, ter me ajudado nessa jornada e me dado forças e coragem de lutar. A ele ofereço toda honra e glória, pois me proporcionou mais esta grande vitória.

Aos meus pais, Tito e Julinda, que não mediram esforços para me ajudar a passar os momentos difíceis dessa caminhada. Agradeço a eles o pelo incentivo constante.

Ao meu esposo, por seu incentivo, amor, compreensão e apoio, a ajuda constante nos experimentos, na confecção dos trabalhos e por me proporcionar autoconfiança.

Aos meus irmãos, Doane, Deivid, Daniel e Danilo, por terem me apoiado e torcido por mim, para alcançar minha vitória.

Aos meus sogros, tios e primos. Aos cunhados, Samuel, Cida, Ana, Jackson e Liliane que confiaram e me ajudaram em vários aspectos.

Ao professor e orientador Paulo Sérgio o incentivo, a amizade, e a imensa paciência comigo.

Ao professor e coorientador Leonardo agradeço a compreensão, os ensinamentos, a paciência e a amizade e por ter disponibilizado o espaço do Laboratório de Micropropagação da Unimontes (LAM) para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos alunos do grupo de estudo GEFEN: Lucas, Evellyn, Diemesson, Stephanie, Herick, Miriam, Vander e Guilherme a amizade e a ajuda nos experimentos.

Aos alunos do LAM: Vanessa, Cleidiana, Amanda, Ana Paula, Joyce, Guilherme, Ludmilla, Silma, Cileane e Renata, a imensa contribuição intelectual e a ajuda nos experimentos.

Aos colegas do mestrado, entre elas, Érica, Welha, Joseane, Germana, Hellen Cássia, Ana Cristina, Kênia, Nicoleta e Aldenir, a força nos momentos de desânimo e os bons momentos compartilhados.

A CAPES, a FAPEMIG, a UFMG e a UNIMONTES os recursos fornecidos. E a todos que de forma direta ou indireta, me ajudaram a vencer. Muito obrigada!

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2 - TOLERÂNCIA DAS SEMENTES À DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO EM COQUINHO AZEDO

- 1 - Teor de água em função do tempo de desidratação das sementes de *Butia capitata* submetidas aos métodos de desidratação em sílica gel (20°C) e em estufa (35°C)..... 29
- 2 - Percentual de germinação de embriões cultivados *in vitro* e de emissão de raízes e bainhas em plântulas provenientes de sementes de *Butia capitata* com teor de água inicial (21,3%) e após a desidratação (10, 5 e 3,4%) em sílica gel (20°C) e (10, 5, e 3,5%) em estufa (35°C)..... 30
- 3 - Percentual de germinação de embriões de *Butia capitata* excisados de sementes sem armazenamento (S.A) ou armazenados, os embriões isolados e as sementes, em nitrogênio líquido (-196°C), congelamento rápido (-18°C CR), congelamento lento (-18°C CL), congelamento lento (-10°C) e ambiente (média 22°C)..... 31
- 4 - Percentual de emissão de bainhas em plântulas de *Butia capitata*, provenientes de embriões isolados ou sementes sem armazenamento (S.A) ou armazenados em: nitrogênio líquido (-196°C), congelamento rápido (-18°C CR), congelamento lento (-18°C CL), congelamento lento (-10°C) e ambiente (média de 22°C)..... 32
- 5 - Percentual de emissão de bainhas em plântulas de *Butia capitata*, provenientes de embriões isolados ou sementes sem armazenamento (S.A) ou armazenados em: nitrogênio líquido (-196°C), congelamento rápido (-18°C CR), congelamento lento (-18°C CL), congelamento lento (-10°C) e ambiente (média de 22°C) congelamento lento (-10°C) e ambiente (média de 22°C)..... 32

CAPÍTULO 3 - ESTRUTURAS DA SEMENTE, SACAROSE E GA₃ INFLUENCIAM A GERMINAÇÃO DE *Butia Capitata* (Arecaceae)

- 1 - Percentual de germinação *in vitro* e de emissão de raízes e bainhas em plântulas de *Butia capitata* provenientes de: semente sem opérculo, embrião isolado, corte longitudinal da semente, corte transversal da semente e semente inteira..... 48
- 2 - Massa seca das bainhas, raízes, haustório, pecíolo cotiledonar e tubo em plântulas de *Butia capitata* após o cultivo *in vitro* dos embriões associados às estruturas da semente: semente sem opérculo, embrião isolado, semente inteira, corte transversal da semente e corte longitudinal da semente..... 49

- 3 - Percentual de germinação das sementes de *Butia capitata* pré-
embebidas em GA₃ e cultivadas sem (A) e com opérculo (B)..... **50**
- 4 - Percentual de germinação dos embriões de *Butia capitata*, excisados
de sementes pré-embebidas em soluções de GA₃..... **52**
- 5 - Diâmetro da raiz principal, diâmetro do haustório e comprimento do
tubo das plântulas de *Butia capitata* originadas de embriões
cultivados *in vitro*, que foram excisados de sementes pré-embebidas
em soluções com diferentes concentrações de GA₃..... **53**

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 OBJETIVOS.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS.....	11
3.2 TOLERÂNCIA DA SEMENTE AO ARMAZENAMENTO	12
3.2.1 Criopreservação.....	14
3.3 CULTIVO DE EMBRIÕES E DORMÊNCIA.....	14
3.4 EFEITO DA GIBERELINA NA GERMINAÇÃO IN VITRO	17
CAPÍTULO 2 - TOLERÂNCIA DAS SEMENTES À DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO EM COQUINHO AZEDO.....	19
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1 COLETA DE FRUTOS E BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES..	23
2.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E VIGOR	23
2.3 AVALIAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DO EMBRIÃO E ENDOSPERMA DA SEMENTE	24
2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS SEMENTES QUANTO AO COMPORTAMENTO NO ARMAZENAMENTO.....	25
2.5 TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO.....	25
2.6 TOLERÂNCIA DAS SEMENTES E EMBRIÕES ISOLADOS ÀS BAIXAS TEMPERATURAS	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4 CONCLUSÃO.....	36

CAPÍTULO 3 - ESTRUTURAS DA SEMENTE, SACAROSE E GA₃	
INFLUENCIAM A GERMINAÇÃO DE BUTIA CAPITATA	
(ARECACEAE)..... 37	
	RESUMO 37
	ABSTRACT 38
1	INTRODUÇÃO..... 39
2	MATERIAL E MÉTODOS..... 41
2.1	COLETA E AVALIAÇÕES PRELIMINARES 41
2.2	EFEITO DA SACAROSE E DE ESTRUTURAS DA SEMENTE NA GERMINAÇÃO IN VITRO..... 42
2.3	EFEITO DO GA ₃ NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES 43
2.4	EFEITO DO GA ₃ NA GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES ISOLADOS..... 44
3	RESULTADOS 45
3.1	EFEITO DA SACAROSE E DE ESTRUTURAS DA SEMENTE NA GERMINAÇÃO IN VITRO..... 47
3.2	EFEITO DO GA ₃ NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES 49
3.3	EFEITO DO GA ₃ NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES ISOLADOS..... 51
4	DISCUSSÃO..... 53
5	CONCLUSÃO 56
	REFERÊNCIAS 57

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

O coquinho azedo [*Butia capitata* (Martius) Beccari] é uma palmeira endêmica do Bioma Cerrado, ocorrendo nas regiões norte de Minas Gerais, nordeste de Goiás e sudoeste da Bahia (LORENZI *et al.*, 2010). A espécie é utilizada como alimentícia, sendo os frutos consumidos *in natura* e a polpa processada usada na produção de sucos, sorvetes, picolés e licores (FARIA *et al.* 2008; MERCADANTE-SIMÕES *et al.*, 2006). *B. capitata* apresenta potencial de uso ornamental, pois se assemelha à espécie *Butia odorata*, utilizada em paisagismo no sul do Brasil (LORENZI *et al.*, 2010) e dos Estados Unidos (BROSCHAT, 1998). No entanto a dormência (LOPES *et al.*, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2012a) e a ausência de informações sobre o armazenamento das sementes limitam a produção de mudas para cultivos comerciais, o estabelecimento de programas de melhoramento genético e a preservação da espécie, que se encontra ameaçada pelo desmatamento e pelo extrativismo predatório.

Embora as palmeiras apresentem importância ecológica e econômica, estudos sobre a biologia reprodutiva estão restritos a algumas espécies (OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Na família Arecaceae, há relatos de restrições à germinação, proporcionadas pelo endocarpo rígido (NEVES *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2011a) ou pela imaturidade do embrião (BASKIN; BASKIN, 1998; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Em *B. capitata*, a dormência das sementes tem sido relatada como fisiológica não profunda (MAGALHÃES *et al.*, 2012a), que é caracterizada pela incapacidade do embrião em romper as estruturas da sementes (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006). Os embriões da espécie não apresentam limitações estruturais à germinação e, quando isolados e cultivados *in vitro* (MAGALHÃES *et al.*, 2012a) ou inseridos em sementes sem o opérculo (FIOR *et al.*, 2011), germinam rapidamente e produzem plântulas normais.

Vários estudos tem sido realizados sobre a dormência em *B. capitata* (FIOR *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2012a; OLIVEIRA *et al.*, 2012), porém ainda há dúvidas se o efeito das estruturas adjacentes ao embrião é mecânico ou relacionado a restrição ao fluxo de gases, ou ainda, sobre a função das reservas embrionárias e sua mobilização e o possível efeito das giberelinas (GAs) no alongamento do embrião e no enfraquecimento dos tecidos da semente.

A conservação *ex situ* de várias palmeiras é difícil, uma vez que as sementes são sensíveis à dessecação, às baixas temperaturas e ao ataque de microrganismos (DICKIE *et al.*, 1992; NEGREIROS *et al.*, 2004). A família Arecaceae está distribuída desde os trópicos aos subtropicos (FINTEL *et al.*, 2004). O comportamento das sementes no armazenamento está associado à diversidade desses ambientes (OROZCO-SEGÓVIA *et al.*, 2003), evidenciando a necessidade de estudos específicos para estabelecer estratégias de conservação.

Para estimar o comportamento das sementes no armazenamento, Hong e Ellis (1996) propuseram um protocolo, em que sementes são classificadas como recalcitrantes, quando não toleram a desidratação a 10% de umidade, com base na massa fresca. Sementes que suportam a dessecação a 5% de teor de água, mas não toleram o armazenamento a -20°C por 90 dias são intermediárias e quando toleram a desidratação e o armazenamento a frio são ortodoxas.

Modificações no protocolo de Hong e Ellis (1996) são necessárias para aplicar em algumas palmeiras, devido a aspectos anatômicos e fisiológicos. Na dispersão, as sementes de *B. capitata* estão aderidas ao endocarpo, inviabilizando a aplicação de teste de germinação. Ribeiro *et al.* (2012) propuseram alterações na aplicação do protocolo de Hong e Ellis (1996) para sementes de algumas palmeiras do Cerrado, utilizando-se a desidratação a 35°C para simular as condições em que as sementes estão expostas no ambiente e o cultivo *in vitro* de embriões para avaliar a viabilidade e o vigor (RIBEIRO *et al.*, 2010).

O cultivo *in vitro* de embriões é uma técnica que tem sido usada para superar dormência em várias espécies de palmeiras (CAMILLO *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2011b; RIBEIRO *et al.*, 2012; WEN; WANG, 2010) e favorece o estudo dos processos germinativos (RAGHAVAN, 2003). Em *B. capitata*, a técnica permitiu obter percentuais superiores a 90% de germinação (NEVES *et al.*, 2010), sugerindo uso potencial para determinar o comportamento das sementes no armazenamento e avaliar o efeito de fatores físicos que afetam a germinação e o desenvolvimento de plântulas.

A remoção total ou parcial do opérculo, apesar de ser uma técnica que demanda prática e aumenta o risco de contaminação das sementes, tem sido usada como tratamento de superação de dormência em várias palmeiras (AL-WASEL; WARRANG, 1998; CARPENTER *et al.*, 1993; HUSSEY, 1958; NEVES *et al.*, 2013; PEREZ *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2011a), inclusive em *B. capitata* (FIOR *et al.*, 2011). O uso das giberelinas pode contribuir como uma técnica alternativa à retirada do opérculo, pois estimula a germinação em sementes de algumas palmeiras (NAGAO *et al.*, 1980; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2011a), porém há relatos de que pode causar estiolamento das plântulas (BROSCHAT; DONSELMAN, 1987).

Neste trabalho avaliou-se o comportamento das sementes no armazenamento e os aspectos fisiológicos da germinação, objetivando-se favorecer o acréscimo de informações sobre a biologia reprodutiva em *B. capitata* e contribuir para a geração de tecnologias que amplie a utilização da espécie de forma sustentável e a preservação em ambientes naturais.

2 OBJETIVOS

Avaliar a tolerância das sementes à desidratação e o potencial de criopreservação de embriões de sementes de coquinho azedo.

Verificar o efeito de estruturas da semente, sacarose e ácido giberélico (GA_3), na germinação em *Butia capitata*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

A cultura de embriões é uma das técnicas da cultura de tecidos, sendo definida como desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos; ou seja, provenientes de um processo de fecundação e que são estimulados a germinar para obter plantas viáveis. Entretanto apenas uma planta é obtida por explante cultivado (HU; FERREIRA, 1998).

Durante a embriogênese o zigoto passa por vários estádios antes de atingir a maturidade embrionária. Os estádios citados na ordem de maturação são: zigoto, proembrião linear, proembrião globular, embrião trapezoidal, embrião codiforme e no estádio torpedo (COCUCCI; MARIATH, 2004; MARCOS FILHO, 2005). Porém, em algumas espécies, os embriões permanecem em estádios imaturos, mesmo após a dispersão da planta-mãe, ou seja, as estruturas do embrião, como os cotilédones e a radícula, não estão totalmente formadas, ou quando estão, o embrião pode ser tão pequeno e ocupar apenas 1% do volume da semente. Portanto, para que a semente germine em condições ideais é necessário que o embrião se desenvolva (BASKIN; BASKIN, 1998; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

George (2008) descreve dois tipos de cultura de embrião: a cultura de embrião imaturo e a de embriões maduros. O primeiro exige meios mais complexos de cultura, enriquecidos com bastantes nutrientes. Além do mais, é difícil obter plântulas viáveis, quando comparado a embriões maduros. Porém o acréscimo de nutrientes no cultivo *in vitro* de embriões maduros de coqueiro aumentou o índice de germinação e formação de plântulas normais (LÉDO *et al.*, 2007).

Há várias aplicações do cultivo de embriões; entre elas, a superação de dormência, criopreservação, estudos da origem da dormência, aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento dos embriões, do teste da

viabilidade das sementes, recuperação de híbridos raros de cruzamentos incompatíveis; e como fonte de explantes com elevado potencial regenerativo (BENMAHIOUL *et al.*, 2009; PANAIA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2011a; SAMUEL *et al.*, 2009; WEN; WANG, 2010).

Para o cultivo de embriões zigóticos, eles são retirados das sementes em câmara de fluxo laminar previamente asséptica, com o auxílio de pinças, de estilete e de microscópio estereoscópico, para embriões pequenos. É ideal que o suspensor seja mantido junto com o embrião, principalmente quando o embrião é excisado no estágio globular. Os embriões imaturos são transferidos de cultura, à medida que se desenvolvem (GEORGE; DEBERGH, 2008; HU; FERREIRA, 1998; LÉDO *et al.*, 2007).

O meio de cultivo para embriões zigóticos é enriquecido com sais minerais, sacarose, vitaminas e hormônios, principalmente em embriões imaturos, pois são desconhecidas as suas exigências nutricionais. A sacarose, além de ser usada como fonte energética, desempenha importante função em manter a osmolaridade do meio de cultura e, na maioria das vezes, embriões imaturos requerem maior osmolaridade no meio (HU; FERREIRA, 1998).

3.2 TOLERÂNCIA DA SEMENTE AO ARMAZENAMENTO

No final do desenvolvimento da semente, o acúmulo de matéria seca está associado à perda expressiva de água e à necessidade de diminuir o metabolismo da semente na dispersão. A redução de água ocorre em diferentes graus, dependendo da resistência da semente à dessecação (MARCOS FILHO, 2005; RAVEN *et al.*, 2004)

Sementes recalcitrantes não toleram a redução extrema de teor de água, nem temperaturas sub-zero quando armazenadas por muito tempo. Por outro lado, sementes que permanecem viáveis quando armazenadas com teor de água de aproximadamente 5% em temperaturas de -18°C são chamadas ortodoxas. Algumas sementes são tolerantes à dessecação, mas

não toleram temperaturas muito baixas, portanto, essas são chamadas intermediárias (HONG; ELLIS, 1996).

Geralmente, plantas de ambientes úmidos produzem sementes recalcitrantes, enquanto que as de ambiente seco são ortodoxas. No Cerrado, muitas plantas, bem como as palmeiras, produzem sementes dormentes, provavelmente pelas condições edafoclimáticas do bioma, que podem está associadas ao comportamento ortodoxo ou intermediário das sementes (TWEDDLE *et al.*, 2003). A dormência e a tolerância à dessecação são características ecológicas fundamentais para o estabelecimento de bancos de sementes de espécies que ocorrem em ambientes sazonalmente secos (OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003; TWEDDLE *et al.*, 2003).

O conhecimento sobre o comportamento das sementes no armazenamento é essencial para estabelecer programas de melhoramento genético, na propagação e na conservação *ex situ* das espécies, por meio de bancos de germoplasma. Na propagação, a perda de viabilidade da semente armazenada pode trazer sérios danos na produção de mudas (ANDRADE; PEREIRA, 1997). A conservação *ex situ* de muitas palmeiras é dificultada, por causa da sensibilidade das sementes à dessecação, ao resfriamento e ao ataque de microrganismos (DICKIE *et al.*, 1992; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003; NEGREIROS *et al.*, 2004).

A família Arecaceae está distribuída na maioria dos biomas, favorecendo a diversidade de comportamento das sementes quanto ao armazenamento (FINTEL *et al.*, 2004; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Apesar de haver trabalhos que classificam as sementes da família Arecaceae quanto ao comportamento no armazenamento, esses ainda são restritos, principalmente em se tratando de palmeiras do Cerrado.

Espécies de ambientes úmidos, como *Euterpe edulis* (MARTINS *et al.*, 2009; PANZA *et al.*, 2009) e *Archontophoenix alexandrae* Wendl. & Drude (MARTINS *et al.*, 2003) foram classificadas como recalcitrantes. Espécies de ambientes secos, como *A. aculeata* (RIBEIRO *et al.*, 2012), *Chamaerops humilis* L. (GONZÉLES-BENITO *et al.*, 2006), *Sabal mexicana* Mart. e

Washingtonia filifera (L. Linden) H. Wendl. (DICKIE *et al.*, 1992) foram classificadas como ortodoxas.

3.2.1 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica de armazenamento para conservar material biológico em temperaturas ultrabaixas, sendo usado o nitrogênio líquido por atingir temperaturas de -196°C (ENGELMANN, 2004). A vantagem de se armazenar materiais em nitrogênio líquido é o custo acessível, que não depende de sistema de refrigeração, sendo que o congelamento de embriões isolados reduz a demanda por espaço (CAMILLO *et al.*, 2009).

Os embriões zigóticos e sementes são um dos exemplos de materiais biológicos que se pode conservar por meio da criopreservação. A aplicação da técnica envolve etapas sucessivas, começando pela escolha do material, aplicação de crioprotetores, congelamento, descongelamento e pós-tratamento, que é aplicado na ordem, dependendo do material biológico a ser conservado. Em espécies ortodoxas o resfriamento rápido de embriões e sementes com teor de água reduzido dispensa o uso de crioprotetores (ENGELMANN, 2004).

Os crioprotetores são substâncias que reduzem o teor de água de embriões e sementes de espécies recalcitrantes, algumas intermediárias e outras estruturas que não podem ser desidratadas. Caso essas estruturas sejam resfriadas sem o pré-tratamento em crioprotetores, a formação de cristais de gelo danifica as membranas celulares, provocando a morte dos tecidos (DICKIE *et al.*, 1992; ENGELMANN, 2004).

3.3 CULTIVO DE EMBRIÕES E DORMÊNCIA

Baskin e Baskin (2004) descrevem sementes com dormência morfológica como aquelas que apresentam o embrião pequeno, porém com suas estruturas bem diferenciadas, isto é, o cotilédone e o eixo hipocótilo-

radícula definidos. Esses embriões morfológicamente dormentes não apresentam dormência fisiológica e, por isso, não requerem um pré-tratamento de superação de dormência. Eles precisam de tempo para crescer e germinar (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

Em palmeiras, a dormência das sementes tem sido relatada como associada à imaturidade do embrião no momento da dispersão (BASKIN; BASKIN 1998; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Porém não são evidentes as características que conferem essa condição e não se sabe o seu papel em manter a dormência ou atrasar a germinação. Em *B. capitata* e *A. aculeata* o eixo embrionário se mostrou bem delineado, apresentado os três tecidos meristemáticos primários diferenciados, apenas a protoderme não se encontrava presente no eixo hipocótilo-radícula no momento da dispersão das sementes (OLIVEIRA, 2012; RIBEIRO, 2010). De acordo com Ribeiro *et al.* (2010), os embriões de *A. aculeata* não apresentam dormência morfológica. Magalhães *et al.* (2012a) admitem que as causas da baixa germinação das sementes de *B. capitata* podem estar correlacionadas aos aspectos fisiológicos do embrião. Também, em *Euterpe edulis*, o embrião se mostrou totalmente diferenciado no momento da dispersão, apresentando eixo hipocótilo radícula com coifa diferenciada (PANZA *et al.*, 2004). Dessa forma, a dormência morfológica em palmeiras deve ser mais bem estudada e fundamentada correlacionando-se os aspectos anatômicos ao processo germinativo (MAGALHÃES *et al.*, 2012a).

O tipo mais comum de dormência encontrada nas sementes de angiosperma é a dormência fisiológica (BASKIN; BASKIN, 2004). É proporcionada por mecanismos inibitórios envolvendo processos metabólicos e o controle do desenvolvimento. Na dormência fisiológica operam diversos mecanismos, que ainda não estão totalmente esclarecidos, localizados não apenas no embrião propriamente dito, mas também nos tecidos e nas estruturas adjacentes, como endocarpo, tegumentos e endospermas (FERREIRA; BORGHETTI, 2004; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; NAMBARA *et al.*, 2010).

A dormência fisiológica também pode estar associada à dormência física que se constitui na impermeabilidade do envoltório da semente à água (BASKIN; BASKIN, 2004; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; NONOGAKI *et al.*, 2010). Em algumas plantas, inclusive no coquinho azedo, a retirada do endocarpo aumenta o índice de germinação, porém a uma taxa pequena, indicando que há outros mecanismos de dormência. Isso ocorre pela combinação entre as dormências física e fisiológica (BASKIN; BASKIN, 2004; LOPES *et al.*, 2011; MOURA, 2008).

A dormência fisiológica distingue-se em três níveis, dependendo de sua duração e dos tratamentos para sua superação: não-profundo, intermediário e profundo. Na dormência profunda, o embrião depois de retirado da semente não germina ou produz plântulas anormais; quando tratado com ácido giberélico não supera a dormência e requer vários meses, sob estratificação a quente ou a frio, para germinar. No outro extremo, a dormência não profunda, que ocorre na maioria das espécies, os embriões sem o tecido extra-embriônico produzem plântulas normais. Além disso, algumas espécies germinam em resposta a aplicação de giberelina, escarificação, armazenamento a seco, estratificação quente e fria (BASKIN; BASKIN, 2004; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

A dormência fisiológica em *B. capitata* parece ser do tipo não profundo, pois alguns trabalhos mostram que no cultivo *in vitro* de embriões isolados sem o uso de fitorregulador ocorre formação de plântulas normais em elevadas taxas (MAGALHÃES *et al.*, 2012a). Esse fato evidencia que o endosperma age também como uma barreira mecânica para a germinação da semente (MARCOS FILHO, 2005). Segundo Finch-Savage e Leubner-Metzger (2006), um declínio nessa resistência mecânica do endosperma, que cobre a ponta da radícula, parece ser um prerequisite para emissão da radícula durante a germinação das sementes. Além disso, a ação do endosperma pode ser também pela presença de substâncias inibidoras da germinação em seu tecido, como constatado no coquinho azedo (MAGALHÃES *et al.*, 2012b).

O uso de estruturas da semente na cultura *in vitro* de embriões pode contribuir para a identificação de qual parte da estrutura está envolvida na dormência, bem como os seus mecanismos. Nesse sentido, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos. No cultivo *in vitro* de embriões de duas espécies nativas de palmeira do México, os embriões isolados e em semente inteira germinaram em altas taxas, porém o cultivo de embriões com tecidos circunvizinhos demonstrou que algum fator físico ou químico presente na testa ou no endosperma limitou a germinação (TZEC-SIMÁ *et al.*, 2006).

3.4 EFEITO DA GIBERELINA NA GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Para se iniciar o processo de germinação, é necessário que haja umidade suficiente para ativar as reações de desenvolvimento do embrião. Durante esse processo, a semente passa por três fases de embebição. Na fase I, ocorre rápida entrada de água, seguida pela fase II de platô, em que os sistemas de produção de energia são ativados e ocorre o reparo de danos causados no armazenamento e na dispersão. Por fim, na fase III, a semente já emitiu a radícula, e a plântula continua o desenvolvimento (BEWLEY, 1997; NONOGAKI *et al.*, 2010).

Os tecidos circunvizinhos de muitas sementes podem ser um dos fatores que limitam mecanicamente a emergência da radícula. Dessa forma, para que ocorra a expansão da radícula, é preciso que ocorra o enfraquecimento ou o afrouxamento dos tecidos de revestimento do embrião. As giberelinas são classes de fitormônios envolvidos na ativação do crescimento embrionário e na redução da expressão e ação de alguns genes e proteínas responsáveis pela manutenção da dormência (NONOGAKI *et al.*, 2010). As GAs são ativadas quando as condições são favoráveis à germinação, estimulando a ação das hidrolases, que degradam o endosperma, principalmente, na região que recobre a extremidade da radícula embrionária e disponibiliza nutrientes para o alongamento do embrião (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006).

As giberelinas regulam principalmente as hidrolases: endo- β -mananase, presente na cápsula do endosperma e endosperma lateral; celulase, presente na cápsula do endosperma, na radícula do embrião e no restante da semente; expansina, presente na cápsula do endosperma, entre outras enzimas (CASTRO *et al.*, 2004; SCHWECHHEIMER, 2008).

Pech y Aké *et al.* (2007) cultivaram *in vitro* embriões de duas variedades de *Cocus nucifera*, em diferentes concentrações de GA₃. Os resultados demonstraram que a presença de GA₃, na cultura de embriões das duas variedades, aumentou a porcentagem de germinação, a conversão e o desenvolvimento uniformizado das plântulas, principalmente, quando o meio usado foi o semissólido.

Geralmente a inibição da síntese de GA inibe a germinação. Esse processo pode ser feito por meio da ação do ácido abscísico (ABA). Esse hormônio não impede o enfraquecimento do endosperma, mesmo inibindo a expressão de algumas hidrolases (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Plantas mutantes e linhagens transgênicas, que acumulam mais ABA, evidenciam maior dormência. Porém o processo de inibição de germinação pelo ABA ainda é desconhecido (NAMBARA *et al.*, 2010; OKAMOTO *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 2 - TOLERÂNCIA DAS SEMENTES À DESSECAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO EM COQUINHO AZEDO

RESUMO

O trabalho avaliou o comportamento das sementes no armazenamento e os efeitos da criopreservação de embriões e sementes de *Butia capitata*. Sementes foram desidratadas em estufa (35°C) e em sílica gel (20°C). Quando atingiram os teores de água de 10, 5 % e após 144 horas de desidratação, o cultivo *in vitro* dos embriões foi realizado como teste de viabilidade e vigor. No meio de cultura foram usados sais MS e substâncias orgânicas. Sementes com teor de água de 5 % e embriões isolados foram armazenados por 90 dias nas temperaturas de -196°C, -18°C com congelamento prévio em nitrogênio líquido, -18°C, -10°C e ambiente (média de 22°C). Os embriões foram descongelados e cultivados *in vitro*. A desidratação em estufa foi mais rápida que em sílica gel. A desidratação até teores de água de 10 e 5% não afetou a viabilidade e o vigor, enquanto que a desidratação até 3,5% de teor de água reduziu os parâmetros. O congelamento das sementes prejudicou a germinação e o vigor, mas embriões congelados isolados não perderam a viabilidade. As sementes têm comportamento de armazenamento intermediário e a criopreservação tem potencial de uso para a conservação de germoplasma de *B. capitata*.

Palavras-chave: *Butia capitata*. Viabilidade. Cultivo *in vitro*. Nitrogênio líquido.

CHAPTER 2 - SEEDS TOLERANCE DESSECCATION AND CRYOPRESERVATION OF COQUINHO AZEDO EMBRYOS

ABSTRACT

This work had as objective to evaluate the behavior of seeds in storage and the effects of cryopreservation of embryos and seed of *Butia capitata*. Seeds were dried in an oven (35°C) and silica gel (20°C). When they reached the water contents of 10, and 5% and after 144 hours of dehydration, in vitro culture of embryos was conducted as a test of viability and vigor. In the culture medium were used MS salts and organic substances. Seeds with water content of 5% and embryos isolated were stored for 90 days at temperatures of -196°C, -18°C with prior freezing in liquid nitrogen, -18°C, -10 °C and room temperature (average 22 °C). The embryos were thawed and cultured in vitro. The dehydration in an oven was more rapid in silica gel. Dehydration to water contents of 10 and 5% did not affect the viability and vigor, while dehydration to 3.5% water content has reduced parameters. The freeze damaged seed germination and vigor, but frozen embryos isolated lost viability. The seeds have intermediate behavior and cryopreservation has potential use for the conservation of germplasm of *B. capitata*.

Keywords: *Butia capitata*. Viability. *In vitro* culture. Liquid nitrogen.

1 INTRODUÇÃO

O coquinho azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc.] é uma palmeira endêmica do Cerrado, ocorrendo nas regiões do norte de Minas Gerais, nordeste de Goiás e sudoeste da Bahia (LORENZI *et al.*, 2010). A espécie apresenta potencial de uso ornamental e alimentício, sendo os frutos consumidos *in natura* e a polpa processada usada na produção de sucos, sorvetes e licores (FARIA *et al.*, 2008; LORENZI *et al.*, 2010). A dormência (LOPES *et al.*, 2011) e a ausência de informação sobre o armazenamento das sementes dificultam a produção de mudas para cultivos comerciais, o estabelecimento de programas de melhoramento genético e a conservação da espécie, ameaçada pelo desmatamento e pelo extrativismo predatório.

A conservação *ex situ* de muitas espécies de palmeiras é dificultada devido à sensibilidade das sementes à dessecação, a baixas temperaturas e ao ataque de microrganismos (DICKIE *et al.*, 1992; NEGREIROS *et al.*, 2004). A distribuição da família Arecaceae ocorre desde os trópicos aos subtropicais (FINTEL *et al.*, 2004). O comportamento da semente no armazenamento está associado à diversidade desses ambientes (OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003), sendo necessários estudos específicos para estabelecer estratégias de conservação. No entanto, apesar do valor ecológico e econômico das palmeiras, o conhecimento sobre a biologia das sementes está restrito a poucas espécies (OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003).

Hong e Ellis (1996) desenvolveram um protocolo para estimar o comportamento das sementes no armazenamento, no qual sementes que não toleram a dessecação a 10% de umidade, com base na massa fresca, são classificadas como recalcitrantes. São intermediárias as sementes que suportam a dessecação a 5% de umidade, mas perdem a viabilidade quando congeladas a -20°C. As sementes ortodoxas toleram tanto a perda de água quanto o armazenamento a frio.

Aspectos anatômicos e fisiológicos de algumas palmeiras do Cerrado dificultam a aplicação do protocolo de Hong e Ellis (1996). Na dispersão, as sementes estão aderidas ao endocarpo e, nesse caso, a extração para teste de germinação é inviável, como observado em *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (RIBEIRO *et al.*, 2012). Além disso, as sementes de *B. capitata* apresentam dormência fisiológica (FINCH-SAVAGE; LEBNER-METZGER, 2006; OLIVEIRA, 2012) e, na ausência de tratamentos pré-germinativos, proporcionam percentuais de germinação abaixo de 5% (LOPES *et al.*, 2011), o que não permite associar diretamente a germinabilidade com a viabilidade.

Ribeiro *et al.* (2012) propuseram adequações no protocolo de Hong e Ellis (1996) para sementes de palmeiras do Cerrado, com a utilização da desidratação a 35°C, para simular condições ambientais à que as sementes são expostas, e do cultivo *in vitro* de embriões para estimar a viabilidade. O cultivo de embriões é utilizado na superação de dormência em várias palmeiras (CAMILLO *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2011a; RIBEIRO *et al.*, 2012; WEN; WANG, 2010) e pode também ser utilizado na estimativa do vigor (RIBEIRO *et al.* 2010). Neves *et al.*, (2010) obtiveram, a partir de embriões isolados de coquinho azedo, percentuais de germinação superiores a 90%, o que sugere a possibilidade da utilização da técnica na determinação do comportamento das sementes da espécie no armazenamento.

A criopreservação de embriões é importante na conservação *ex situ* de germoplasma, devido à eficiência, à praticidade e ao baixo custo (CAMILLO *et al.*, 2009; ENGELMANN, 2004; HONG; ELLIS, 1996; WEN; WANG, 2010). No entanto, a tolerância à criopreservação é muito variável, normalmente associada ao comportamento das sementes no armazenamento (CAMILLO *et al.*, 2009; ENGELMANN, 2004; HONG; ELLIS, 1996; NGOBESE *et al.*, 2010; WEN; WANG, 2010). Protocolos para criopreservação de embriões estão disponíveis para poucas espécies de palmeiras (ENGELMANN *et al.*, 1995; GROUT *et al.*, 1983; NGOBESE *et al.*, 2010) e estudos nesse sentido podem contribuir para o manejo reprodutivo e a conservação de *B. capitata*.

Esta pesquisa teve como objetivos avaliar a tolerância das sementes à dessecação e o potencial de criopreservação de embriões e sementes de *B. capitata*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE FRUTOS E BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES

Frutos de *B. capitata* foram coletados no mês de janeiro de 2011, em população ocorrente em área de cerrado *stricto sensu* no município de Mirabela, Minas Gerais (16°15'46"S; 44°09'52"W). Foram selecionados 2000 frutos maduros, sem sintomas de ataque de insetos ou microrganismos e coloração do epicarpo completamente amarela. Os frutos foram despolidos em liquidificador de baixa rotação e os pirênios (sementes envolvidas pelo endocarpo) mantidos a sombra em galpão aberto. As sementes foram obtidas por pressão no endocarpo, com auxílio de um torno manual de bancada. O peso fresco de quatro repetições de dez sementes foi avaliado e o conteúdo de água, expresso com base no peso fresco, foi determinado baseado na subtração do peso seco após a desidratação em estufa a 105°C por 24 horas (BRASIL, 2009).

2.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E VIGOR

A viabilidade, verificada com base no alongamento do pecíolo cotiledonar, e o vigor, associado à capacidade de emissão de raízes e bainhas (RIBEIRO *et al.*, 2010) do lote, foi verificada por meio do cultivo *in vitro* de embriões. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 6 %, por 15 minutos e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada e, conduzidas para a câmara de fluxo laminar. Os embriões foram retirados das sementes com auxílio de estilete, colocados em solução de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico para evitar oxidação e

desinfestados em solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos, com posterior lavagem três vezes em água destilada e autoclavada (RIBEIRO *et al.*, 2010). A inoculação foi realizada em tubos (12x1cm) com 2 mL do meio de cultura previamente autoclavado a 121°C por 20 minutos, contendo sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em 75% de sua concentração original, suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de tiamina, 1mg L⁻¹ piridoxina, 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 30 g L⁻¹ de sacarose, 3 g L⁻¹ de carvão ativado e 6 g L⁻¹ de agar, com o pH ajustado para 5,7 (RIBEIRO *et al.*, 2011b). Foram usadas cinco repetições de dez embriões, que foram cultivados em germinador, na temperatura constante de 30°C e ausência de luz. Após 30 dias, avaliou-se a germinação com base no aumento igual ou maior que 50% do comprimento médio dos embriões (RIBEIRO *et al.*, 2011b), a emissão de raízes e de bainhas.

2.3 AVALIAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DO EMBRIÃO E ENDOSPERMA DA SEMENTE

Frutos provenientes do pomar experimental, no município de Montes Claros, Minas Gerais, foram despolidos como descrito anteriormente e, após desidratação parcial de pirênios, as sementes foram obtidas por pressão no endocarpo, com auxílio de torno manual e foi determinado o teor de água, pelo método descrito anteriormente, do endosperma e embriões, separadamente, utilizando-se quatro repetições de 20.

Pirênios foram armazenados à sombra em galpão aberto e a redução de umidade das sementes foi mensurada constantemente, até quando esteve próxima de 5 %. Nessa ocasião, quatro repetições de 20 sementes do foram usadas para determinar o teor de água do endosperma e embrião, separadamente, como descrito anteriormente.

2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS SEMENTES QUANTO AO COMPORTAMENTO NO ARMAZENAMENTO

Foi utilizada a metodologia proposta por Hong e Ellis (1996), com modificações (RIBEIRO *et al.*, 2012), para classificar as sementes quanto ao comportamento no armazenamento. Como as sementes encontravam-se aderidas ao endocarpo no momento da abscisão, a extração mecânica danificou as sementes. Assim, os pirênios foram armazenados a sombra em condição ambiente e o teor de água das sementes do lote foi acompanhado diariamente, pelo método da estufa (BRASIL, 2009), até que a desidratação parcial permitisse a extração. As sementes obtidas foram selecionadas, sendo descartadas aquelas deterioradas, rachadas ou danificadas por insetos.

2.5 TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO

Foi avaliada utilizando-se dois métodos: sílica gel e estufa. Quantidades iguais, em peso, de sementes e de sílica gel (previamente desidratada a 130°C por quatro horas) foram colocadas em recipientes de plásticos (3 x 13 cm), que foram mantidos em germinador a 20°C. A sílica foi substituída quando ocorreu alteração na cor. Na estufa com circulação de ar forçado, as sementes foram desidratadas em placas de Petri à temperatura de 35°C. Para os dois métodos de desidratação, foram usadas quatro repetições de 10 sementes, que tiveram mensurada a massa antes da desidratação e nos períodos de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, e foram imediatamente devolvidas aos locais de desidratação.

Para determinar o tempo de retirada das sementes para realizar o teste de viabilidade, utilizou-se a fórmula (HONG; ELLIS, 1996):

$$MR = \frac{(100-TI)}{(100-TD)} \times MI$$

em que MR corresponde ao peso da semente quando deve ser retirada. TI corresponde ao teor de água inicial do lote, com base no peso fresco, TD corresponde ao teor de água desejado e MI representa o peso original da amostra.

O experimento de desidratação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (métodos de desidratação). Os dados foram submetidos à análise de variância para comparar o efeito dos métodos de dessecação dentro de cada tempo.

Amostras adicionais de sementes (cinco repetições de dez sementes) foram desidratadas sob as mesmas condições e usadas para avaliar a viabilidade, por meio do cultivo *in vitro* de embriões, sendo que as condições de cultivo e a avaliação dos embriões foram realizadas conforme descrito anteriormente.

O cultivo *in vitro* foi realizado no delineamento em bloco casualizados, com seis tratamentos: embriões excisados de sementes desidratadas em sílica e em estufa com teores de água de 10, 5% e após estabilização da redução de umidade. Os dados foram tomados por contagem dos embriões ou plântulas apresentando o evento (germinação, emissão de raízes e emissão de bainhas) e convertidos em percentual, seguidos de transformação em arco seno $(x/100)^{0.5}$. Foi utilizada análise de variância e o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

2.6 TOLERÂNCIA DAS SEMENTES E DOS EMBRIÕES ISOLADOS ÀS BAIXAS TEMPERATURAS

Os pirênios foram armazenados na condição ambiente e foram monitorados os teores de água das sementes, diariamente. Quando o teor de água atingiu 5,18%, as sementes foram extraídas, como descrito anteriormente, e desinfestadas em cloro 6% por 15 minutos, seguidas de tríplice lavagem em água destilada. As sementes foram conduzidas à câmara de fluxo laminar, onde, em metade dos tratamentos, sementes intactas foram embaladas em pacotes de papel alumínio, e, das outras sementes, foram excisados os embriões e colocados em tubos Ependoff. As sementes e os embriões foram armazenados nas temperaturas de -196°C; -18°C, com congelamento prévio em nitrogênio líquido por 5 minutos; -18°C; -10°C e temperatura ambiente (média de 22°C).

Após 90 dias, os tratamentos foram submetidos ao descongelamento na temperatura ambiente, por 24 horas. Os embriões foram excisados das sementes e foram cultivados *in vitro*, como descrito anteriormente. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, em fatorial 2 (semente ou embrião) x 5 (temperatura de armazenamento) + 1 (sementes ou embriões que não foram armazenados), com cinco repetições de dez embriões. O cultivo de embriões, as características avaliadas e as análises estatísticas foram realizados, conforme descrito anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Logo após a abscisão, as sementes de coquinho azedo permaneciam aderidas ao endocarpo rígido e possuíam teor de água de 27%. Assim, não foi possível avaliar a viabilidade nessa ocasião, pois o processo de extração danificou a maioria dos embriões. A umidade do lote nos três dias após a abscisão foi de 24,3, 23,3 e 21,3%, respectivamente. No quarto dia as

sementes se soltaram do endocarpo, sendo a viabilidade determinada pelo cultivo *in vitro* de embriões, igual a 98%.

O teor de água das sementes na abscisão esteve próximo àqueles encontrados para várias populações de coquinho (dados não publicados), sugerindo o comportamento ortodoxo ou intermediário, uma vez que, geralmente, sementes recalcitrantes são dispersas com teores de água superiores a 30% (HONG; ELLIS, 1996). Além disso, a significativa presença de reservas proteicas e lipídicas no embrião de *B. capitata* (OLIVEIRA, 2012) é indicador de tolerância à desidratação em palmeiras, como verificado em embriões de sementes ortodoxas de *A. aculeata* (MOURA *et al.*, 2010), o que contrasta com pequenas quantidades de reservas em embriões de sementes de *Euterpe edulis* (PANZA *et al.*, 2009), reconhecidas como recalcitrantes.

Adaptações propostas por Ribeiro *et al.* (2012) para macaúba, no protocolo de Hong e Ellis (1996), envolvendo o cultivo *in vitro* de embriões, são necessárias para a estimativa do comportamento das sementes de *B. capitata* no armazenamento, devido à pronunciada dormência (FIOR *et al.*, 2011, LOPES *et al.*, 2011). Além disso, a extração das sementes é um processo trabalhoso, pois o endocarpo rígido danifica muitas sementes quando é pressionado, limitando o uso de amostras de 400 sementes, como prescreve o protocolo de Hong e Ellis (1996). O cultivo *in vitro* de embriões permite a superação da dormência na espécie (NEVES *et al.*, 2010, RIBEIRO *et al.*, 2011a) e tem sido utilizado com sucesso como teste de viabilidade para várias palmeiras que apresentaram dificuldade de germinação (DICKIE *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2010; WEN; WANG, 2010). A técnica também viabiliza a redução do tamanho das amostras de sementes em várias espécies da família (DICKIE *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Sementes submetidas à desidratação em sílica gel atingiram teores de água de 10 e 5% após 24 e 72 horas (GRAF. 1). Na desidratação em estufa, as sementes atingiram os mesmos teores de água após 8 e 30 horas. Após 144 horas de dessecação, as sementes atingiram o teor de água de 3,4% na sílica gel e 3,5%, na estufa. O teor de água das sementes desidratadas em

estufa foi significativamente menor do que das submetidas à sílica gel até as 24 horas de desidratação. A redução do teor de água nas sementes tendeu-se à estabilização, após 72 horas de desidratação, na estufa e 96 horas, em sílica gel.

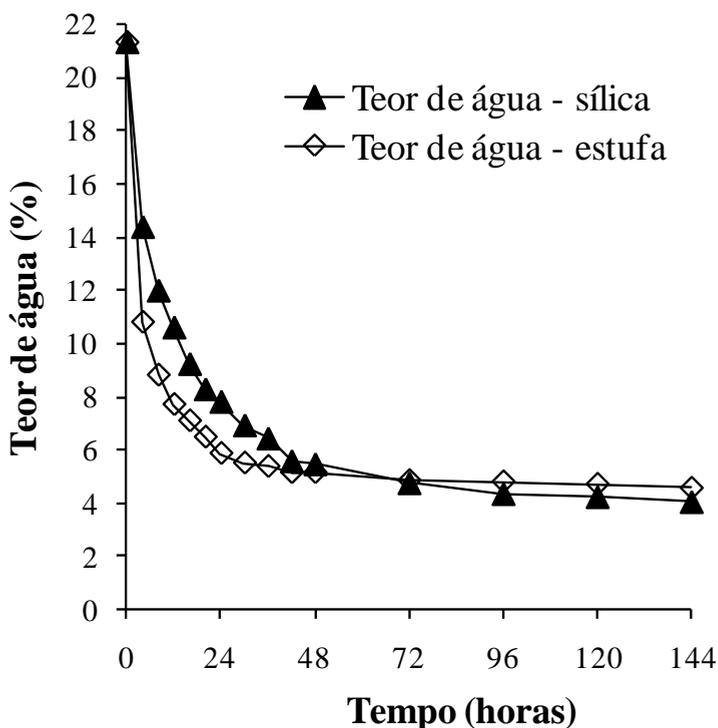


GRÁFICO 1 – Teor de água em função do tempo de desidratação das sementes de *Butia capitata* submetidas aos métodos de desidratação em sílica gel (20°C) e em estufa (35°C)

Fonte: Da autora.

As sementes de coquinho azedo apresentam padrão de desidratação rápida, segundo critérios de Pammenter e Berjak (2000), uma vez que, após 8 horas de desidratação em estufa, o teor de água das sementes caiu de 21% para 10%. Esses autores consideram que sementes que sofrem desidratação rápida são normalmente tolerantes à dessecação. Para sementes recalcitrantes de *Archontophoenix alexandrae*, a desidratação em

estufa ($32\pm 2^{\circ}\text{C}$) demandou 156 horas para que o teor de água de 15,1% fosse alcançado, condição na qual ocorreu perda da viabilidade (MARTINS *et al.*, 2003).

A viabilidade dos embriões não foi afetada pela desidratação até teores de água de 5% ($P=0,0878$), independente do método de secagem das sementes utilizado (GRAF. 2). Nessas condições, o vigor também não foi afetado. Embriões excisados de sementes desidratadas na estufa com teor de água de 3,5% tiveram a viabilidade e o vigor reduzidos, Mas naquelas desidratadas em sílica, não se observou-se essa redução. No entanto, esses resultados podem estar relacionados aos danos causados pela embebição rápida de embriões extremamente secos, quando colocados para germinar (HONG; ELLIS, 1996).

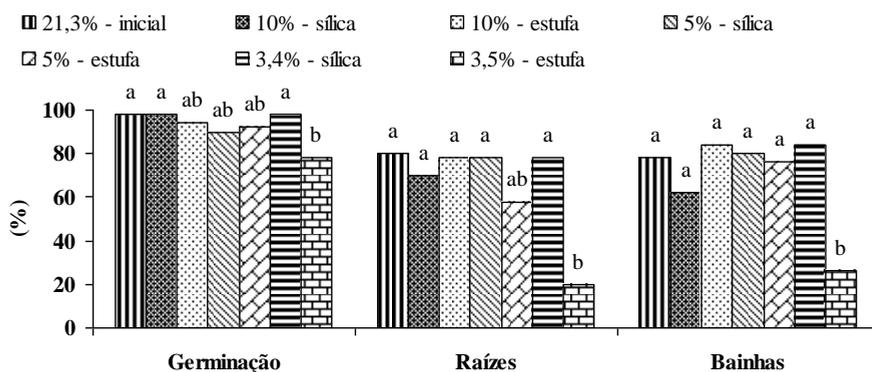


GRÁFICO 2 – Percentual de germinação de embriões cultivados *in vitro* e de emissão de raízes e bainhas em plântulas provenientes de sementes de *Butia capitata* com teor de água inicial (21,3%) e após a desidratação (10, 5 e 3,4%) em sílica gel (20°C) e (10, 5, e 3,5%) em estufa (35°C)

Fonte: Da autora.

A desidratação em sílica gel a 20°C é recomendada para evitar danos nos tecidos, pois diminui a velocidade de desidratação (HONG; ELLIS, 1996). No entanto, nas condições naturais de ocorrência de coquinho azedo, a exposição a altas temperaturas durante a maior parte do ano e umidades do ar abaixo de 20% nos meses mais secos sugerem a tolerância aos processos

severos de dessecação. Os resultados obtidos confirmam essa proposição, uma vez que mesmo a desidratação em estufa a 35°C até teor de água de 5% não afetou a viabilidade e o vigor dos embriões.

O armazenamento de sementes em temperaturas de -196°C e 22°C proporcionou maior viabilidade que o armazenamento de embriões isolados (GRAF. 3). O resfriamento dos embriões nas demais temperaturas preservou a viabilidade, enquanto que o congelamento das sementes nas mesmas condições de temperaturas não proporcionou germinação dos embriões cultivados *in vitro*. Foi evidenciada redução de vigor, na emissão de raízes, quando os embriões isolados e sementes foram congelados, e apenas o resfriamento -18°C (CL) preservou os embriões isolados em relação às sementes (GRAF. 4). A emissão de bainhas foi semelhante apenas quando comparados embriões e sementes armazenadas a 196°C e ambiente (média 22°C), sendo que, nos demais tratamentos, o congelamento de embriões isolados preservou mais que o de sementes (GRAF. 5).

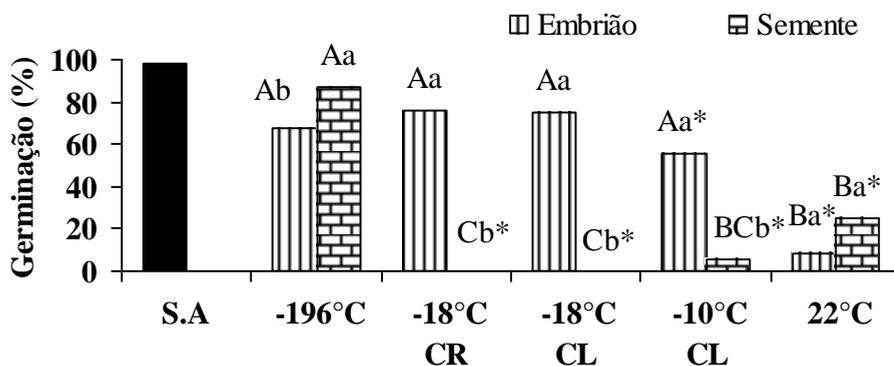


GRÁFICO 3 – Percentual de germinação de embriões de *Butia capitata* excisados de sementes sem armazenamento (S.A) ou armazenados, os embriões isolados e as sementes, em nitrogênio líquido (-196°C), congelamento rápido (-18°C CR), congelamento lento (-18°C CL), congelamento lento (-10°C) e ambiente (média 22°C)

Notas: Letras maiúsculas comparam médias entre as temperaturas de armazenamento. Letras minúsculas comparam médias entre embrião e semente. As mesmas letras não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

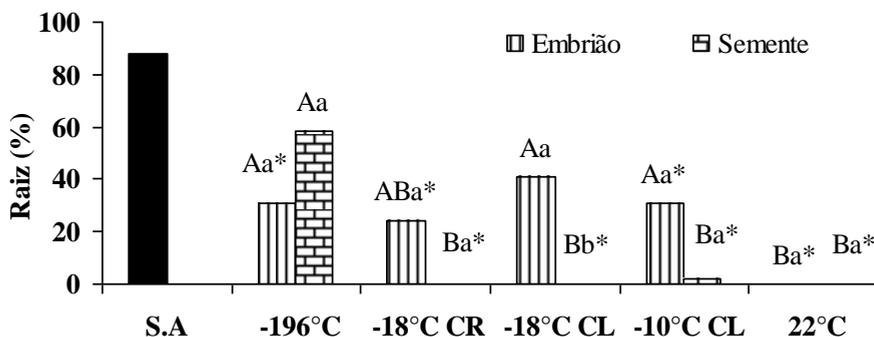


GRÁFICO 4 – Percentual de emissão de raízes em plântulas de *Butia capitata*, provenientes de embriões isolados ou sementes sem armazenamento (S.A) ou armazenados em: nitrogênio líquido (-196°C), congelamento rápido (-18°C CR), congelamento lento (-18°C CL), congelamento lento (-10°C) e ambiente (média de 22°C)

Notas: Letras maiúsculas comparam médias entre as temperaturas de armazenamento. Letras minúsculas comparam médias entre embrião e semente. Mesmas letras não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

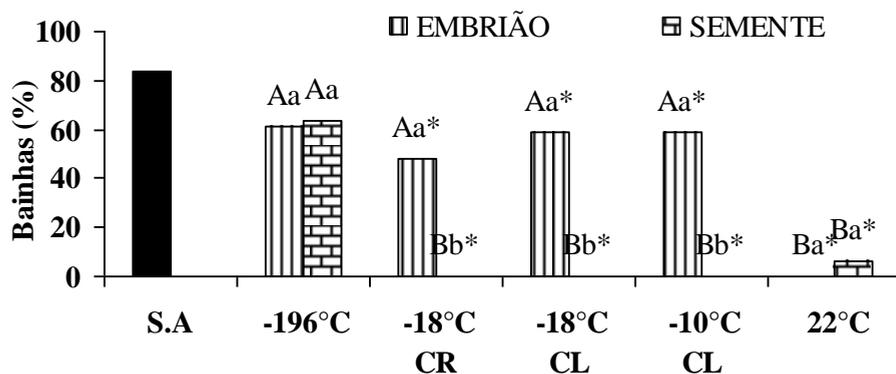


GRÁFICO 5 – Percentual de emissão de bainhas em plântulas de *Butia capitata*, provenientes de embriões isolados ou sementes sem armazenamento (S.A) ou armazenados em: nitrogênio líquido (-196°C), congelamento rápido (-18°C CR), congelamento lento (-18°C CL), congelamento lento (-10°C) e ambiente (média de 22°C)

Notas: Letras maiúsculas comparam médias entre as temperaturas de armazenamento. Letras minúsculas comparam médias entre embrião e semente. Mesmas letras não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora.

Para o armazenamento de embriões, os tratamentos de congelamento não proporcionaram diferenças significativas em relação à viabilidade inicial, exceto para o congelamento lento -10°C (GRAF. 3). A germinação não foi afetada, quando considerados os tipos de congelamento, porém embriões armazenados na condição ambiente tiveram viabilidade comprometida. Foi verificada redução no vigor das plântulas ($P < 0,0001$), principalmente nos embriões armazenados em condição ambiente, que não desenvolveram raízes e bainhas.

Para o congelamento das sementes, apenas a temperatura de -196°C preservou a viabilidade dos embriões e a emissão de bainhas nas plântulas, em relação à viabilidade e ao vigor inicial (GRAF. 3 e 5). Sementes armazenadas na condição ambiente germinaram em baixos percentuais e as plântulas produziram somente bainhas.

As sementes de *B. capitata* toleram a desidratação a 5% de teor de água e não suportam o armazenamento a -18°C . Apesar dos embriões tolerarem as baixas temperaturas, as sementes são classificadas como, provavelmente, intermediárias, conforme o protocolo de Hong e Ellis (1996). Comportamento semelhante foi verificado em sementes e embriões de *Elaeis guineensis*, porém, inicialmente, as sementes foram classificadas como ortodoxas (GROUT *et al.*, 1983), pela tolerância dos embriões às baixas temperaturas e, posteriormente, a classificação foi alterada para intermediária (ELLIS *et al.*, 1991), devido à perda de viabilidade das sementes congeladas a -20°C por 12 meses.

Em *B. capitata*, o teor de água encontrado no endosperma é menor que no embrião, sendo 16,5% e 30,8%, respectivamente, após desidratação parcial das sementes, e 6% e 12%, respectivamente, após desidratação por 30 dias. O teor de água na relação embrião/endosperma é menor na espécie em estudo em relação a outras espécies de comportamento intermediário, como *E. guineensis* (GROUT *et al.*, 1983) e *Phoenix reclinata* (FINTEL *et al.*, 2004), onde os embriões apresentam teor de água muito superior ao encontrado no endosperma. A diferença entre essas espécies pode estar

relacionada ao ambiente onde ocorrem, sendo *E. guineensis* de ambiente tropical úmido (ELLIS *et al.*, 1991), *P. reclinata* (FINTEL *et al.*, 2004) em savanas, na zona ripária e *B. capitata* de tropical semiárido, margeando córregos e rios, no Cerrado (LORENZI *et al.*, 2010; MARTINS, 2003).

A manutenção da viabilidade de 78% das sementes submetidas à desidratação rápida a 35°C, até teor de água de 3,5% (GRAF.2) e a tolerância ao congelamento em nitrogênio líquido (GRAF. 4) sugerem que as sementes de *B. capitata* são mais tolerantes ao armazenamento que as sementes de *E. guineensis*. Além disso, a viabilidade de sementes retiradas de pirênios armazenados em ambiente sombreado por 150 dias alcançou 74% (dados não publicados), sendo que o endocarpo possivelmente favorece a preservação da viabilidade. Por outro lado, o armazenamento dos pirênios de *B. capitata* à sombra por 270 dias reduziu a viabilidade de embriões cultivados *in vitro* de 90 para 30% (dados não publicados).

Há uma ampla diversidade de comportamento no armazenamento de sementes na família Arecaceae, e essa variação também ocorre no âmbito de gênero (DICKIE *et al.*, 1991; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Espécies de ambientes úmidos, como *E. edulis* (MARTINS *et al.*, 2009; PANZA *et al.*, 2009) e *Archontophoenix alexandrae* Wendl. & Drude (MARTINS *et al.*, 2003), têm sido classificadas como recalcitrantes. Espécies de ambientes secos, como *A. aculeata* (RIBEIRO *et al.*, 2012), *Chamaerops humilis* L. (GONZÁLEZ-BENITO *et al.*, 2006), *Sabal mexicana* Mart. e *Washingtonia filifera* (L. Linden) H. Wendl. (DICKIE *et al.*, 1992), têm sido classificadas como provavelmente ortodoxas.

A tolerância à dessecação e a dormência são características ecológicas fundamentais para o estabelecimento de bancos de sementes de espécies que ocorrem em ambientes sazonais secos (OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003; TWEDDLE *et al.*, 2003), como o Cerrado. Na dispersão, os frutos de *B. capitata* apresentam mesocarpo com teor de água de 83% (NEVES *et al.* 2010), que pode retardar a desidratação das sementes no ambiente, sendo um fator essencial na adaptação da espécie ao ambiente em que

ocorre (LORENZI *et al.*, 2010; TWEDDLE *et al.*, 2003). As sementes intermediárias de ambiente tropicais devem ser armazenadas em temperaturas de aproximadamente 10°C para a conservação *ex situ*, no estabelecimento de bancos de germoplasma e propagação para cultivos comerciais (HONG; ELLIS, 1996).

A criopreservação de sementes de *B. capitata* pode ser uma das várias alternativas de conservação sem pré-tratamento, porém o uso de crioprotetores em embriões isolados pode preservar a viabilidade e o vigor. Em espécies recalcitrantes e em algumas intermediárias, o uso de crioprotetores diminui a quantidade de água, sem danificar as membranas celulares (OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003).

O cultivo *in vitro* é uma técnica alternativa para regenerar a viabilidade dos embriões congelados em temperaturas sub-zero (WEN; WANG, 2010). Para as palmeiras, os protocolos de criopreservação têm sido desenvolvidos principalmente para espécies recalcitrantes, como *Cocus nucifera* (ENGELMANN *et al.*, 1995) e intermediárias, como *Elaeis guineensis* (CAMILLO *et al.*, 2009; ENGELMANN *et al.*, 1995; GROUT *et al.*, 1983). Em *Sabal jamaicensis*, *S. minor*, *S. umbraculifera* and *S. yapa*, não foram verificados os comportamentos das sementes armazenadas, mas a criopreservação foi bem sucedida quando os embriões desidratados parcialmente foram armazenados em nitrogênio líquido (WEN; WANG, 2010).

A manutenção de viabilidade das sementes de *B. capitata* congeladas em nitrogênio líquido, assim como em sementes de outras espécies de comportamento intermediário: *E. guineensis* ou ortodoxo: *A. aculeata* (RIBEIRO *et al.*, 2012), *S. mexicana*, *W. filifera* (DICKIE *et al.*, 1992), *C. humilis* (GONZÁLEZ-BENITO, 2006), mostrou que a criopreservação apresenta potencial para estabelecer protocolo de conservação de germoplasma. Estudos são necessários para avaliar o efeito de crioprotetores na manutenção de viabilidade e vigor dos embriões congelados isolados.

4 CONCLUSÃO

As sementes de *B. capitata* são tolerantes à dessecação a 5% e ao congelamento a -196°C , mas não suportam o resfriamento a -18°C , com congelamento rápido ou lento, ou a -10°C .

Os embriões isolados congelados a -18°C , com congelamento rápido ou lento, e -10°C mantiveram-se viáveis, porém com o vigor reduzido.

Sementes e embriões isolados armazenados na condição ambiente reduzem a viabilidade e o vigor.

A criopreservação de sementes pode ser usada para a conservação de recursos genéticos ou para o estabelecimento de bancos de germoplasmas.

CAPÍTULO 3 - ESTRUTURAS DA SEMENTE, SACAROSE E GA₃ INFLUENCIAM A GERMINAÇÃO DE *Butia capitata* (ARECACEAE)

RESUMO

Avaliaram-se o efeito de estruturas da semente, sacarose e GA₃ sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Butia capitata*. Em condição *in vitro*, utilizando-se sais MS, suplementados com substâncias orgânicas, testaram-se o cultivo de sementes inteiras, sementes sem opérculo, sementes seccionadas transversalmente, sementes seccionadas longitudinalmente e embriões isolados. Os tratamentos foram associados à presença ou ausência de sacarose. Em condição *ex vitro*, testou-se o efeito de doses (0, 50, 100, 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹) de GA₃ sobre a germinação de sementes com ou sem opérculo. Embriões isolados retirados de sementes submetidas às mesmas doses de GA₃ foram cultivados *in vitro*. A sacarose favorece a germinação e o desenvolvimento de plântulas, embora os embriões possuam reservas suficientes para germinar quando isolados. O pronunciado efeito do opérculo sobre a germinação é mecânico e não relacionado à restrição a difusão de gases. O GA₃ não afeta a germinação de sementes sem opérculo e tem efeito discreto sobre a germinação de sementes com opérculo e de embriões isolados. A incapacidade do embrião em superar a restrição mecânica dos tecidos adjacentes e a efetividade do GA₃ confirmam a classificação da dormência da espécie como fisiológica não profunda.

Palavras-chave: Opérculo. Cultivo *in vitro*. Ácido giberélico. Fonte exógena de energia.

CHAPTER 3 - SEED STRUCTURE, SUCROSE AND GA₃ INFLUENCE THE GERMINATION OF BUTIA CAPITATA (ARECACEAE)

ABSTRACT

We evaluated the effect of structures of seeds, sucrose and GA₃ on the germination and seedling development of *Butia capitata*. In vitro condition, using MS salts, supplemented with organic substances, we tested the cultivation of whole seeds, seeds without operculum, seeds sectioned transversely, longitudinally sectioned seeds and embryos isolated. The treatments were associated with the presence or absence of sucrose. In ex vitro conditions, we tested the effect of GA₃ doses (0, 50, 100, 500, 1000 and 2000 mg L⁻¹) on the germination of seeds with or without operculum. Isolated embryos taken from seeds subjected to the same doses of GA₃ were cultured in vitro. Sucrose support germination and seedling development, although the embryos have sufficient reserves to germinate when isolated. The pronounced effect of operculum on germination is mechanical and not related to the restriction of diffusion of gases. GA₃ did not affect the germination of seeds without operculum and has slight effect on the germination of seeds and embryos isolated. The inability of the embryo to overcome the mechanical restriction of adjacent tissues and effectiveness of GA₃ confirmed the classification of the species as non-deep physiological dormancy.

Keywords: Operculum. *In vitro* embryos. Gibberellic acid. Exogenous energy source.

1 INTRODUÇÃO

Butia capitata (Mart.) Becc. (coquinho azedo) é uma palmeira endêmica do bioma Cerrado, na região central do Brasil (LORENZI *et al.*, 2010). A espécie apresenta importância ecológica, por fornecer alimentos à fauna, e econômica, uma vez que os frutos são utilizados para o consumo *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (FARIA *et al.*, 2008; MERCADANTE-SIMÕES *et al.*, 2006). *B. capitata* também possui potencial de uso ornamental, por apresentar características estreitamente relacionadas a *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick e Pirani, que é utilizada em paisagismo no sul do Brasil (LORENZI *et al.*, 2010) e dos Estados Unidos (BROSCHAT, 1998). No entanto a produção de mudas para plantio comercial e a conservação de populações naturais são limitadas, devido à dormência das sementes (MAGALHÃES *et al.*, 2012a), que ocasiona germinação lenta, desuniforme e em baixos percentuais (LOPES *et al.*, 2011).

A biologia das sementes de palmeiras é ainda pouco conhecida (OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Há relatos de que as limitações à germinação na família ocorrem devido a restrições proporcionadas pelo endocarpo (NEVES *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2011a) e ou pela imaturidade do embrião (BASKIN; BASKIN, 1998; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003). Magalhães *et al.* (2012a) classificaram a dormência das sementes de *B. capitata* como fisiologia não profunda, que é caracterizada pela incapacidade do embrião em romper as estruturas da semente (BASKIN; BASKIN, 2004; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006;). Esses autores se basearam na observação de que os embriões não apresentam limitações estruturais à germinação e, quando isolados e cultivados *in vitro* e ou livres da restrição do opérculo, germinam rapidamente, produzindo plântulas normais (FIOR *et al.*, 2011).

Apesar de alguns trabalhos realizados sobre a dormência em *B. capitata* (FIOR *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2012a; OLIVEIRA, 2012) ainda há dúvidas sobre se o efeito das estruturas

adjacentes ao embrião é mecânico ou relacionado à restrição ao fluxo de gases, ou ainda, sobre o papel das reservas embrionárias e sua mobilização e do possível efeito das giberelinas no alongamento do embrião e no enfraquecimento dos tecidos da semente.

O uso de giberelinas pode contribuir para o desenvolvimento de tecnologia para a propagação alternativa à retirada do opérculo, proposta por Fior *et al.* (2011), que é um procedimento oneroso e que aumenta o risco de contaminação das sementes. O fitorregulador tem sido usado para estimular a germinação de sementes de palmeiras (NAGAO *et al.*, 1980; OROZCO-SEGOVIA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2011a), apesar de que há relatos de estiolamento das plântulas (BROSCHAT; DONSELMAN, 1987).

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos favorece o estudo do processo germinativo (RAGHAVAN, 2003) e possibilita superação da dormência em várias espécies de palmeiras (LÉDO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011a, RIBEIRO *et al.*, 2012; TZEC-SIMÁ *et al.*, 2006). Em *B. capitata*, a técnica permitiu a obtenção percentuais elevados de germinação (NEVES *et al.*, 2010), sugerindo potencial de uso para avaliar os efeitos de fatores físicos que afetam a germinação e o desenvolvimento das plântulas e contribuir para o ampliação de estratégias para a propagação da espécie (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Este estudo foi realizado objetivando responder as seguintes perguntas sobre *B. capitata*: i) Há restrição mecânica à germinação? ii) Existe limitação à germinação relacionada à dificuldade de mobilização das reservas embrionárias ? iii) Há efeito da giberelina na germinação da semente e de embriões isolados e no desenvolvimento de plântulas?

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA E AVALIAÇÕES PRELIMINARES

Foram realizados três experimentos, sendo que, para o primeiro, frutos de *B. capitata* foram obtidos de uma população natural no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, em novembro de 2011, sendo processados em despoldadeira industrial. Os pirênios permaneceram armazenados em galpão aberto por cinco meses, período em que os experimentos foram estabelecidos.

Para o segundo e terceiro experimentos, os frutos foram coletados nos meses de junho e setembro de 2012, em pomar experimental no município de Montes Claros (16°40'52"S, 43°50'22"W) e foram despoldados em liquidificador de baixa rotação, sendo que os pirênios permaneceram armazenados por 15 a 30 dias, nas mesmas condições descritas para o primeiro experimento.

Sementes foram extraídas com auxílio de um torno manual, mensurado o teor de água com base na massa fresca, utilizando-se quatro repetições de 25 sementes, que foram desidratadas na estufa a 105°C, por 24 horas (BRASIL, 2009). A viabilidade dos lotes utilizados nos três experimentos foi avaliada por meio do cultivo *in vitro* de embriões, onde as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 6% por 15 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada e conduzidas para a câmara de fluxo laminar. Os embriões foram excisados das sementes, com auxílio de estilete, imersos em solução de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e desinfestados em solução de cloro 0,5% por 10 minutos e lavados três vezes em água destilada e autoclavada. Os embriões foram inoculados em tubos de ensaio (12x1 cm), com 2 mL de meio de cultivo, contendo: sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em 75% da sua concentração original; 0,5 mg L⁻¹ de tiamina; 1 mg L⁻¹ de piridoxina; 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol; 0,5 g L⁻¹ de caseína hidrolizada; 3 g L⁻¹ de carvão ativado;

6 g L⁻¹ de ágar; 30 g L⁻¹ de sacarose; com pH ajustado para 5,7 e autoclavado a 121°C, por 20 minutos. Após 30 dias de cultivo, a 30°C, na ausência de luz, os embriões ou plântulas foram retirados dos tubos e avaliados visualmente, quanto à germinação e à emissão de raízes e de bainhas. A germinação foi reconhecida com base no aumento igual ou superior a 50% do comprimento inicial dos embriões (RIBEIRO *et al.*, 2011a).

2.2 EFEITO DA SACAROSE E DE ESTRUTURAS DA SEMENTE NA GERMINAÇÃO IN VITRO

As sementes foram desinfestadas como descrito anteriormente, hidratadas por imersão em água destilada por 48 horas (OLIVEIRA, 2012) e conduzidas à câmara de fluxo laminar, onde foram obtidos, com auxílio de um estilete, os tratamentos: sementes intactas, sementes sem opérculo, sementes seccionadas transversalmente, sementes seccionadas longitudinalmente e embriões isolados (Fig. 1A-E). A retirada do opérculo foi realizada por meio de cortes superficiais na inserção entre o opérculo e o tegumento, forçando o rompimento das estruturas, sem danificar o embrião (FIOR *et al.*, 2011). As sementes foram seccionadas, preservando os embriões, que ficaram expostos parcialmente na secção longitudinal da semente. A secção transversal das sementes atingiu a cavidade seminal, permitindo que a região distal (haustório) dos embriões permanecesse em contato com a atmosfera. Os embriões isolados ou inseridos nas estruturas das sementes foram desinfestados em cloro 0,5% por 10 minutos, lavados três vezes em água destilada e autoclavada e inoculados em frascos, com 10 mL de meio de cultivo, descrito anteriormente. Em metade dos frascos, adicionou-se o meio de cultura, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose (RIBEIRO *et al.*, 2011a).

O experimento foi estabelecido em delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 5 (estruturas da semente) x 2 (presença ou ausência de sacarose), com cinco repetições de dez explantes. O cultivo foi realizado em germinador a 30°C, na ausência de luz. Após 30 dias de cultivo, os embriões ou plântulas foram retirados dos tubos e avaliados, visualmente, quanto à germinação e à emissão de raízes e de bainhas. A germinação foi reconhecida com base no aumento igual ou superior a 50% do comprimento inicial dos embriões. Foram mensurados o comprimento e o diâmetro da bainha, da raiz principal, tubo cotiledonar, do pecíolo cotiledonar e do haustório, com auxílio de um paquímetro digital. As bainhas, raízes, tubo, pecíolo cotiledonar e haustório foram desidratados em estufa de circulação de ar 105°C, por 24 horas (BRASIL, 2009), e mensuradas as massas secas em balança analítica.

Os dados para germinação, emissão de raízes e de bainhas foram tomados por contagem dos embriões ou plântulas, apresentando os eventos e convertidos em percentual, seguida da transformação em arco seno $(X/100)^{0,5}$. Foi utilizada a análise de variância e o teste de Tukey (0,05) para a comparação das médias dos tratamentos.

2.3 EFEITO DO GA₃ NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Sementes foram desinfestadas e pré-embebidas em água destilada por 48 horas, como descrito anteriormente, e imersas em soluções de GA₃ (Sigma-Aldrich), em vidros escuros (40 mL), nas concentrações de 0, 50, 100, 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹, por 24 horas. As sementes foram lavadas em água destilada e desinfestadas, conforme descrito anteriormente. Em metade dos tratamentos, foram removidos os opérculos das sementes, com o auxílio de estilete, como relatado para o experimento anterior.

As sementes foram dispostas em caixas de polietileno, tipo gerbox, contendo 80 mL de substrato vermiculita estéril, pré-umedecida com água destilada e autoclavada a 80% da capacidade de retenção de água e

cultivadas a 25°C em germinador, na presença de luz (adaptado de FIOR *et al.*, 2011). Após 15 dias de cultivo, as sementes com opérculo foram retiradas do substrato e o tratamento com GA₃ foi repetido. Diariamente, foi contabilizada a germinação, utilizando-se como critério a protrusão do pecíolo cotiledonar, com aumento igual ou superior a 2 mm de comprimento. Após 30 dias, os opérculos das sementes intactas foram removidos e as sementes foram cultivadas por mais 15 dias, conforme descrito anteriormente, para avaliar a viabilidade.

O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados, em fatorial 6 (doses de GA₃) x 2 (sementes intactas ou com os opérculos retirados), com quatro repetições de 25 sementes, por tratamento. Foram avaliados: porcentagens e índices de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962), porcentagens de germinação final, emissão de raízes e de bainhas, e o comprimento e o diâmetro da parte aérea e raiz principal. A análise estatística foi realizada como descrita no primeiro experimento.

2.4 EFEITO DO GA₃ NA GERMINAÇÃO DOS EMBRIÕES ISOLADOS

Sementes foram embebidas em água e em soluções de GA₃, nas concentrações 0, 50, 100, 500, 1000 e 2000 mg L⁻¹, como descrito anteriormente, e conduzidas para a câmara de fluxo laminar estéril, onde os embriões foram excisados e cultivados *in vitro* em tubos de ensaio com 2 ml do meio de composição igual ao usado no primeiro experimento, com acréscimo de 30 g L⁻¹ de sacarose.

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados, em seis tratamentos (doses de GA₃), com cinco repetições de dez embriões, por tratamento. As condições de cultivo, os critérios de avaliação e as análises estatísticas foram realizados como descritas no primeiro experimento.

3 RESULTADOS

A semente de *B. capitata* apresenta formato alongado, contendo um embrião de aspecto cônico e com a extremidade distal mais afinada, localizada internamente em relação à semente, o haustório. A região proximal do embrião, o pecíolo cotiledonar, está posicionada periféricamente na região micropilar (FIG. 1A, D e E). A cavidade seminal se estende, no centro, ao longo do comprimento da semente (FIG. 1D). As sementes utilizadas apresentaram teor de água e viabilidade inicial de, respectivamente, 4,9 e 86%, no primeiro experimento, 5,1 e 80%, no segundo e 7 e 98,3%, no terceiro.

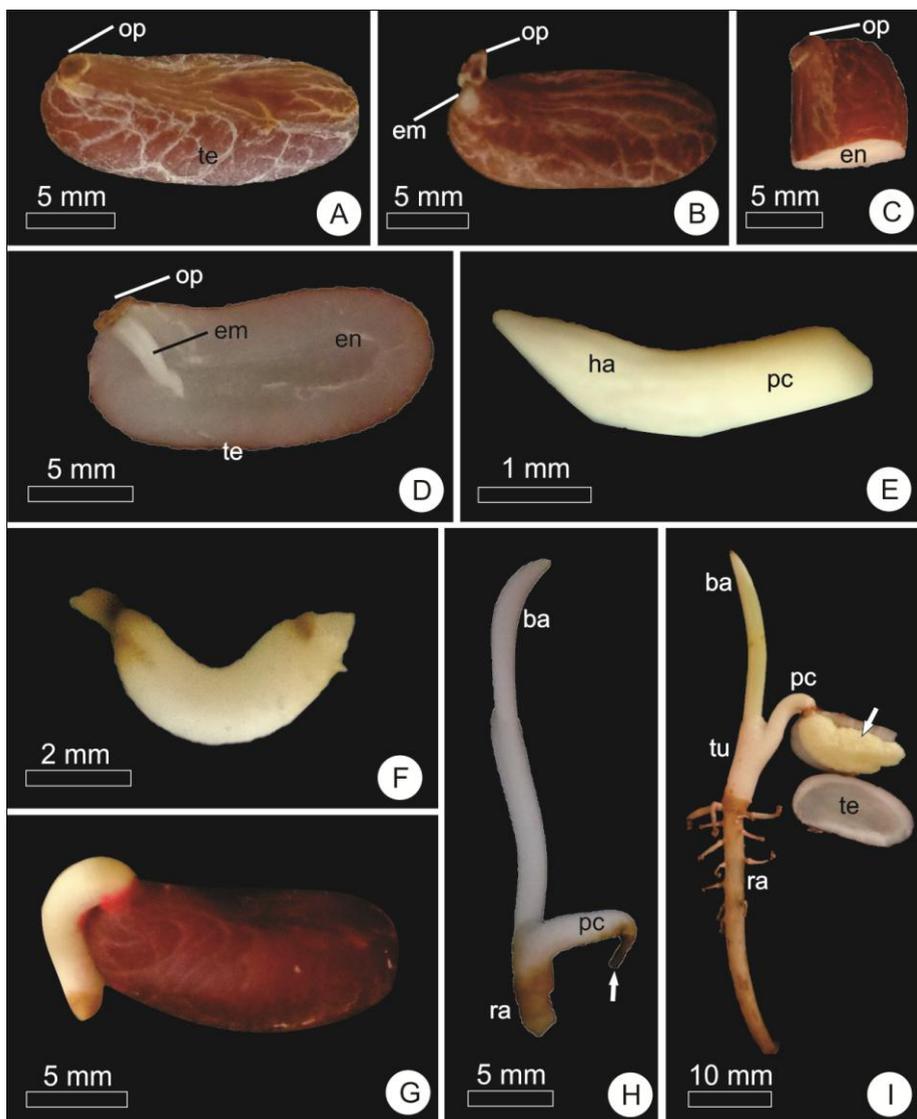


FIGURA 1 - Estrutura da semente, embrião e plântula de *Butia capitata*:

- Semente inteira, evidenciando o opérculo
- Semente indicando a remoção do opérculo
- Secção transversal da semente
- Secção longitudinal da semente, evidenciando o embrião inserido parcialmente no endosperma
- Embrião isolado
- Desenvolvimento inicial de plântulas cultivadas *in vitro* por 15 dias

g) Desenvolvimento inicial de plântula a partir da germinação de semente sem opérculo, com sete dias, na presença de luz, evidenciando o alongamento do pecíolo cotiledonar

h) Plântula desenvolvida a partir do cultivo *in vitro* de embriões isolados, após 30 dias, no escuro, apresentando raiz e bainhas, com destaque para o haustório sem desenvolvimento (seta)

i) Desenvolvimento de plântula proveniente de semente sem opérculo, com 30 dias de cultivo, apresentando raízes e bainhas, com destaque para o haustório desenvolvido (seta)

Notas: op: opérculo; te: tegumento; em: embrião; en: endosperma; ha: haustório; pc: pecíolo cotiledonar; ba: bainha; tu: tubo; ra: raiz.

Fonte: Da autora.

3.1 EFEITO DA SACAROSE E DE ESTRUTURAS DA SEMENTE NA GERMINAÇÃO IN VITRO

Não houve efeito de interação entre a sacarose e as estruturas da semente. Independente da condição em que os embriões ou sementes foram cultivados, a presença de sacarose no meio de cultura favoreceu a germinação (61,1 %) e o desenvolvimento das plântulas, com emissão de raízes (51,5%) e de bainhas (45%). No meio sem sacarose, as médias para as mesmas características avaliadas foram: 32,7; 8,4 e 9,9 %, respectivamente. Quando se analisa somente o cultivo dos embriões isolados, 76% germinam em meio com sacarose, sendo 72% em meio sem sacarose, porém a ausência da sacarose não permitiu o desenvolvimento de raízes e de bainhas.

Os tratamentos sementes sem opérculo e embriões isolados proporcionaram percentuais de germinação superiores em relação às sementes seccionadas transversalmente e sementes inteiras (GRAF. 2). No tratamento secção longitudinal da semente, os embriões alongaram no sentido oposto à região do opérculo, tendo o pecíolo cotiledonar se tornado curvilíneo sobre a semente até atingir o meio de cultura, sendo que a semente permaneceu com o opérculo intacto.

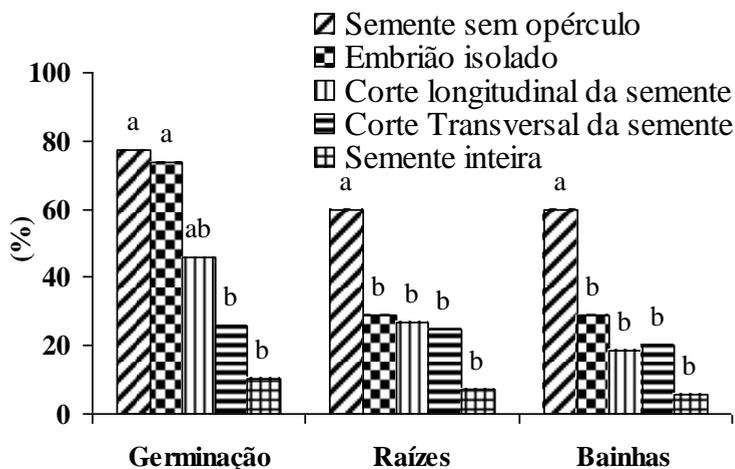


GRÁFICO 1 – Percentual de germinação *in vitro* e de emissão de raízes e bainhas em plântulas de *Butia capitata* provenientes de: semente sem opérculo, embrião isolado, corte longitudinal da semente, corte transversal da semente e semente inteira

Fonte: Da autora.

A emissão de raízes e bainhas em plântulas originadas de sementes sem opérculos foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos (GRAF. 1). O tratamento semente sem opérculo favoreceu o acúmulo de massa seca nas bainhas, raízes, haustório, pecíolo cotiledonar e tubo das plântulas de *B. capitata*. A massa seca do pecíolo cotiledonar não diferiu entre plântulas provenientes de sementes sem opérculo e embriões isolados (GRAF. 2).

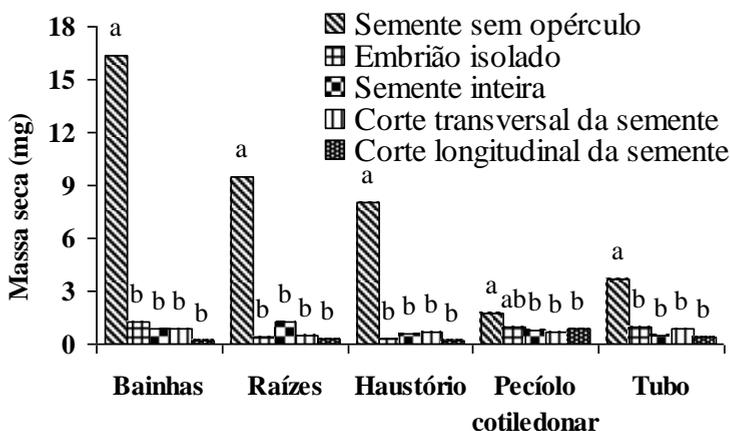


GRÁFICO 2 – Massa seca das bainhas, raízes, haustório, pecíolo cotiledonar e tubo em plântulas de *Butia capitata* após o cultivo *in vitro* dos embriões associados às estruturas da semente: semente sem opérculo, embrião isolado, semente inteira, corte transversal da semente e corte longitudinal da semente

Fonte: Da autora.

3.2 EFEITO DO GA₃ NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES

As sementes que tiveram os opérculos removidos começaram a germinar após o segundo dia de cultivo e, a partir do quarto dia, aproximadamente, 90% das sementes já haviam germinado (GRAF. 2). As sementes em que não foram retirados os opérculos submetidas à imersão nas concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹ em GA₃ começaram a germinar no sétimo dia, em percentuais próximos a 2%. Maiores porcentagens de germinação em sementes com opérculo ocorreram a partir do vigésimo quinto dia de cultivo em todas as doses, exceto para o controle, que não foi evidenciada germinação (GRAF. 3B).

Notas: Após valores finais do percentual de germinação, as letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre sementes com e sem opérculos e as letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as doses de GA₃ em sementes com ou sem opérculos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Seta indica ocasião da repetição do tratamento com GA₃

Fonte: Da autora.

Não houve efeito do GA₃ na germinação quando se utilizaram sementes sem opérculo (GRAF. 3A). Nas sementes em que os opérculos foram mantidos, as concentrações de 100, 1000 e 2000 mg L⁻¹ proporcionaram incrementos na germinação (GRAF. 3B). O índice de velocidade de germinação das sementes com opérculo foi reduzido (0,0254), quando comparado com aqueles em que se retirou a estrutura (11,2136). Nas sementes do tratamento semente com opérculo, a retirada da estrutura após o período de avaliação do experimento proporcionou 100 % de germinação após 30 dias.

3.3 EFEITO DO GA₃ NO DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES ISOLADOS

A dose de 2000 mg L⁻¹ proporcionou percentual de germinação superior, em relação ao controle (GRAF. 5). Não houve indicativo de estiolamento das plântulas, uma vez que o comprimento da raiz principal e das bainhas foliares nas plântulas provenientes de sementes pré-imersas em soluções de GA₃, foi semelhante em relação ao controle.

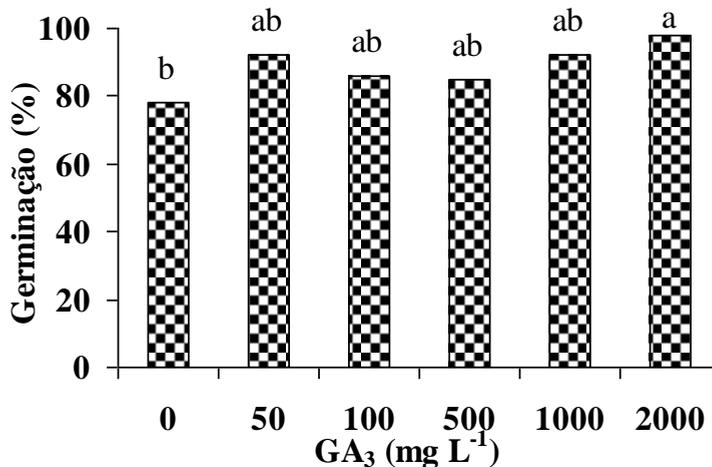


GRÁFICO 4 – Percentual de germinação dos embriões de *Butia capitata*, excisados de sementes pré-embebidas em soluções de GA₃

Fonte: Da autora.

O diâmetro da raiz principal foi favorecido pelas doses de 100, 500, e 1000 mg L⁻¹ de GA₃ (GRAF. 5). O diâmetro do haustório nas doses de 0 e 50 mg L⁻¹ de GA₃ foi menor quando comparado com as maiores doses. O comprimento do tubo em plântulas provenientes de embriões excisados de sementes sem pré-embebição em soluções de GA₃ foi superior em relação à dose de 100 mg L⁻¹ de GA₃.

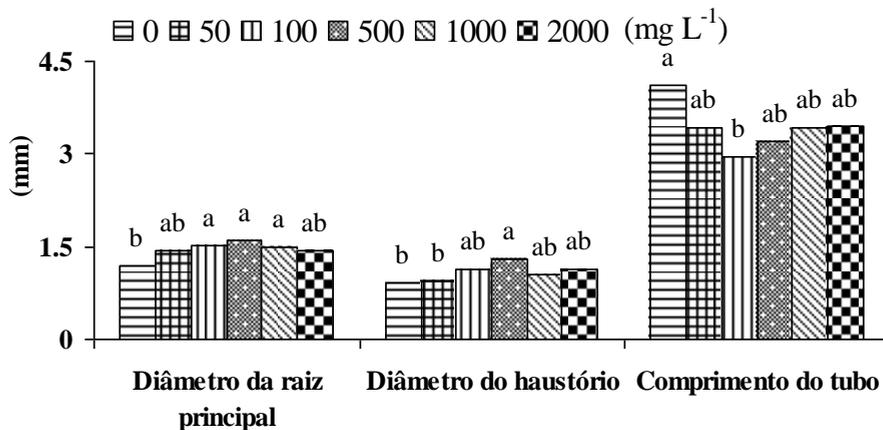


GRÁFICO 5 – Diâmetro da raiz principal, diâmetro do haustório e comprimento do tubo das plântulas de *Butia capitata* originadas de embriões cultivados *in vitro*, que foram excisados de sementes pré-embebidas em soluções com diferentes concentrações de GA₃

Fonte: Da autora.

4 DISCUSSÃO

As estruturas da semente adjacente ao embrião proporcionam restrição física sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *B. capitata*. O maior percentual de germinação nas sementes sem opérculo e embriões isolados, independente do fornecimento de sacarose no meio de cultivo, confirma que há uma barreira mecânica impedindo o alongamento do embrião, como verificado nas sementes íntegras, onde a germinação foi muito inferior. Oliveira (2012) relatou várias camadas de células no endosperma micropilar e no tegumento de *B. capitata*, que não são lignificadas. Isso também foi encontrado por Moura *et al.* (2010), em outra palmeira, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Mart.. A remoção parcial ou total do opérculo tem sido usada como método de superação de dormência em várias palmeiras, como: *Attalea vitrivir* Zona (NEVES *et al.*, 2013), *A. aculeata* (RIBEIRO *et al.*, 2011a), *Elaeis guineensis* Jacq. (HUSSEY, 1958), *Pritchardia remota* (Kuntze) Beck (PEREZ *et al.*, 2008), *Rhapidophyllum hystrix* (CARPENTER *et al.*, 1993), *Phoenix dactylifera* L. (AL-WASEL;

WARRANG, 1998) e inclusive em *B. capitata* (FIOR *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2012).

Alguns estudos têm relatado a elevada demanda por oxigênio durante a germinação de palmeiras, como em sementes de *E. guineensis* (HUSSEY, 1958) e em embriões de *Cocus nucifera* Linn (PECH Y AKÉ *et al.*, 2004). No presente trabalho evidenciou-se que a germinação de sementes seccionadas transversalmente, em que o embrião teve acesso ao oxigênio atmosférico, não divergiu em relação à das sementes inteiras, indicando que o fluxo de gases não foi limitado pelos tecidos adjacentes ao embrião.

A presença de substâncias inibidoras em estruturas adjacentes ao embrião também pode influenciar a germinação (BASKIN; BASKIN, 1998; HARTMANN *et al.*, 2002). Há relatos de substâncias químicas que interfere na germinação de palmeiras (KHAN *et al.*, 1982; TZEC-SIMÁ *et al.*, 2006). Em *B. capitata*, Magalhães *et al.* (2012b) evidenciaram que o endosperma apresenta substâncias com efeito alelopático, que comprometeram o crescimento da radícula de alface. No entanto, a possibilidade de existir efeito inibidor químico no endosperma ou tegumento opercular, para a germinação de embriões de *B. capitata*, pode ser descartada, pois, no tratamento corte longitudinal da semente, ocorreram germinação e desenvolvimento de raízes e bainhas em plântulas. Em *A. aculeata*, não foi evidenciado efeito alelopático do endosperma e do tegumento sobre a germinação de embriões *in vitro* ou desenvolvimento das plântulas (RIBEIRO, 2010).

A sacarose é a fonte energética principal na mobilização de reservas no início da germinação (BUCKERIDGE *et al.*, 2005), sendo requerida em maior quantidade no cultivo de embriões pouco diferenciados (BHOJWANI; RAZDAN, 1996; BRIDGEN, 1994; RAGHAVAN, 2003). Oliveira (2012) relatou mobilização de reservas proteicas e amiláceas no pecíolo cotiledonar e no haustório, durante a germinação de *B. capitata*. O incremento à germinação na presença de sacarose no caso dos tratamentos envolvendo as sementes pode estar relacionado à dificuldade de mobilização das reservas embrionárias e das reservas presentes no endosperma. O uso de sacarose

no cultivo de embriões isolados não é necessário para a germinação, porém é imprescindível para a formação de plântulas, corroborando resultados encontrados por Ribeiro *et al.* (2011b), que também observaram alongamento *in vitro* dos embriões de *B. capitata*, na ausência de sacarose. Em *Astrocarym ulei* (PEREIRA *et al.*, 2006) e *Cocus nucifera* (LÉDO *et al.*, 2007), a presença de sacarose é fundamental para a germinação de embriões e para o desenvolvimento de plântulas normais.

Apesar do baixo percentual de germinação das sementes intactas de *B. capitata* submetidas às doses de GA₃, foi evidenciado incremento na germinação a partir do vigésimo quinto dia de cultivo, em relação às sementes intactas que não foram tratadas com GA₃, sugerindo que o tempo de cultivo não foi suficiente para a atuação efetiva do fitorregulador. Em *A. aculeata*, foi observado comportamento semelhante nas primeiras quatro semanas de cultivo, sendo que após 18 semanas de cultivo, o percentual de germinação aumentou para 40% (RIBEIRO *et al.*, 2011a).

As giberelinas podem estimular o alongamento do embrião em sementes intactas ou com remoção parcial do opérculo e mobilizar as reservas do endosperma, enfraquecendo as barreiras para a germinação (BASKIN; BASKIN, 1998; BEWLEY, 1997; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2011a). O efeito do GA₃ na germinação de sementes de *B. capitata* corrobora com resultados encontrados para outras palmeiras (CARVALHO *et al.*, 2005; NAGAO *et al.*, 1980; ROBERTO; HABERMANN, 2010), mas não confirmam os resultados encontrados por Lopes *et al.* (2011), que verificaram ausência do efeito de 1000 mg L⁻¹ de GA₃ na germinação de sementes de *B. capitata*. No entanto, no trabalho destes autores não foi utilizada pré-embebição, que pode ser necessária para se atingir a fase II da embebição, e nem aplicações sucessivas de GA₃. Ribeiro *et al.* (2011a) verificaram que aplicações repetidas de GA₃, nas sementes de *A. aculeata*, favoreceram a germinação.

Sementes com dormência fisiológica não profunda respondem à giberelina, o que não ocorre na dormência fisiológica intermediária (BASKIN; BASKIN, 2004). Com os resultados apresentados neste trabalho é possível confirmar a classificação da dormência de *B. capitata* como fisiológica do tipo não profunda (BASKIN; BASKIN, 2004; FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2012a; OLIVEIRA, 2012). Porém são necessários novos estudos para avaliar a função das giberelinas na germinação de *B. capitata*, uma vez que o fitorregulador proporcionou incrementos à germinação em sementes íntegras, mas não foi observado efeito no IVG e no percentual de germinação em sementes sem opérculo.

Conforme Nonogaki *et al.* (2010), normalmente, quando as sementes necessitam de giberelina para completar a germinação, o cultivo de embriões isolados dispensa o uso do fitorregulador. Apesar do GA₃ ter favorecido a germinação dos embriões isolados e o desenvolvimento de plântulas de *B. capitata* em relação ao controle, embriões sem tratamento germinam em níveis superiores a 90% (MAGALHÃES *et al.*, 2012a; NEVES *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2011b). Assim, a resposta ao GA₃ na espécie não está associada ao desequilíbrio hormonal ou imaturidade fisiológica relatada para embriões de *Cocus nucifera*, que apresentam dificuldades de germinarem *in vitro* (PECH Y AKÉ *et al.*, 2007).

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho evidenciou-se que a sacarose é fundamental no cultivo de embriões isolados para o desenvolvimento de plântulas. Há restrição física à germinação imposta pelos tecidos da semente adjacentes ao embrião, sendo que a remoção do opérculo e o tratamento com GA₃ em sementes intactas de *B. capitata* proporcionaram incrementos na germinação, confirmando a classificação da dormência como fisiológica não profunda.

REFERÊNCIAS

- AL-WASEL, A. S.; WARRAG, M. O. A. Effect of fruit developmental stage, seed scarification and operculum removal on seed germination of date palm. **Agricola Science**, v.10. p.153-161, 1998.
- ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.832-840, 1997.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 1998. 666 p.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed science research**, v. 14, p. 1-16, 2004.
- BENMAHIOUL, B.; KAID-HARCHE M.; DORION, N.; DAGUIN F. In vitro embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). **Scientia Horticulturae**. v.122, p.479-483, 2009.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**. New York: Plenum Press, v.9 , p.1055-1066, 1997.
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice, a revised**. Elsevier: Amsterdam, 1996. 767 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 2009. 399 p.
- BRIDGEN, M. P. A review of plant embryo culture. **Hortscience**, v.29, p.1243-1245, 1994.
- BROSCHAT, T. K.; DONSELMAN, H. Effects of Fruit Maturity, Storage, Presoaking, and Seed Cleaning on Germination in Three Species of Palms. **Journal of Environmental Horticulture**, v.5, p.6-9, 1987.
- BROSCHAT, T. K. Endocarp removal enhances *Butia capitata* (Mart.) Becc. (pindo palm) seed germination. **Hortecchnology**, v.8, p.586-587, 1998.
- CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.211-215, 2009.

CARPENTER, W. J.; OSTMARK, E. R.; CORNELL, J. A. Embryo cap removal and high temperature exposure stimulate rapid germination of needlepalm seed. **HortScience**, v.28, p.904-907, 1993.

CARVALHO, N. O. S.; PELACANI, C. R.; RODRIGUES, M. O. de S., CREPALDI, I. C. Uso de substâncias reguladoras e não-específicas na germinação de sementes de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v.5, p.28-32, 2005.

CASTRO, R. D. de; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. N. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

COCUCCI, A. E.; MARIATH, J. E. A. Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro, p. 15-30. In: A. FERREIRA, G.; F. BORGHETTI. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.

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

ELLIS, R. H., HONG, T. D., ROBERTS, E. H.; SOETISNA, U. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. **Seed Science Research**, v.1, p.99-104, 1991.

ENGELMANN, F.; DUMET, D.; CHABRILLANGE, N.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; ASSY-BAH, B.; DEREUDDRE, J.; DUVAL, Y. Factors affecting the cryopreservation of coffee, coconut and oil palm embryos. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n.103, p.27-31, 1995.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.40, p.427-433, 2004.

FARIA, J. P.; ALMEIDA, F.; SILVA, L. C. R. da, VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p.827-829, 2008.

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

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v.171, p.501-523, 2006.

FINTEL, G. T., BERJAK P.; PAMMENTER, N. W. Seed behaviour in *Phoenix reclinata* Jacquin, the wild date palm. **Seed Science Research**, v.14, p.197-204, 2004.

FIOR, C. S.; RODRIGUES L. R.; LEONHARDT C.; SCHWARZ S. F. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, v.41, p.1150-1153, 2011.

GEORGE, E.F. Plant tissue culture procedure: background. In: GEORG, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3^a. ed. The Netherland: Springer, 2008. v.1, cap.1, p.1-28.

GEORGE, E.F.; KLERK, G-J. de. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In: GEORG, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.-J. de. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. The Netherland: Springer, 2008. v.1, cap.1, p.29 -64.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E., HUERTAS-MICÓ, M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination and storage of *Chamaerops humilis* (dwarf fan palm). **Seed Science and Technology**, v.34, p.143-150, 2006.

GROUT, B. W. W.; SHELTON, K.; PRITCHARD, H. W. Orthodox behavior of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. **Annals of Botany**, v.52, p.381-384, 1983.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation, principles and practices**. Prentice-Hall: New Jersey, 2002. 880 p.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behaviour. **International Plant Genetic Resources Institute**, n.1, 1996.

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

HUSSEY, G. An analysis of the factors controlling the germination of the seed of the oil palm, *Elaeis guineensis* (Jacq.). **Annals of Botany**, v.22, p.259-286, 1958.

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

LOPES, P. S. N.; AQUINO, C. F.; MAGALHÃES, H. M.; BRANDÃO JÚNIOR, D. da S. Tratamentos físicos e químicos para superação de dormência em

sementes de *Butia capitata* (Martius) Beccari. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.41, p.120-125, 2011.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira: Arecaceae (Palms)**. Nova Odessa : Instituto Plantarium, 2010. 384 p.

KHAN, M. I. Allelopathic potential of dry fruits of *Washingtonia filifera*: inhibition of seed germination. **Physiologia Plantarum**, v.54, p.323-328, 1982.

MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). **Trees**, Berlin, p.1-12, 2012a.

MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; SILVÉRIO, F. O.; SILVA, H. F. J.. Evaluation of inhibitory effect and the chemical composition of extracts from the endocarp and endosperm from coquinho-azedo on the germination of lettuce seeds. **Allelopathy Journal**, v.30, p.49-60, 2012b.

MAGUIRE, J. D. Seeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177. 1962.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARTINS, E. R. **Projeto conservação de recursos genéticos de espécies frutíferas nativas do norte mineiro: coleta, ecogeografia e etnobotânica**. Montes Claros: UFMG, 2003. 76 f.

MARTINS, C. C., BOVI, M. L. A.; NAKAGAWA, J. Desiccation effects on germination and vigor of King palm seeds. **Horticultura Brasileira**, v.21, p.88-92, 2003.

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

MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; FONSECA, R. S.; RIBEIRO, L. M.; NUNES, Y. R. F. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae) em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais. **Unimontes Científica**, v.8, p.143-149, 2006.

MOURA, R. C. **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no norte de Minas Gerais**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v.67, p.375-495, 2010.

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

NAGAO, M. A.; KANEGAWA, K.; SAKAI, W. S. Accelerating palm seed germination with gibberellic acid scarification, and bottom heat. **HortScience**, v.15, p.200-201, 1980.

NAMBARA, E.; OKAMOTO M.; TATEMATSU, K.; YANO, R.; SEO, M.; KAMIYA, Y. INVITED REVIEW: Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Science Research**. v.20, p.55–67, 2010.

NEGREIROS, G. F., GUALTIERI, S. C.; PEREZ, J. A. Resposta fisiológica de sementes de palmeiras ao envelhecimento acelerado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.391-396, 2004.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação *in vitro* de embriões de coquinho azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc. (Arecaceae)] obtidos de frutos com diferentes graus de maturação. **Revista de Biologia Neotropical**, v.7, p.47-54, 2010.

NEVES, S. C.; RIBEIRO, L. M.; CUNHA, L. R. G.; PIMENTA, M. A. S.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; LOPES, P. S. N. Diaspore structure and germination ecophysiology of the babassu palm (*Atalea vitrivir*). **Flora**, v.208., p.1-11, 2013.

NGOBESE, N.Z.; SERSHEN; PAMMENTER, N.W; BERJAK, P. Cryopreservation of the embryonic axes of *Phoenix reclinata*, a representative of the intermediate sees category. **Seed science and technology**, v.38, p.704-716, 2010.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination: still a mystery. **Plant Science**, v.179, p.574-581, 2010.

OLIVEIRA, N. C. C. de. **Germinação do coquinho azedo**: aspectos morfoanatômicos e fisiológicos. 2012. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros.

OKAMOTO, M.; TANAKA, Y.; ABRAMS, S. R.; KAMIYA, Y.; SEKI, M.; NAMBARA, E. High humidity induces ABA 80-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic ABA responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v.149, p.825-834, 2009.

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

PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.56-69, 2000.

PANAIA, M.; BUNN, E.; TURNER, S. R.; MCCOMB, J. Incubation temperature critical to successful stimulation of *in vitro* zygotic embryo growth in four Australian native Cyperaceae species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.97, p.197–202, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/v816788774577h16.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2011.

PANZA, V.; PIGHIN, D.; LÁINEZ, V.; POLLERO, R. J.; MALDONADO, S. Storage lipids and proteins of *Euterpe edulis* seeds. **Biocell**, v.33, p.99-106, 2009.

PECH Y AKÉ, A.; MAUST, B.; OROZCO-SEGOVIA, A.; OROPEZA, C. The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.43, p.247-253, 2007.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. da S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.251-256, 2006.

PEREZ, H. E.; CRILEY, R. A.; BASKIN, C. C. Promoting germination in dormant seeds of *Pritchardia remota* (Kuntze) Beck., an endangered palm endemic to Hawaii. **Natural Areas Journal**, v.28, p.251-260, 2008.

RAGHAVAN V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In vitro Cellular and Development Biology – Plant**, v.39, p.437–442, 2003.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004, p.728.

RIBEIRO, L. M., GARCIA, Q. S., OLIVEIRA, D. M. T., NEVES, S. C. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, 361-368, 2010.

RIBEIRO, L. M. **Estudos estruturais e fisiológicos sobre a germinação da macaúba [Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. Ex. Mart. (Arecaceae)]**. 2010, 100 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

RIBEIRO, L. M.; SOUZA, P. P.; RODRIGUES, J. R.; OLIVEIRA, T. G. S.; Garcia, Q. S. Overcoming dormancy in macaw palm diaspores, a tropical

species with potencial for use as bio-fuel. **Seed Science & Technology**, v.39, p.303-317, 2011a.

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

RIBEIRO, L. M.; OLIVEIRA, T. G. S.; CARVALHO, V. S.; SILVA, P. de O.; NEVES, S. da C.; GARCIA, Q. S. The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. **Seed Science and Tecnology**, v.40, 2012.

ROBERTO, G. G., HABERMANN, G. V. Morfológica e respostas fisiológicas das sementes recalitrantes *Euterpe edulis* a luz, temperatura e giberelinas. **Ciência e tecnologia de sementes**, v.38, p.367-378, 2010.

SAMUEL, K.; DEBASHISH, D.; MADHUMITA B.; PADMAJA, G.; PRASAD, S. R.; MURTHY, V. B. R.; RAO, P. S. *In vitro* germination and micropropagation of *Givotia rottleriformis* Griff. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**. v.45, p.466-473, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/gu8m57p180371pm2.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2011.

SCHWECHHEIMER, C. Understanding gibberellic acid signaling-are we there yet? **Current Opinion in Plant Biology**. v.11, p.9–15, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 25 abr. 2011.

TWEDDLE, J.C., DICKIE, J.B., BASKIN, C.C., BASKIN, J.M. Aspects of Seed Desiccation Sensitivity. **Journal of Ecology**, v.91, p.294-304, 2003.

TZEC-SIMÁ, M. A.; ORELLANA, R.; ROBERT, M. L. *In vitro* rescue of isolated embryos of *Bactris major* Jacq. and *Desmoncus orthacanthos* Mart., potentially useful native palms from the Yucatan Peninsula (México). **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, v.42, 54-58, 2006.

WEN, B.; WANG, R. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of *Sabal* embryos. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**. v.102, p.237–243, 2010.