



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (*Astrocaryum aculeatum*
MEYER ARECACEAE)

Flávio Freires Ferreira

MANAUS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

FLÁVIO FREIRES FERREIRA

GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (*Astrocaryum aculeatum*
MEYER ARECACEAE)

Dissertação apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia Tropical da
Universidade Federal do Amazonas,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Agronomia Tropical na área de
Produção Vegetal (Biotecnologia,
Genética e Melhoramento).

Orientador: Dr. José Odair Pereira

Co-orientadora: Dra. Simone da Silva

MANAUS

2012

FLÁVIO FREIRES FERREIRA

GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (*Astrocaryum aculeatum*
MEYER ARECACEAE)

Dissertação apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia Tropical da
Universidade Federal do Amazonas,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Agronomia Tropical na área de
Produção Vegetal (Biotecnologia,
Genética e Melhoramento).

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. José Odair Pereira, Presidente

Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dr^a Eva Atroch, Membro

Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Paulo Hecilio Viegas Rodrigues, Membro

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo

*A minha família, pelo apoio, carinho e
confiança, nessa jornada em busca de
conhecimento.*

DEDICAO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por permitir a realização desta dissertação, me fortalecendo espiritual e intelectualmente, durante esta caminhada;

Ao meu Pai José Tadeu Marques Ferreira e à minha Mãe Aldinéia Freires Ferreira, pelo carinho, dedicação e orientação;

Aos meus Irmãos Josinéia, Jaílson, Samoel, Josiléia e Camila Vitória Freires Ferreira, pelo apoio, carinho e solidariedade com a minha contínua busca por conhecimento;

À minha esposa, Efigênia Lopes da Silva, que tanto amo, pela mulher guerreira, que sempre estende a mão amiga nas dificuldades e pela ajuda na execução da pesquisa;

Aos meus Filhos Lucas Diego Alencar Ferreira, Iago da Silva Ferreira e Ruan Tadeu da Silva Ferreira que, mesmo sem perceberem, contribuíram nessa trajetória, principalmente por ficarem sem minha presença e atenção, quando me dedicava à conquista do Título de Mestre;

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), através da Coordenação de Produtos Naturais (CPN), pela oportunidade, disponibilizando sua estrutura física, material e intelectual. Assim como pelo suporte financeiro;

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), através do Programa de Pós Graduação em Agronomia Tropical (PGATR), pela oportunidade de aquisição de conhecimento científico e tecnológico, contribuindo de forma efetiva no desenvolvimento desta Dissertação;

Ao Dr. Imar Cezar de Araújo, Coordenador de Implementação do CBA, pelo apoio ao projeto, acima de tudo pela força e incentivo à busca de conhecimento.

Ao Dr. José Augusto da Silva Cabral, Coordenador de Produtos Naturais, pela compreensão durante a realização desta dissertação;

Ao Dr. José Odair Pereira e à Dra. Simone da Silva, por suas orientações e sugestões que muito contribuíram para melhoria e apresentação desta dissertação;

À Dra. Arlena Maria Guimarães Gato, Dr. Daniel Felipe de Oliveira Gentil e à Dra. Eva Atroch suas sugestões que muito contribuíram para melhoria e apresentação desta dissertação;

Aos Colegas de Apoio Técnico do LCTV: Efigênia Lopes da Silva, Maria Augusta Gomes dos Santos, Maria do Socorro Souza, Vítor Rafael Pereira Marinho, Daniele de Carvalho Rodrigues, Ester Neta Pinheiro, Márcia Fonseca Gato, Lais Medeiros Assunção e Paulo Roberto dos Santos Doce pelo auxílio, dedicação e amizade durante a execução deste trabalho;

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MEU MUITO OBRIGADO A TODOS...

*Confia no Senhor de todo o teu coração e
não te estribes no teu próprio entendimento.*

*Reconhece-o em todos os teus caminhos, e
ele endireitará as tuas veredas.*

Provérbios 3:5-6

RESUMO

Astrocaryum aculeatum Meyer (Arecaceae), popularmente conhecido por tucumã, é uma palmeira que ocorre na Amazônia e apresenta potencial para o mercado de alimento e artesanato. Tem grande importância econômica, principalmente, pelos diferentes produtos que dela podem ser extraídos e usados. A espécie tem como característica a demora na germinação, fato que desestimula o seu cultivo. Deste modo, informações que viabilizem métodos e técnicas que acelerem a produção de mudas são importantes como estímulo para o cultivo da espécie. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos de germinação e desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tucumã através da técnica de cultura de tecidos. Os ensaios foram realizados no Centro de Biotecnologia da Amazônia. Foi avaliada os efeitos de diferentes antioxidantes (carvão ativado, ácido ascórbico e polivinilpirrolidona); foram testados os meios semi sólidos MS e Y³ com 0,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹ de ácido indolilacético (AIA), na fase de alongamento; já em fase de enraizamento, os tratamentos consistiram de quatro concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) (0, 2,5, 5, 10 mg.L⁻¹). As culturas permaneceram em sala de crescimento com temperatura ajustada em 25 ± 1°C, intensidade luminosa de 30,0 μmols.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Na fase de aclimatização as plantas foram mantidas em casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente por 60 dias. Os substratos utilizados foram areia, fibra de coco, Vivato®, fibra de coco x areia, fibra de coco x Vivato®, areia x Vivato® e areia x fibra de coco x Vivato®, todos nas mesmas proporções. O ensaio com antioxidantes os resultados demonstraram que não há a necessidade de utilização de antioxidantes, pois o meio MS (controle) apresentou 86% de germinação e ausência de oxidação. Já na fase de alongamento o meio MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIA apresentou superioridade aos demais tratamentos, desenvolvendo plantas com altura média de 6,18 cm. Para o enraizamento, o tratamento com 10,0 mg.L⁻¹ de ANA, foi superior, com uma produção média de 9,0 raízes por planta, com um percentual de enraizamento de 75,0%. Na fase de aclimatização, o substrato Vivato® apresentou resultados superiores aos demais, com incremento médio em altura de 10,25 cm e lançamento de cinco novas folhas.

Palavras Chaves: palmeiras, tucumã, cultura de embrião, germinação *in vitro*.

ABSTRACT

Astrocaryum aculeatum Meyer (Arecaceae), popularly known by tucumã, is a palm tree that occurs in the Amazon and presents a potential market of food and crafts. Has great economic importance, mainly the different products that it can be extracted and used. The specie is characterized by delay in germination, a fact that discourages their cultivation. Thus, information that enable methods and techniques that accelerate the seedlings production is important as a stimulus to the specie cultivation. The aimed of this study was to establish protocols for tucumã *in vitro* germination and development of zygotic embryos through tissue culture techniques. The tests were performed at the Centro de Biotecnologia da Amazônia. We evaluated the effects of different antioxidants (activated charcoal, ascorbic acid and polyvinylpyrrolidone), the means were tested semi solid MS and Y3 with 0.0 mg L⁻¹ and 2.0 mg L⁻¹ indolylacetic acid (IAA) in the elongation phase, while in the rooting phase, the treatments consisted of four concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) (0, 2.5, 5, 10 mg L⁻¹). The cultures remained in a growth chamber with temperature set at 25 ± 1 ° C, light intensity of 30.0 µmols.m⁻².s⁻¹ and 16-hour photoperiod. During the acclimatization plants were kept in a greenhouse with intermittent misting system for 60 days. The substrates used were sand, coconut fiber, Vivato[®], coconut fiber x sand, coconut fiber x Vivato[®], sand and Vivato[®], sand x coconut fiber x Vivato[®], all in the same proportions. The antioxidant assay results showed that there is no need for the use of antioxidants as MS medium (control) showed 86% germination and absence of oxidation. In stretching phase, MS medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ IAA, was superior to other treatments, developing plants with an average height of 6.18 cm. For rooting, the treatment with 10.0 mg L⁻¹ NAA was higher, with an average production of 9.0 roots per plant, with a rooting percentage of 75.0%. During the acclimatization phase, the substrate Vivato[®] showed superior results to the other, with an average increase in height of 10.25 cm and launch of five new leaves.

Keywords: palm trees, tucumã, embryo culture, *in vitro* germination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Análise biométrica de frutos de <i>Astrocaryum aculeatum</i> : A) peso do fruto inteiro; B) medidas do fruto inteiro; C) peso do fruto sem o exocarpo; D) medidas do fruto sem o exocarpo; E) volume do fruto inteiro; F) volume do fruto sem o exocarpo.....	33
Figura 02 – Procedimentos de pré assepsia dos explantes: A) processo de retirada da casca e polpa; B) secagem dos pirênios; C) quebra do endocarpo; D) Detalhe da quebra do endocarpo; E) Retirada do endosperma; F) endosperma; G) cortes para retirada da porção contendo o embrião; H) porções de endosperma contendo os embriões em fase de hidratação.....	34
Figura 03 – Assepsia dos explantes em câmara de fluxo laminar: A) Assepsia, em álcool 70%, das porções de endosperma contendo os embriões; B) Retirada do álcool 70% com o auxílio de uma peneira; C) Lavagem das porções de endosperma contendo os embriões; D) Assepsia com solução de hipoclorito de sódio; E) Tríplice lavagem; F) Porções de endosperma contendo os embriões prontos para inoculação.....	35
Figura 04 – Processo de inoculação dos embriões de <i>Astrocaryum aculeatum</i> ; A) Sala de fluxo laminar; B) Visão geral do fluxo laminar; C) Corte do endosperma para retirada do embrião; D) retirada do embrião; E) Embrião inoculado em tubo de ensaio com auxílio de uma pinça; F) embrião inoculado; G) Transporte dos tubos de ensaio para sala de crescimento; G) Tubos de ensaios com embriões inoculados depositados em B.O.D.....	37
Figura 05 – Processo de seleção de mudas para aclimatização: A) vista geral; B) plântula de selecionada para aclimatização.....	40
Figura 06 – Incremento em altura de plântulas de tucumã <i>in vitro</i> em função da concentração de AIA, após 60 dias.....	47
Figura 07 – Enraizamento de plântulas de tucumã <i>in vitro</i> em função da concentração de AIA, após 30 dias.....	49
Figura 08 – Plantas de tucumã aclimatizada em casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente, após 60 dias.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Composição dos Sais de MS (Murashige, T. & Skoog, F., 1962) e sais de Y ³ (Eeuwens, 1976).....	38
Tabela 02 - Índices de germinação, oxidação e contaminação de embriões maduros de <i>Astrocaryum aculeatum</i> , após 60 dias de inoculação, em meio MS e Y ³ com diferentes concentrações de antioxidantes.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 -	Germinação de embriões maduros de tucumã <i>in vitro</i> em função de diferentes oxidantes.....	43
Gráfico 02 -	Oxidação de embriões maduros de tucumã <i>in vitro</i> em função de diferentes oxidantes.....	44
Gráfico 03 -	Incremento em altura de plântulas de tucumã <i>in vitro</i> em função da concentração de AIA.....	46
Gráfico 04 -	Percentual de plântulas de tucumã enraizadas <i>in vitro</i> , em função da concentração de ANA.....	48
Gráfico 05 -	Número médio de raiz por plântulas de tucumã <i>in vitro</i> , em função da concentração de ANA.....	48
Gráfico 06 -	Percentual de sobrevivência de <i>Astrocaryum aculeatum</i> no processo de aclimatização.....	51
Gráfico 07 -	Incremento em altura de plântulas de <i>Astrocaryum aculeatum</i> , após 60 dias, em processo de aclimatização.....	51
Gráfico 08 -	Incremento em número de folhas de plântulas de <i>Astrocaryum aculeatum</i> , após 60 dias, em processo de aclimatização.....	52

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	OBJETIVO GERAL.....	16
2.1.	Objetivo específico.....	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1.	Distribuição geográfica das palmeiras.....	17
3.2.	Classificação das palmeiras.....	19
3.3.	Aspectos da frutificação das palmeiras.....	20
3.4.	Morfologia dos frutos.....	22
3.5.	Caracterização botânica de <i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer (Arecaceae).....	23
3.6.	Dormência.....	25
3.7.	Importância econômica.....	26
3.8.	Cultura de Tecidos Vegetais.....	27
3.9.	Reguladores de Crescimento.....	28
3.10.	Cultura de embrião.....	30
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1.	Coleta de material.....	32
4.2.	Extração das sementes e resgate dos embriões.....	33
4.3.	Inoculação dos explantes.....	36
4.4.	Efeito de antioxidantes na germinação <i>in vitro</i>	37
4.5.	Alongamento dos explantes de <i>Astrocaryum aculeatum in vitro</i>	39
4.6.	Enraizamento de plântulas de <i>Astrocaryum aculeatum in vitro</i>	39
4.7.	Aclimatização de plântulas de <i>Astrocaryum aculeatum</i>	40
4.8.	Análise estatística.....	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1.	Efeito de antioxidantes na germinação <i>in vitro</i>	42
5.2.	Alongamento de plântulas de tucumã <i>in vitro</i>	45
5.3.	Enraizamento de plântulas de tucumã <i>in vitro</i>	47
5.4.	Aclimatização de plântulas de <i>Astrocaryum aculeatum</i> propagadas <i>in vitro</i>	50
6.	CONCLUSÃO.....	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade é responsável pelo equilíbrio dos ecossistemas e serve como fonte de uso econômico, sendo responsável pelas atividades agrícolas, pecuárias, pesqueiras e florestais, assim como serve de base para os diversos segmentos industriais, inclusive para a indústria de alimentos, considerada de grande importância para o desenvolvimento de qualquer nação e bem estar de sua população, através da possibilidade de uso de uma dieta ampla (OLIVEIRA, 2007).

A flora brasileira está formada por cerca de 20 mil diferentes espécies de plantas, e a Amazônia, em especial, apresenta espécies com características muito peculiares, de grande potencial para os mais diversos usos. Algumas de suas espécies têm potencial para a exploração sustentável, o que contribui de forma significativa para a melhoria das condições sócio econômicas na Região. A utilização das plantas desta região não se restringe à indústria madeireira, mas de inúmeros produtos, que vão desde frutos, flores, óleos e gorduras, para uso na alimentação humana e animal; substâncias tóxicas e inseticidas, com potencial para serem usados tanto na agricultura como na pecuária; látex, folhas e raízes que tanto podem ser usadas na alimentação como na medicina, bem como, em paisagismo e na ornamentação, na comercialização e industrialização de inúmeros produtos (GUARIM NETO, 1994; CORTEZ *et al.*, 2003) e, mais recentemente, na indústria da biotecnologia e das biojóias.

As palmeiras pertencem ao grupo de plantas mais utilizadas por comunidades indígenas e urbanas, movimentando uma boa parcela da economia nas pequenas e grandes cidades, estimando-se que pelo menos 40% das palmeiras amazônicas são efetivamente utilizadas pelos habitantes da região (ALMEIDA, 2003).

As potencialidades e os valores econômico, ecológico, ornamental e alimentar das palmeiras são grandes, pelo fato de suas diferentes partes serem aproveitadas. Portanto, o seu

estudo é de relevância. A grande importância econômica está baseada, principalmente, pelos diferentes produtos que delas podem ser extraídos e usados. Todas as partes de uma palmeira são aproveitadas de alguma maneira, desde alimentação até o uso medicinal, tendo inclusive utilização nas áreas de paisagismo, arborização e artesanal. A madeira, originada do estipe, é muito resistente e utilizada para assoalhos e paredes de casas, e as folhas para construção, cobertura de casas e produção de fibras. Os frutos e as sementes são utilizados na alimentação humana e animal, e também fornecem matéria-prima para as indústrias de cosméticos, produtos nutracêuticos, pró-vitaminas, entre outros.

A espécie *Astrocaryum aculeatum* Meyer é uma palmeira de cultura pré-colombiana, provavelmente originária do Amazonas – Brasil, onde é muito freqüente, e está localizado em um dos mais importantes Centros de diversidade deste gênero, sendo encontrada nos Estados do Pará, Roraima, Mato Grosso, Rondônia e Acre. É comum nas áreas de formações florestais menos densas e capoeiras, em terrenos bem drenados, bem como próximo aos núcleos habitacionais devido à dispersão não intencional do homem (LORENZI *et al.*, 2004).

Os frutos do tucumã possuem grande potencial como matéria-prima para o desenvolvimento tecnológico de produtos com notáveis características organolépticas, como por exemplo: bebidas alcoólicas, geléias, néctares, sucos, sorvetes, iogurtes e outros, tornando-os interessantes para o emprego industrial e, conseqüentemente, promissores para a exploração racional da fruticultura amazônica. Além disso, a utilização desses frutos poderá criar oportunidades econômicas e gerar empregos no Pólo da Agroindústria de Manaus.

Embora o tucumã seja, aparentemente, pouco exigente quanto à fertilidade do solo e não apresente grandes problemas fitossanitários, o seu plantio na própria região amazônica é inexpressivo. Dentre os fatores que contribuem para essa situação estão, provavelmente, a dificuldade na germinação das sementes, que levam até dois anos para germinar, e a impossibilidade da propagação vegetativa, por ser uma planta monopodial, ou seja, apresenta

apenas uma estirpe diferente do *Astrocaryum vulgare* (tucumã-do-pará), que forma touceira (SÁ, 1984).

Apesar de constituir uma importante atividade econômica para a região, a obtenção dos frutos é feita geralmente de forma extrativista, havendo poucos plantios de *A. aculeatum*. A principal forma de propagação dessa espécie, como de outras palmeiras, é por sementes. Contudo, existem poucas pesquisas sobre o processo de produção de mudas, desde a germinação das sementes. Miranda *et al.* (2001) citam que as sementes da espécie apresentam dormência, constituindo-se num problema para produção de mudas. A dormência é um fator interno da semente, de grande importância no estudo da germinação, e muitas espécies da família Areaceae as exibem em diferentes graus (ODETOLA, 1987).

A propagação do tucumã ocorre exclusivamente pela via seminífera, que em condições naturais pode levar de um a dois anos para germinar (LORENZI, 2004). A propagação via seminífera constitui-se no processo natural de disseminação e perpetuação das espécies. Em se tratando de uma forma de propagação sexual, as plantas frutíferas provenientes de sementes apresentam variações devido à segregação genética (HARTMANN *et al.*, 2002). Portanto, para solucionar os problemas decorrentes das dificuldades de germinação e da desuniformidade das plântulas formadas, a propagação *in vitro*, pela cultura de embriões, torna-se uma ferramenta de grande valia na produção de mudas de muitas palmeiras. A cultura de embriões *in vitro* tem sido usada para superar dormência de sementes, em virtude da imaturidade do embrião ou da presença de substâncias inibidoras no endosperma; estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião; testar a viabilidade de sementes; recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis; e como fonte de explantes devido à elevada totipotência.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho é estabelecer protocolos de germinação e desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae) através da técnica de cultura de tecidos vegetais.

2.1. Objetivos específicos:

- Analisar o efeito de antioxidantes nos meios de cultura, sobre o percentual de germinação e sobrevivência dos embriões;
- Analisar o efeito de diferentes meios de cultura, na fase de alongamento dos explantes;
- Analisar o efeito do ácido indolilacético (AIA), na fase de alongamento dos explantes;
- Analisar o efeito do ácido naftaleno acético (ANA) na promoção do enraizamento;
- Analisar os diferentes substratos, em diferentes proporções, na fase de aclimatização das mudas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Distribuição geográfica das palmeiras

A maior ocorrência de gêneros e espécies de palmeiras verifica-se nas regiões tropicais da Ásia, Indonésia, Ilhas do Pacífico e Américas. Os representantes da família Arecaceae têm uma distribuição pantropical e se desenvolvem em diferentes ambientes. Os limites extremos desta larga distribuição estão representados pelos gêneros *Rhapidophyllum* e *Washingtonia* a 33° N na América do Norte e *Rhopalostylis* a 44° 18' S na Nova Zelândia (FERREIRA, 2001; JOHNSON, 1997). No entanto, apesar desta grande expansão em latitude, a grande maioria das espécies ocorre naturalmente nas regiões tropicais (JOHNSON, 1997). DOWE (1992) estimou que somente cerca de 130 espécies ocorram de forma natural além das latitudes tropicais.

Nas Américas, Henderson *et al.* (1995) dividem a ocorrência das palmeiras em sete regiões, sendo a Região Amazônica, a mais extensa de todas, com aproximadamente 6,5 milhões de km, que inclui toda a floresta da bacia da Amazônia e Orinoco, como também as Guianas. Estes autores estimam que 34 gêneros e 189 espécies e variedades ocorrem nesta região. No Brasil, a chamada Zona dos Cocais abrange extensas regiões: partindo do norte e nordeste em direção ao centro, caracteriza-se pelos babaçuais, carnaubais e buritizais e, em direção ao oeste pelos carandazais (LORENZI *et al.*, 1996).

O Brasil possui cerca de 30% das espécies de plantas e de animais conhecidos no mundo, e estas estão distribuídas em seus diferentes tipos de ecossistemas. É o país detentor da maior diversidade biológica do planeta. Em meio a esta diversidade, as palmeiras estão entre as mais antigas plantas do planeta (CAMBION, 2001). São as plantas que melhor caracterizam a flora tropical e são muito importantes na composição do paisagismo nacional. Estas plantas destacam-se, de forma marcante, e caracterizam a paisagem amazônica

(GRANVILLE, 1992). Segundo Henderson (1995), as palmeiras estão presentes em quase todos os tipos de vegetação.

Almeida (2003) afirma que, por meio do desenvolvimento de mecanismos adaptativos eco-fisiológicos e morfológicos, as palmeiras conseguem habitar diversos ambientes, como florestas densas e abertas de terra firme, várzeas e igapós, bem como caatingas, campinas, campinaranas, savanas, campos e capoeiras. Portanto, as palmeiras, devido às suas formas de adaptação, podem sobreviver nos mais diversos tipos de ambiente: mangues, savanas, desertos, florestas tropicais e florestas periodicamente inundadas (GRANVILLE, 1992; FERREIRA, 2001). De acordo com Henderson (1995), na região amazônica, poucas espécies de palmeiras têm restrições para viver em um único tipo de solo e cita como exemplo a *Mauritia flexuosa* que ocorre em solos inundados, mas pode sobreviver em solos encharcados, como também em solos secos. Segundo este autor, certas espécies podem ter preferência por um determinado tipo específico de solo, mas também podem ocorrer em outros tipos.

O clima da Amazônia é constantemente quente e úmido e o fator climático mais importante é o regime de chuvas, considerando a quantidade anual total, a distribuição sazonal e a variação inter anual. De acordo com Henderson (1995) baseado em Gentry (1982), em geral, a riqueza de espécies é mais alta em áreas de maior pluviosidade, e isto também parece ser verdadeiro para as palmeiras. No entanto, segundo este autor há poucos dados para se fazer qualquer correlação mais definida; e que embora seja encontrado um número maior de espécies nas áreas mais chuvosas da Amazônia Ocidental, a maioria destas também ocorre nas regiões secas das adjacências. Ainda, segundo este autor, o sistema de rios da Amazônia, com seus diferentes tipos de águas, também contribui para a distribuição das palmeiras. Um exemplo típico é a *Leopoldinia pulchra* que vive principalmente em áreas inundadas por águas escuras (do Rio Negro e seus afluentes), mas também ocorre esporadicamente em áreas

com influência de águas claras (do Rio Solimões e seus afluentes). Isto também acontece com algumas espécies de *Bactris*.

Outro fator que pode influenciar a distribuição das palmeiras é a topografia. Algumas palmeiras são encontradas em montanhas com 200 metros de elevação, confrontando com os Andes e dessas apenas *Prestoea tenuiramosa* pode ser considerada endêmica. *Dictyocaryum ptarianum* é comum em inclinações entre 800 e 1700 metros de elevação, mas também ocorre, com pouca frequência, na Amazônia Ocidental, em ambientes com pouca elevação (HENDERSON, 1995). Ainda, segundo este autor, *Euterpe caatinga* e *Geonoma appuniana* são espécies comuns das florestas baixas e vertentes, mas também são encontradas nos Andes do Equador. Outro exemplo é a *Socrotea exorrhiza* que ocorre em abundância em áreas inundadas, de baixas elevações, e com pouca precipitação pluviométrica, bem como, em terra firme, em áreas com precipitação anual acima de 2.500 milímetros. Para este autor, a elevada frequência de chuvas andinas permite a ocorrência destas palmeiras em grandes altitudes.

Na distribuição das palmeiras, outro fator importante, que pode ser considerado, é a influência dos povos indígenas; tendo em vista, a sua utilização por estas comunidades humanas nativas. Sob este aspecto, existe um padrão de comportamento marcante para cada etnia.

3.2. Classificação das palmeiras

As palmeiras são plantas monocotiledôneas, geralmente arborescentes e terrestres pertencentes à família Arecaceae. São dotadas de distintas formas, podendo apresentar estipe solitário ou cespitoso (touceira), subterrâneo (acaule) ou trepador. Podem ou não apresentar espinhos, recobrando totalmente ou de forma parcial a planta, e as folhas podem variar do tipo inteiras à forma de pinas (KAHN, 1990).

Esta família é constituída por 189 gêneros (UHL e DRANSFIEL, 1999) representados por 1.500 a 2.800 espécies em todo o mundo (UHL e DRANSFIEL, 1987; HENDERSON *et al.*, 1995). A quantidade de espécies existentes no chamado Mundo Novo, não é totalmente conhecida, mas as estimativas apontam para um número bastante alto. Para Henderson *et al.*, (1995) existem aproximadamente 200 gêneros e 1.500 espécies de palmeiras em todo mundo, e destas, 67 gêneros e 550 espécies ocorrem naturalmente nas Américas, sendo que os maiores gêneros são *Chamaedorea*, *Bactris* e *Geonoma*, que juntas formam um terço de todas as palmeiras. Para Khan (1997), a família das palmeiras compreende um pouco mais de 200 gêneros e 2.800 espécies distribuídas pelo mundo. Na Amazônia, Henderson (1995) reconhece 34 gêneros e destes, oito (24%) são endêmicos.

Uhl e Dransfield (1987), baseados em Moore (1973) classificaram as palmeiras usando os aspectos morfológicos dos órgãos reprodutores e das partes vegetativas, onde dividiram a família em seis subfamílias, de acordo com o nível de especialização, que são: Coryphoideae, Calamoideae, Nypoideae, Ceroxyloideae, Arecoideae e Phytelephantoideae.

3.3. Aspectos da frutificação das palmeiras

Para cada espécie vegetal, a época da produção de flores e frutos pode variar conforme o ano, a região e as condições climáticas. O comportamento dos indivíduos dentro de cada espécie, em relação à padronização na época e na duração da produção faz com que algumas espécies apresentem sincronia. Entretanto, existem espécies, que apresentam padrões diferentes de produção de flores e frutos, na mesma área de ocorrência natural, demonstrando assincronia (JANZEN, 1967; LIMA JUNIOR e ALENCAR, 1992; PIÑA-RODRIGUES e PIRATELLI, 1993; PIRES-O'BRIEN, 1995).

As espécies que florescem e frutificam anualmente são chamadas de anuais, e as que apresentam intervalos entre os anos de produção são chamadas supra-anuais. Nos trópicos, o

tipo de periodicidade para algumas espécies é provocado principalmente pelo esgotamento de nutrientes, uma vez que, sendo a produção de flores e frutos intensa em um mesmo ano, determina uma redução do crescimento vegetativo nesse ano, diminuindo a possibilidade de produção no ano seguinte (FECHNER, 1979; LIMA JUNIOR e ALENCAR, 1992; KAGEYAMA e PIÑA-RODRIGUES e PIRATELLI, 1993; PIRES-O'BRIEN e O'BRIEN 1995).

O fruto é considerado como a estrutura que contém a semente e sua origem inicia-se através da modificação que ocorre durante o desenvolvimento do gineceu de uma flor (FLORES-VINDAS, 1999b) podendo ainda ser definido como o ovário amadurecido e algumas outras estruturas agregadas que amadurecem junto como o mesmo (HARRIS e HARRIS, 1997).

Os estudos de Murray (1973) contribuíram de forma marcante para o entendimento da formação do endocarpo dos frutos de palmeiras, classificando-as em três tipos: o primeiro é o mais simples derivado unicamente da epiderme locular, observado em palmeiras dos principais grupos, na época classificadas como Pseudophoenicoid, Chamaedoreoid e Caryotoid (MOORE, 1973) que atualmente correspondem às tribos Cylospatheae, Hyophorbeae e Caryoteae (UHL e DRANSFIEL, 1987), respectivamente. O segundo tipo se diferencia da porção interna do fruto no início do desenvolvimento e não envolve a epiderme locular; este tipo foi observado por (MURRAY, 1973) somente no fruto das palmeiras Coryphoid atual tribo Coryphea. O terceiro tipo, e o mais complexo, é a epiderme locular esclerificada, uma camada interna de feixes vasculares e o parênquima intermediário entre estas duas faixas de tecido. Este tipo de endocarpo foi atribuído para as palmeiras Arecoid atual tribo Areceae e Cocosoid atual Cocoeae. Este estudo, até o momento, é a mais completa referência acerca da origem e desenvolvimento do endocarpo, cujas características servem para separar os principais grupos de palmeiras

3.4. Morfologia dos frutos

Robertson (1976 e 1977) estudou a morfologia e desenvolvimento do fruto e semente de *Jubeopsis caffra* (Cocoeae sem espinho), onde a formação do endocarpo confirmou o tipo mais complexo descrito por Murray (1973) para uma palmeira Cocoeae, cujo endurecimento do espesso endocarpo se dá pela lignificação do parênquima intermediário, no sentido basípeto, indicando quando o fruto está, aproximadamente, com $\frac{3}{4}$ do tamanho máximo.

Mendonça (1996) realizou estudos sobre a caracterização morfológica de várias espécies nativas e cultivadas no Amazonas. Trabalhos semelhantes são os de Mendonça e Araújo *et al.* (2000), que caracterizam o fruto e a semente de *Attalea maripa*, e Menezes (2000) que detalha um pouco mais o fruto, semente, germinação e plântulas. Benarrós (2002) detectou em *Oneocarpus bacaba* (Arecaceae – Euterpeinae) o mesmo tipo complexo de endocarpo, observado por Murray (1973) para as subtribos Areceae e Cocoeae. Fernandes (2002) observou em *Mauritia flexuosa* (tribo Lepidocaryeae não exemplificada em Murray, 1973) que o endocarpo no fruto imaturo é estruturalmente carnoso, constituindo a maior parte do fruto, entretanto à medida que a semente cresce vai comprimindo-o até que, no fruto maduro, torna-se praticamente imperceptível com a estrutura de um tecido esponjoso e delgado.

De acordo com Válio (1979), o desenvolvimento do fruto pode ser investigado, acompanhando-se um ou mais parâmetros (diâmetro, volume, peso fresco, peso seco, etc.) de amostras colhidas em diferentes estágios de maturação. Em alguns casos, pode-se medir o diâmetro do mesmo fruto sem destacá-lo da planta durante toda a fase de crescimento. Nos três momentos do desenvolvimento das drupas, os vários componentes do fruto (paredes e sementes) não se desenvolvem simultaneamente. No primeiro momento, o pericarpo e a semente aumentam de volume e massa, atingindo praticamente o tamanho máximo; o embrião pouco se desenvolve durante este período. No segundo momento, o crescimento total da drupa

tende a ser muito reduzido, iniciando-se um rápido endurecimento do endocarpo. O que mais se desenvolve neste momento é o embrião que, dependendo da espécie, pode atingir seu tamanho máximo. Considera ainda este autor que, o terceiro momento corresponde ao amadurecimento pleno do fruto que promove, na polpa, um aumento do volume celular e nos espaços intercelulares.

3.5. Caracterização botânica de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae)

Esta espécie apresenta crescimento monopodial, arborescente, estipe ereto e solitário, e monóico (CAVALCANTE, 1991). Com altura de 8 a 25 m (HENDERSON, 1995; LORENZI, *et al.*, 1996 e 2004). O estipe tem diâmetro de 12 a 40 cm, guarnecido com espinhos negros, finos, longos e pungentes, dispostos em anéis que se adensam na metade superior do estipe. Apresenta folhas do tipo pinadas, ascendentes, com bainha, pecíolo e raque cobertos por espinhos longos e achatados de cor negra ou castanha de até 10 cm de comprimento; bainha e pecíolo com 1,8 a 3,7 m de comprimento; raque com 1,4 a 6,4 m de comprimento; pinas lineares, em número de 73 a 130 de cada lado da raque, irregularmente arranjadas em grupos de dois a cinco pinas, dispostas em diferentes planos, as da porção mediana da folha de 1,0 a 1,4 m de comprimento de quatro a seis cm de largura (LEITÃO, 2008). As inflorescências interfoliares são ramificadas e eretas; pedúnculo com 0,3 a 0,7 m de comprimento; bráctea peduncular, de 1,2 a 2,2 m de comprimento, inserida próximo ao ápice do pedúnculo, densamente espinhosa na face inferior com espinhos negros ou castanhos (LORENZI *et al.*, 2004).

Cada inflorescência apresenta em média 432 ráquias com flores unissexuais. As flores femininas são maiores e ocorrem em menor quantidade, cerca de 500 a 1.200 flores pistiladas situadas na parte basal dos ramos da espádice, sempre ladeadas por duas masculinas e possuem três pétalas aderidas ao estigma. Já as masculinas, são actinomorfas e

displostêmones, maiores, acontecem em maior quantidade, cerca de 190.000 a 260.000 flores estaminadas, ocupando o restante de cada ramo. Ambas são de coloração bege e do tipo cálice (BACELAR-LIMA *et al.*, 2006). A antese das flores femininas é vespertina, ficando viáveis por 24 horas. As masculinas iniciam sua antese após o término das femininas ficando viáveis por apenas 6 horas. O odor é produzido nas pétalas e anteras. Os grãos de pólen são de tamanho grande, medindo 62,7 a 88,0 μm , e a viabilidade polínica é de 95%. Os visitantes mais comuns são os coleópteros (Curculionidae e Nitidulidae) e é uma espécie alogama (FAO, 1987; CAVALCANTE, 1991; BACELAR-LIMA *et al.*, 2003).

Os frutos são drupas variando em sua forma de subglobosos, globosos a ovóides, com medidas bastante variadas, sendo as mais comuns entre 4,5 a 6 cm de comprimento e 3,5 a 4,5 cm de diâmetro; pesam de 60 a 80 g e apresentam cálice e corola persistentes; o epicarpo liso e duro possui coloração verde-amarelada e mede 1,0 a 1,5 mm de espessura; o mesocarpo apresenta coloração amarelo-alaranjada, compacto, firme, fibroso, e oleaginoso de 7,0 a 8,0 mm de espessura e endocarpo pétreo, negro, consistente e lenhoso, medindo 2,0 a 5,0 mm de espessura e apresenta três poros, dispostos como vértices de um triângulo, sendo que apenas num destes acontecerá a emergência da plântula; em geral ocorre uma semente por fruto, mas pode apresentar duas (FAO, 1987; KAHN e MILLÁN, 1992; CAVALCANTE, 1991; MENDONÇA, 1996; MIRANDA *et al.*, 2001). As sementes globulares, oblongas e raramente elipsóides, medem cerca de 4,0 cm de diâmetro e pesam 22 a 53 g; o tegumento fino possui coloração pardo-castanha; o embrião é sólido e mede aproximadamente 4,0 mm de comprimento e 2,0 mm de diâmetro, é reto, cilíndrico e apresenta duas regiões: a proximal equivale ao limbo cotiledonar e se transformará em haustório, durante o processo germinativo, para absorver os nutrientes do endosperma e nutrir a plântula em formação; e a região distal, que corresponde ao pecíolo cotiledonar. Durante a germinação, esta estrutura sofre modificações, ocorrendo um alongamento e emitindo o botão embrionário. O embrião,

nesta região, apresenta uma fenda em vista frontal, por onde irá ocorrer a protusão plantular (MENDONÇA, 1996).

O padrão de dispersão primária da espécie consiste na chuva de sementes, geralmente concentrada no raio de projeção da copa (3,5 m). A dispersão secundária é feita por cutias (*Dasyprocta* sp.) roedor de médio porte, que depositam sementes nas proximidades das plantas, em distâncias inferiores a 15 m (BACELAR e PESSONI, 2000). Raramente são encontrados plantios comerciais. A ocorrência em fazendas, sítios e quintais, está geralmente associada à dispersão natural e à dispersão involuntária feita pelo homem e, ainda, à manutenção de plantas jovens e adultas, mesmo em áreas destinadas a pastagens.

3.6. Dormência

Embora o tucumã seja aparentemente pouco exigente quanto à fertilidade do solo e não apresente grandes problemas fitossanitários, o seu plantio na própria região amazônica é inexpressivo. Dentre os fatores que contribuem para essa situação estão, provavelmente, a dificuldade na germinação das sementes, que em condições naturais, o tempo de germinação pode chegar a 730 dias (SÁ, 1984) ou mesmo 1044 dias (KOEBERNICK, 1971).

A dormência das sementes de tucumã deve estar relacionada, em parte, ao endocarpo pétreo que as envolve. Segundo Popinigis (1977), a cobertura protetora (tegumento, endocarpo ou pericarpo) das sementes de algumas espécies pode impedir o crescimento do embrião e a subsequente emergência da plântula, sendo por isso recomendado a abertura e remoção completa dessa cobertura, visando acelerar o processo germinativo, como em *Attalea geraensis*, *A. phalerata*, *Butia archeri*, *B. capitata* (LORENZI, 1996) e *Jubaea chilensis* (LAMBREGHTS, 1996). Outro procedimento é a imersão em água por 1 a 7 dias, com a troca diária da água (MEEROW, 2001), que é indicado para as sementes de *Copernicia alba* e *Elaeis oleifera* (LORENZI, 1996). Estudos recentes têm demonstrado que é possível reduzir

para três a quatro meses, o período de germinação das sementes de *A. aculeatum* (FERREIRA e GENTIL, 2006), e pesquisas mostram que a posição da semente influencia na emergência das plântulas de tucumã, sendo que aquelas semeadas com o eixo embrionário na posição de 90° apresentaram melhor desempenho (ELIAS *et al.*, 2007).

3.7. Importância econômica

A importância econômica da palmeira de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) baseia-se principalmente na exploração da polpa de seus frutos que pode ser consumida ao natural ou na forma de sorvetes, suco, licor e doce. Os frutos inteiros ou a polpa em forma de lâminas são comercializados nas feiras, mercados, supermercados, padarias e nas principais ruas do centro de Manaus – AM. A polpa do fruto é consumida ao natural, usada na elaboração de vinhos, produção de sorvetes, cremes e patês, e ainda como recheio de sanduíche e em tapioca, produtos estes, muitos apreciados nos “cafés regionais” (PICANÇO, 1997; KAHN e MOUSSA, 1999; MIRANDA *et al.*, 2001; FERREIRA e GENTIL, 2002). Deste modo, a comercialização dos frutos, da polpa e de seus derivados representa uma significativa e crescente no âmbito regional (FERREIRA e GENTIL, 2002).

A polpa dos frutos de tucumã apresenta um alto valor nutritivo, principalmente devido ao seu alto teor em lipídios e carboidratos. É uma importante fonte regional de carotenóides que pode ser usada como alternativa contra a hipovitaminose A (AMBRÓSIO *et al.* 2006). De acordo com Marinho e Castro (2007) o tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) é uma fonte excepcional de carotenóides com atividades de pró-vitamina A, apresentando β -caroteno (92, o $\mu\text{g/g}$), α -caroteno (2,5 $\mu\text{g/g}$), γ -caroteno (2,1 $\mu\text{g/g}$). Para estas autoras, 100g de sua polpa pode contribuir com aproximadamente 153,4% das necessidades diárias de vitamina A (1000 $\mu\text{g RE}$) para um homem adulto.

Os frutos do tucumã possuem grande potencial como matéria-prima para o desenvolvimento tecnológico de produtos com notáveis características organolépticas, como por exemplo: bebidas alcoólicas, geléias, néctares, sucos, sorvetes, iogurtes e outros, tornando-os interessantes para o emprego industrial e conseqüentemente, promissores para a exploração racional da fruticultura amazônica. Além disso, a utilização desses frutos poderá criar oportunidades econômicas e gerar empregos no Pólo da Agroindústria de Manaus.

3.8. Cultura de tecidos vegetais

A Cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grande aplicação na agricultura. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecidos vivos, chamados de explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter nova planta idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquela do ancestral comum (TORRES *et al.*, 2000).

A cultura de tecidos vegetais é feita de um explante que é todo segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*. Pode ser um fragmento de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* (TORRES *et al.*, 2000). Essa regeneração é fundamental na capacidade de proliferação das células vegetais organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas (KERBAUY, 1997; MANTELL *et al.*, 1994). Essa capacidade é denominada totipotência e considera que as células vegetais manifestam, em momentos diferentes e sob estímulo apropriado, a potencialidade de iniciar no indivíduo multicelular (TORRES *et al.*, 2000). Teoricamente, considera-se que todas as células vegetais são capazes de expressar sua totipotência. No entanto, os explantes são uma mistura de

células em variados estados: fisiológico, bioquímico e de desenvolvimento. Nesse sentido, espera-se que a exposição desses explantes a um ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, fazendo com que somente algumas células desse explante respondam às condições de cultura *in vitro*, levando à célula ou um grupo de células a responder a um estímulo indutivo visando a um processo de desenvolvimento que é denominado de competência (TORRES *et al.*, 2000).

3.9. Reguladores de crescimento

Segundo Kend e Zeevaart (1997), sem a adição dos reguladores de crescimento ao meio de cultura, não seria possível o controle quase absoluto do crescimento e desenvolvimento das plantas em cultura de tecidos vegetais, pois são estes componentes que direcionam o metabolismo do explante *in vitro* para o processo desejado.

O conhecimento destas substâncias é importante, pois todas as plantas possuem, naturalmente, em sua composição algumas destas substâncias químicas cuja função é regular os processos metabólicos envolvidos no crescimento e desenvolvimento. Essas substâncias são ativas em concentrações muito baixas nos tecidos e são conhecidas como hormônios ou substâncias de crescimento. Através deste conhecimento, desenvolveram-se as substâncias sintéticas, denominadas reguladores de crescimento ou fitoreguladores que, uma vez aplicadas a plantas inteiras ou a segmentos de tecidos vegetais, provocam atividades fisiológicas similares aos hormônios (KEND e ZEEVAART, 1997).

Os principais grupos de hormônios vegetais e reguladores de crescimento são: auxinas; citocininas; giberilinas; etileno; ácido abscísico. Sendo que as auxinas e citocininas são os hormônios mais importantes para regulação do crescimento e da morfogênese de tecidos e órgãos. Em cada uma dessas classes, foram desenvolvidos reguladores sintéticos com uma atividade biológica similar ou superior àquela dos hormônios. Os efeitos dos

reguladores de crescimento geralmente variam quanto às respostas das células, tecidos e órgãos *in vitro*, de acordo com as condições culturais, o tipo de explante e o genótipo da planta.

Na cultura de tecidos vegetais a presença de reguladores de crescimento (exógenos e sintéticos) no meio de cultura é muito importante, mas o crescimento e a morfogênese *in vitro* são regulados pela interação e balanço entre os reguladores de crescimento fornecidos na atmosfera e os hormônios produzidos internamente. Além de exercerem um efeito direto sobre os mecanismos celulares, muitos reguladores sintéticos podem modificar o nível de substâncias de crescimento produzidas internamente, de um modo que muitas vezes se torna hereditário por vários subcultivos.

As auxinas são substâncias capazes de iniciar a divisão celular e estão envolvidas na origem de meristemas, promovendo crescimento tanto ao tecido desorganizado como para órgãos definidos. A auxina natural (AIA) foi o primeiro hormônio vegetal identificado, em 1928.

As auxinas são muito usadas em micropropagação e são incorporadas ao meio de cultura para promover a formação e crescimento de calo e de suspensão de células ou órgãos, bem como para regular a morfogênese, especialmente associadas com citocininas. O tipo e a concentração de auxinas a ser adicionada ao meio de cultura irão depender do tipo de crescimento ou desenvolvimento requerido, dos níveis naturais de auxinas no interior do explante quando este é preparado, da capacidade dos tecidos cultivados de sintetizar auxina naturalmente e da interação, se houver, entre a auxina sintética aplicada e as substâncias endógenas naturais.

As auxinas sintéticas mais comumente usadas na cultura de tecidos vegetais são: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxi acético), AIB (ácido indolútrico) e ANA (ácido naftaleno-acético).

3.10. Cultura de Embriões

No início do século, Hanning (1904) publicou um trabalho que representa um marco para o estudo da fisiologia do desenvolvimento do embrião (Raghavan, 1976). Utilizando meios de cultura contendo sais minerais, açúcares e aminoácidos, Hanning foi capaz de cultivar embriões isolados de *Raphanus* e *Cochlearia*. Desde então, a técnica de cultura de embriões tem-se expandido e dado importantes contribuições em estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento do embrião, em programas de melhoramento genético, pela recuperação de híbridos de interesse de cruzamentos incompatíveis, bem como para a quebra de dormência de sementes, observada em algumas espécies (FERREIRA *et al.*, 1990).

A cultura de embrião pode ser utilizada para a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis, na superação da dormência e esterilidade de sementes e em estudos de fisiologia da embriogênese. Esta tecnologia pode, por exemplo, ser o único meio de obter-se descendentes de um cruzamento entre duas plantas que produzem frutos que amadurecem muito precocemente. Neste caso, o embrião não consegue amadurecer perfeitamente, impossibilitando a sua germinação na geração seguinte. Através da cultura de tecidos, os embriões colhidos ainda bastante imaturos, são colocados *in vitro*, permitindo que os mesmos alcancem seu amadurecimento fisiológico, os quais então podem gerar uma nova planta.

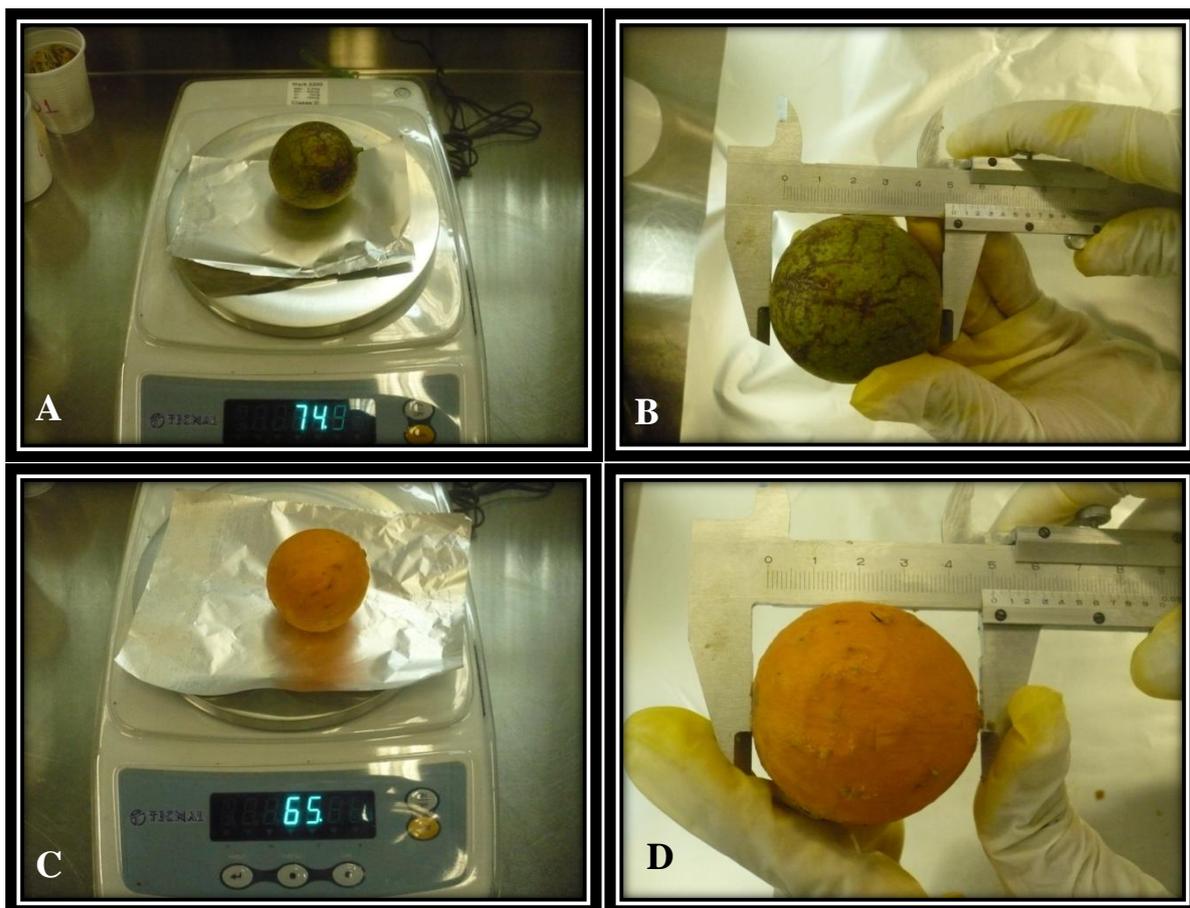
Diversos fatores podem afetar a eficiência e o sucesso da cultura de embriões. Porém, as condições gerais foram testadas e determinadas por vários pesquisadores, em trabalhos clássicos, desde o início do século. À medida que o embrião zigótico se desenvolve ocorrem mudanças progressivas nas suas exigências nutricionais, passando de heterotrófico para autotrófico. A distinção entre estas duas fases se baseia na dependência do embrião pelas substâncias nutritivas armazenadas no endosperma. Inicialmente, o zigoto e o embrião, nas fases subsequentes à fecundação, tem pouca capacidade de síntese e se utilizam das reservas nutricionais, fitohormônios e outros metabólitos essenciais presentes no endosperma e células

acessórias do saco embrionário. Ainda no estágio globular o embrião continua sendo heterotrófico. Somente a partir do estágio cordiforme final, com início do desenvolvimento dos cotilédones, é que o embrião começa a se tornar independente e autotrófico (RAGHAVAN, 1976).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de material

Os frutos maduros de *Astrocaryum aculeatum* foram coletados de plantas matrizes, em áreas de produtores rurais, localizados nos Municípios de Barreirinha, Nova Olinda do Norte e Rio Preto da Eva, no Estado do Amazonas, seguindo critérios de produção e aspecto fitossanitários, e encaminhados ao LCTV-CBA para a análise biométrica dos frutos com mostra a Figura 01. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Coordenação de Produtos Naturais (CPN) do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).



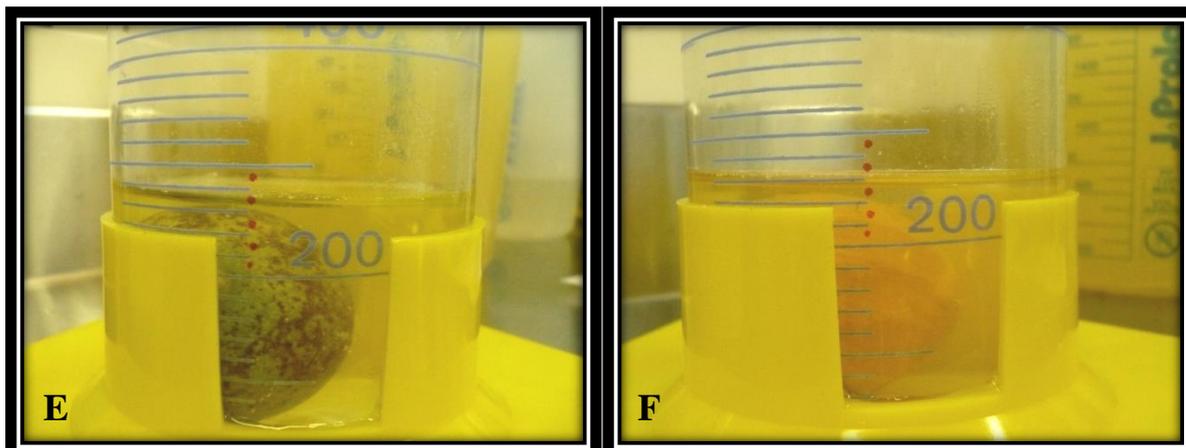


Figura 01 – Análise biométrica de frutos de *Astrocaryum aculeatum*: A) Peso do fruto inteiro; B) medidas do fruto inteiro; C) Peso do fruto sem o exocarpo; D) Medidas do fruto sem o exocarpo; E) volume do fruto inteiro; F) Volume do fruto sem o exocarpo.

4.2. Extração das sementes e resgate dos embriões

Após a retirada da polpa, os pirênios foram lavados em água corrente com o auxílio de uma esponja com detergente neutro e colocados sobre uma bancada para secar durante 20 dias, sob temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, tempo esse necessário para soltar o endosperma do endocarpo. Em seguida, foi realizada a quebra do endocarpo, com o uso de uma morsa, para retirada do endosperma. Esse material foi lavado com água destilada esterilizada, em autoclave e, deixados hidratando por 12 horas. Em seguida, com o auxílio de um formão, foi retirada uma porção do endosperma contendo o embrião (Figura 02).





Figura 02 – Procedimentos de pré assepsia dos explantes: A) Processo de retirada da casca e polpa; B) secagem dos pirênios; C) Quebra do endocarpo; D) Detalhe da quebra do endocarpo; E) Retirada do endosperma; F) Endosperma; G) Cortes para retirada da porção contendo o embrião; H) Corções de endosperma contendo os embriões em fase de hidratação.

Após a etapa de hidratação, as porções de endosperma contendo os embriões foram levadas à câmara de fluxo laminar e mergulhadas em solução de álcool 70% por aproximadamente três minutos, lavados em água destilada e autoclavada, posteriormente

imersos em hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo e água destilada autoclavada, na proporção de 1:1 por aproximadamente 15 minutos. Após o tratamento asséptico, as porções de endosperma contendo o embrião foram lavadas com água destilada estéril por três vezes como mostra a Figura 03.



Figura 03 – Assepsia dos explantes em câmara de fluxo laminar: A) Assepsia, em álcool 70%, das porções de endosperma contendo os embriões; B) Retirada do álcool 70% com o auxílio de uma peneira; C) Lavagem das porções de endosperma contendo os embriões; D) Assepsia com solução de hipoclorito de sódio; E) Tríplice lavagem; F) Porções de endosperma contendo os embriões prontos para inoculação.

4.3. Inoculação dos explantes

O processo de inoculação dos explantes foi realizado em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. Os embriões zigóticos foram extraídos e inoculados em tubos de ensaio de 50 ml, contendo 10 mL de meio de cultura (Figura 04).





Figura 04 – Processo de inoculação dos embriões de *Astrocaryum aculeatum*; A) Sala de fluxo laminar; B) Visão geral da câmara de fluxo laminar; C) Corte do endosperma para retirada do embrião; D) Retirada do embrião; E) Embrião inoculado em tubo de ensaio com auxílio de uma pinça; F) Embrião inoculado; G) Transporte dos tubos de ensaio para a sala de crescimento; G) Tubos de ensaios com embriões inoculados depositados em câmara de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.).

4.4. Efeito de antioxidantes na germinação *in vitro*.

Os embriões zigóticos extraídos foram inoculados individualmente em tubos de ensaio de 50 mL contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e meio Y³ (EEUWENS, 1976), os quais têm composições diferentes de acordo com o Tabela 01, ambos suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 600 mg.L⁻¹ de antibiótico (Cefotaxima sódica) com três diferentes antioxidantes e o controle em ambos os meios de cultura, de acordo com as seguintes concentrações: Carvão ativado (CA): (500, 1000, 2000 mg.L⁻¹); Ácido ascórbico (AA): (50, 100, 150 mg.L⁻¹); Polivinilpirrolidona (PVP): (200, 400, 600 mg.L⁻¹).

O pH do meio foi ajustado em $5,8 \pm 0,1$ e solidificado com 1,8 g.L⁻¹ de phytigel antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. O experimento foi fatorial 2 x 3 x 4 em delineamento inteiramente casualizado com três repetições e 10 embriões por repetição. Os dados coletados foram porcentagem de germinação e oxidação. Após a inoculação, os embriões permaneceram em câmara B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio) no escuro por 30 dias, em temperatura de 25 ± 1 °C. A avaliação dos embriões quanto ao nível de germinação, oxidação e contaminação destes foi realizada aos 30 dias. Após este período, os embriões

foram transferidos para novos meios de cultura, com as mesmas composições e mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $30,0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas por 120 dias para o completo desenvolvimento.

Sais de MS (Murashige, T. & Skoog, F., 1962)		Sais de Y ³ (Eeuwens, 1976)		
Solução estoque	Sal	Solução estoque	Sal	
A	NH ₄ NO ₃ Nitrato de Amônia	I	NH ₄ NO ₃ Nitrato de Amônia	
B	KNO ₃ Nitrato de Potássio	II	KNO ₃ Nitrato de Potássio	
C	MgSO ₄ .7H ₂ O Sulfato de Magnésio	III	CaCl ₂ .2H ₂ O Cloreto de Cálcio	
	MnSO ₄ .4H ₂ O Sulfato de Manganês	IV	MgSO ₄ .7H ₂ O Sulfato de Magnésio	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O Sulfato de Zinco		KH ₂ PO ₄ Fosfato de Potássio	
	CuSO ₄ .5H ₂ O Sulfato de Cobre	V	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O Ac. Etilenodiaminotetraacético	
CoCl ₂ .6H ₂ O Cloreto de Cobalto	FeSO ₄ .7H ₂ O Sulfato Ferroso			
D	CaCl ₂ .2H ₂ O Cloreto de Cálcio	VI	H ₃ BO ₃ Ácido Bórico	
E	H ₃ BO ₃ Ácido Bórico		MnSO ₄ .4H ₂ O Sulfato de Manganês	
	KH ₂ PO ₄ Fosfato de Potássio		ZnSO ₄ .7H ₂ O Sulfato de Zinco	
	KI Iodeto de Potássio		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O Molibdato de Sódio	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O Molibdato de Sódio		CoCl ₂ .6H ₂ O Cloreto de Cobalto	
F	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O Ac. Etilenodiaminotetraacético		CuSO ₄ .5H ₂ O Sulfato de Cobre	
	FeSO ₄ .7H ₂ O Sulfato Ferroso		C ₆ H ₁₁ O ₆ Mio - Inositol	
G	C ₂₁ H ₁₈ C ₁₂ N ₄ OS.H ₂ O Tiamina		C ₂₁ H ₁₈ C ₁₂ N ₄ OS.H ₂ O Tiamina	
H	C ₆ H ₁₁ O ₆ Mio - Inositol		VII	C ₆ H ₁₁ NO ₃ Piridoxina
I	C ₆ H ₁₁ NO ₃ Piridoxina			C ₆ H ₅ NO ₂ Ác. Nicotínico
J	C ₆ H ₅ NO ₂ Ác. Nicotínico	Ác. Pantotênico		
K	Glicina	Biotina		
		Glicina		

Tabela 01 - Composição dos Sais de MS (Murashige, T. & Skoog, F., 1962) e sais de Y³ (Eeuwens, 1976).

4.5. Alongamento dos explantes de *Astrocaryum aculeatum in vitro*

Os embriões com 30 dias de inoculação, já germinados, foram transferidos para os meios de cultura semi sólidos MS e Y³, acrescido do regulador de crescimento nas concentrações de 0,0 mg.L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹ de ácido indolilacético (AIA), contendo 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e 1,8 g/L de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8, antes da inclusão do phytigel. O meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaios de 50 mL, os quais receberam 10 mL de meio e, em seguida foram esterilizados em autoclave com pressão de 1,3 atm. e temperatura de 120° C, por 20 minutos. Os experimentos foram conduzidos num fatorial 2 x 2 em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e 10 plântulas por repetição. Os mesmos permaneceram em sala de crescimento com temperatura ajustada em 25 ± 1°C, intensidade luminosa de 30,0 μmols.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas por período de 60 dias, o dado avaliado foi altura das plântulas.

4.6. Enraizamento das plântulas de *Astrocaryum aculeatum in vitro*

O material vegetal utilizado no experimento foi constituído de plântulas não enraizadas dos experimentos anteriores, provenientes do material vegetal já em fase final de alongamento no LCTV-CBA. O meio de cultura utilizado foi MS, com as concentrações dos sais e vitaminas reduzidas à 1/3 e 1,8 g.L⁻¹ de phytigel, acrescido das concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 mg.L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8, antes da inclusão do phytigel. O meio foi distribuído em tubos de ensaios de 50 mL, os quais receberam 10 mL de meio de , em seguida foram esterilizados em autoclave com pressão de 1,3 atm. e temperatura de 120 °C, por 20 minutos. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e 10 plântulas por repetição. Os dados analisados foram a porcentagem de plântulas enraizadas e número de raiz por planta, os

mesmos ficaram em sala de crescimento com temperatura ajustada em $25 \pm 1^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $30,0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas por 30 dias.

4.7. Aclimatização de plântulas de *Astrocaryum aculeatum*

Foram utilizadas mudas de *Astrocaryum aculeatum* Meyer Arecaceae, propagadas por cultura de embrião que estavam em meio MS sem reguladores de crescimento. A figura 05 mostra as mudas selecionadas por altura (média de 9,25 cm), as quais foram lavadas para retirada do excesso de meio de cultura e plantadas em tubetes de 120 cm^3 , contendo os substratos e mantidas em casa de vegetação com nebulização intermitente. Os substratos utilizados foram areia, fibra de coco GOLDEN MIX da AMAFIBRA que é um substrato formulado a partir de 100% Fibra de Coco, de textura fina, indicado principalmente para formação de mudas em bandejas e tubetes, Vivatto® é um substrato para plantas que possui características e propriedades físico-químicas balanceadas e adequadas para um excelente desenvolvimento das mudas, combinação fibra de coco x areia, fibra de coco x Vivatto®, areia x Vivatto® e areia x fibra de coco x Vivatto®, todos nas mesmas proporções.

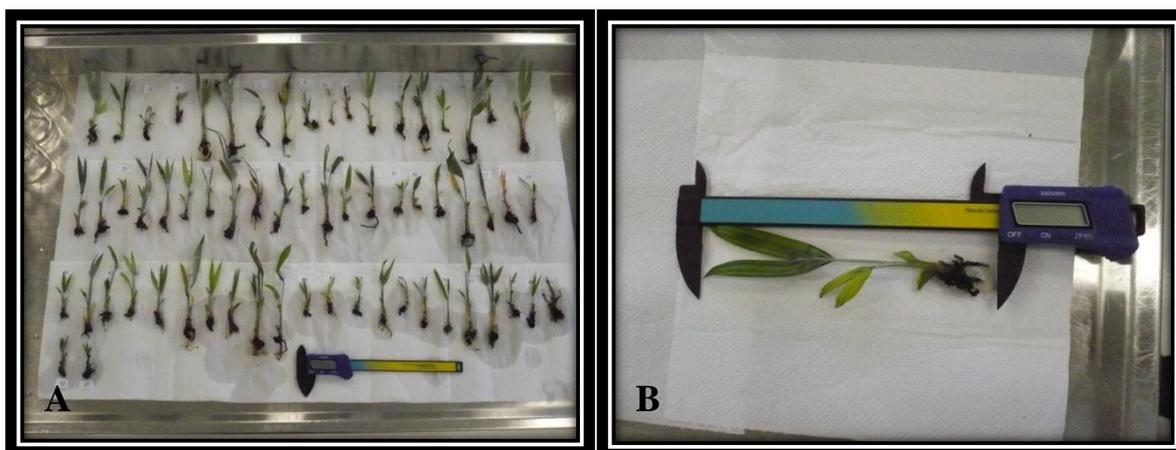


Figura 05 – Processo de seleção de mudas para aclimatização: A) Vista geral; B) Plântula selecionada para aclimatização.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos, 3 repetições e 5 plantas por parcela (15 plantas por tratamento), totalizando 105 plantas. As avaliações foram feitas 60 dias após o plantio das mudas, quantificando-se os seguintes dados: altura da planta e número de folhas.

4.8. Análise Estatística

O efeito de diferentes antioxidantes sobre a germinação e o desenvolvimento da planta quanto ao percentual de oxidação, contaminação e germinação, taxa de alongamento das plantas foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de significância 5%. Estas análises foram efetuadas utilizando-se o Graph Pad In Stat, versão 3,01. Na análise das porcentagens de enraizamento, será usado o teste de diferença entre porcentagens ao nível de 5% de significância utilizando-se o Software Statistica for Windows TM, versão 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito de antioxidantes na germinação *in vitro*.

Pode-se observar que houve diferença significativa nas taxas de germinação e oxidação em todos os antioxidantes testados, nos meios de cultura, ao passo que a germinação dos embriões de tucumã *in vitro* em meio MS, apresentou índice médio de 84,00%, resultado superior ao obtido utilizando o meio Y³, que apresentou 58,67% de germinação. O resumo das análises de variância obtido para oxidação, contaminação e germinação dos embriões de *Astrocaryum aculeatum* encontra-se na Tabela 02.

Tratamentos (mg.L ⁻¹)	Germinação (%)		Oxidação (%)		Contaminação (%)	
	MS	Y ³	MS	Y ³	MS	Y ³
Controle	86,67	66,67	0,00	20,00	13,33	13,33
AA (50)	80,00	33,33	13,33	60,00	6,67	6,67
AA (100)	93,33	40,00	0,00	46,67	6,67	13,33
AA (150)	86,67	66,67	13,33	6,67	0,00	26,67
CV (500)	86,67	93,33	0,00	0,00	13,33	6,67
CV (1000)	80,00	60,00	13,33	40,00	6,67	0,00
CV (2000)	86,67	80,00	0,00	20,00	13,33	0,00
PVP (200)	73,33	66,67	6,67	33,33	20,00	0,00
PVP (400)	80,00	53,33	13,33	26,67	6,67	20,00
PVP (600)	86,67	26,67	6,67	73,33	6,67	0,00
Média	84,00	58,67	6,67	32,67	9,33	8,67

Tabela 02 – Índices de germinação, oxidação e contaminação de embriões maduros de *Astrocaryum aculeatum*, após 60 dias de inoculação, em meio MS e Y³ com diferentes concentrações de antioxidantes.

O meio MS (controle) e o suplementado com 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, foram os que levaram às maiores taxas de germinação, com índices de 86,67 e 93,33% de germinação, respectivamente. Ambos os resultados foram significativamente superiores à taxa de 73,33% alcançada com 200 mg.L⁻¹ de PVP que levou ao índice mais abaixo (Gráfico 01). Já entre os meios de cultura Y³ testados, o que apresentou o melhor resultado foi o meio suplementado

com 500 mg.L⁻¹ carvão ativado com índice de 93,33% de germinação, significativamente superior aos 26,67% alcançado com a utilização do meio Y³ acrescido de 600 mg.L⁻¹ de PVP.

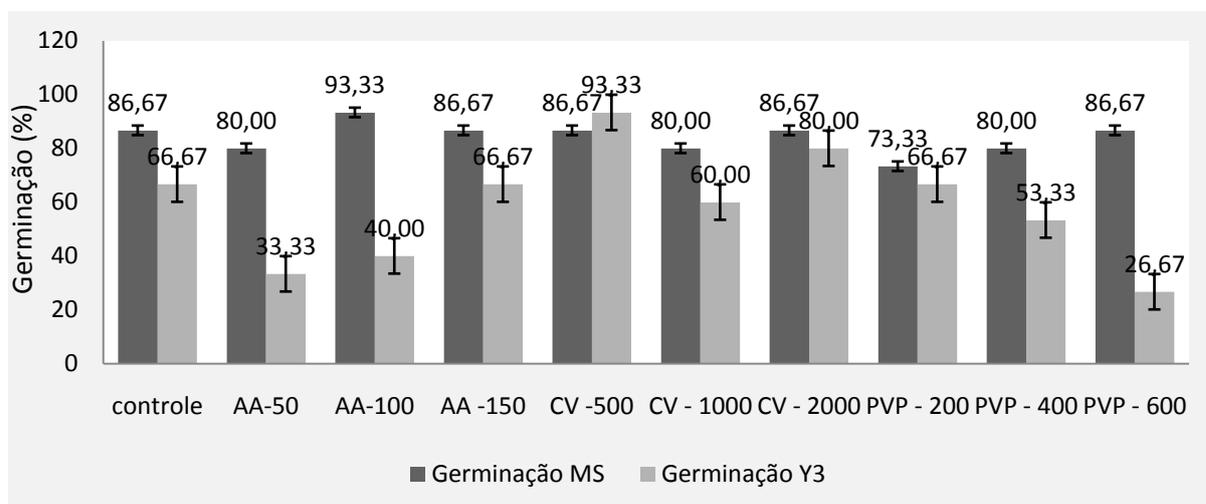


Gráfico 01 – Germinação de embriões maduros de tucumã *in vitro* em função de diferentes antioxidantes.

*Concentração em mg.L⁻¹.

Estes resultados mostram que é desnecessário o uso de antioxidantes para o meio MS, pois o índice de oxidação do MS controle foi nulo, combinado com o segundo índice de germinação (Gráfico 02). Já para o meio Y³ recomenda-se o uso de carvão ativado na dosagem de 500 mg.L⁻¹ pois não apresentou oxidação e uma germinação de 93,33%, bem superior ao Y³ controle com uma oxidação de 20,00%, e germinação de 66,67%. Com esses dados fica evidenciada a importância dos antioxidantes no controle da oxidação no embrião de tucumã, pois o meio Y³ controle apresentou alto índice de oxidação. Juntamente com o ácido ascórbico na dosagem de 50 mg.L⁻¹ (60,00% de oxidação) e o PVP na dosagem de 600 mg.L⁻¹ (73,33%), o antibiótico utilizado promoveu a síntese de compostos fenólicos e os níveis mais elevados foram detectados no tratamento com meio Y³, apresentando maior percentual de oxidação como mostra a Tabela 2.

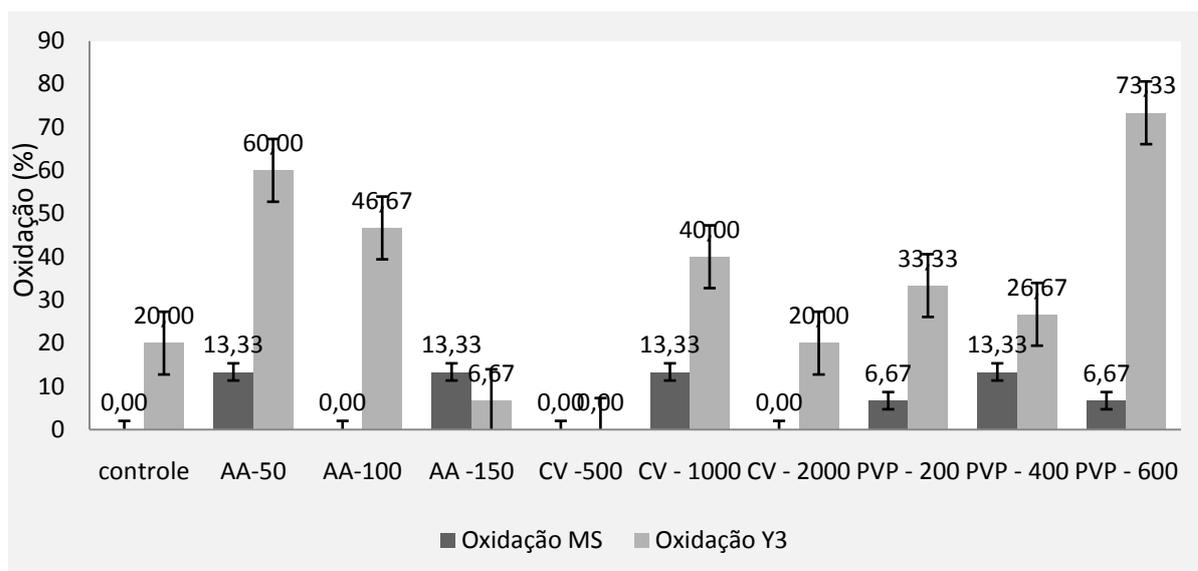


Gráfico 02 – Oxidação de embriões maduros de tucumã *in vitro* em função de diferentes antioxidantes. *Concentração em mg.L⁻¹.

Os antioxidantes químicos notadamente utilizados em diversos protocolos são: carvão ativado, ácido ascórbico e PVP (GEORGE, 1996). Para as palmáceas, o mais utilizado no início dos trabalhos com a cultura de tecidos foi o carvão ativado em diferentes concentrações de até 2% (DE GUZMAN E MANUEL, 1975; TISSERAT, 1979; PARANJOTHY e OTHAMAN, 1982; ASHUBURNER *et al.*, 1995). No entanto, mediante pesquisas efetuadas utilizando ácido ascórbico e PVP, acrescido ao meio, verificaram-se excelentes resultados no controle da oxidação em palmeiras usando-se o ácido ascórbico, e resultados não muito promissores para o uso do PVP (TISSERAT, 1979; GEORGE, 1996).

Estes resultados foram superiores aos obtidos por Nazário e Ferreira (2010) em sistema de embebição de sementes, com emergência de 32%, em média, para sementes embebidas em relação às sementes da testemunha (21%). Também são superiores aos 73,00% de emergência verificados por Ferreira *et al.*, (2010) com sementes de tucumã embebidas e semeadas em serragem com sombreamento de 50%. Em outro trabalho Ferreira e Gentil (2006), tanto para as sementes embebidas quanto para as não embebidas, os valores de germinação, 70% e 58%, respectivamente. Os resultados deste experimento são semelhante aos resultados obtidos por Ramos (2008), o qual obteve uma germinação entre 60,00% e

85,00%. Vale salientar que no presente trabalho o critério de controle de umidade da semente foi extremamente rigoroso, assim como no experimento realizado por Ramos (2008). Nesse processo as sementes antes da excisão dos embriões, passaram por um período de secagem em sala com sistema de ar condicionado, com temperatura ajustada em 25° C, por 20 dias. Provavelmente esse fator (tempo de secagem da semente) influenciou de forma positiva para a germinação média de 84,0% em meio MS. Resultado bem superior ao obtido no primeiro experimento, o qual o período de secagem foi mais longo: (30 dias).

5.2. Alongamento de plântulas de tucumã *in vitro*

Foram avaliadas 160 plântulas desenvolvidas em meio MS, Y³ e acrescidos do regulador de crescimento ácido indolilacético, com relação a altura, após período de 60 dias. A análise de variância demonstrou que o meio MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIA, respondeu melhor em relação aos demais tratamentos utilizados (Gráfico 03). O mesmo apresentou incremento médio de 6,18 cm de altura das plantas, ou seja, significativamente superior aos incrementos apresentados pelo meio Y³ suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIA (3,53 cm de altura), também superior aos resultados obtidos pelo MS e Y³ sem regulador de crescimento, com incremento médio de 2,5 e 2,55 cm de altura, respectivamente, como mostra a Figura 06.

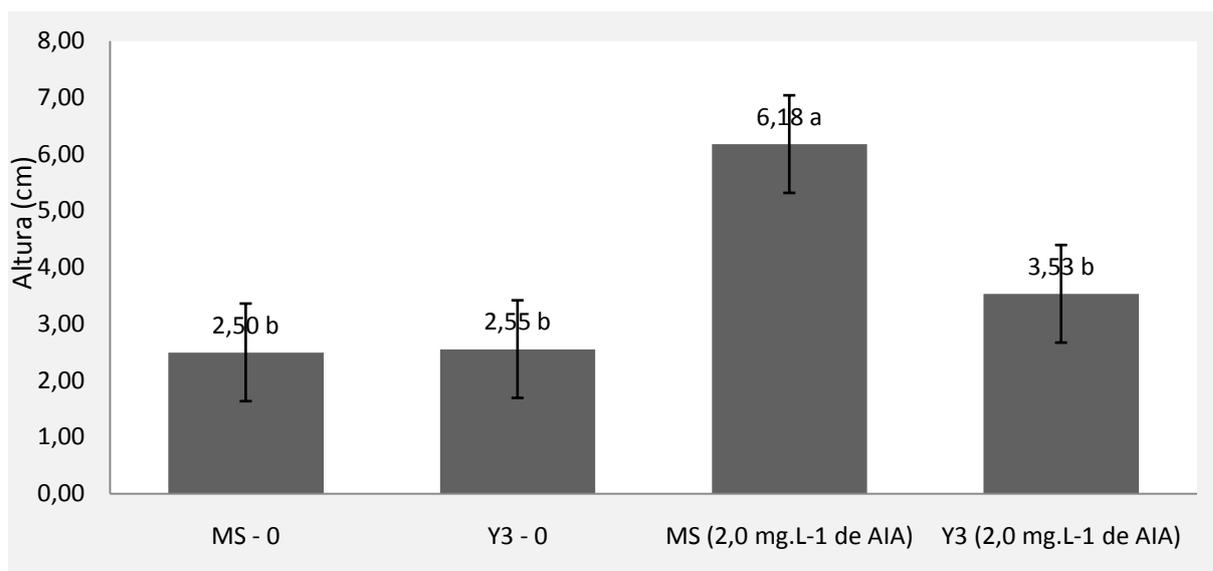


Gráfico 03 – Incremento em altura (cm) de plântulas de tucumã *in vitro* em função da concentração de AIA.

Hu e Ferreira (1998) relatam que embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este, podem germinar e crescer num meio inorgânico, e os reguladores de crescimento tornam-se dispensáveis. Todos os explantes obtiveram percentual de diferenciação de 100% da parte aérea, indiferentemente do meio de cultura utilizado com ou sem o meio acrescido de AIA. Já o percentual o formação de raiz primária não foi significativo. Dificuldades no enraizamento das plântulas de coqueiro foram observadas desde o início do desenvolvimento da técnica (REYNOLDS, 1982). Em experimento *in vitro* conduzido com embrião de *Zizania aquatica* L., também foi observado que o crescimento em cultura foi caracterizado pelo desenvolvimento precoce da parte aérea e crescimento mínimo da raiz primária (CROCKER e BARTON, 1957). A necessidade de uma fase de enraizamento com ANA para plântulas de tucumã cultivados *in vitro* foi confirmada neste estudo, o que concorda com os dados de Melo (2000) para plântulas da guarirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.), as quais plântulas não formaram raiz fasciculada na ausência de reguladores de crescimento.

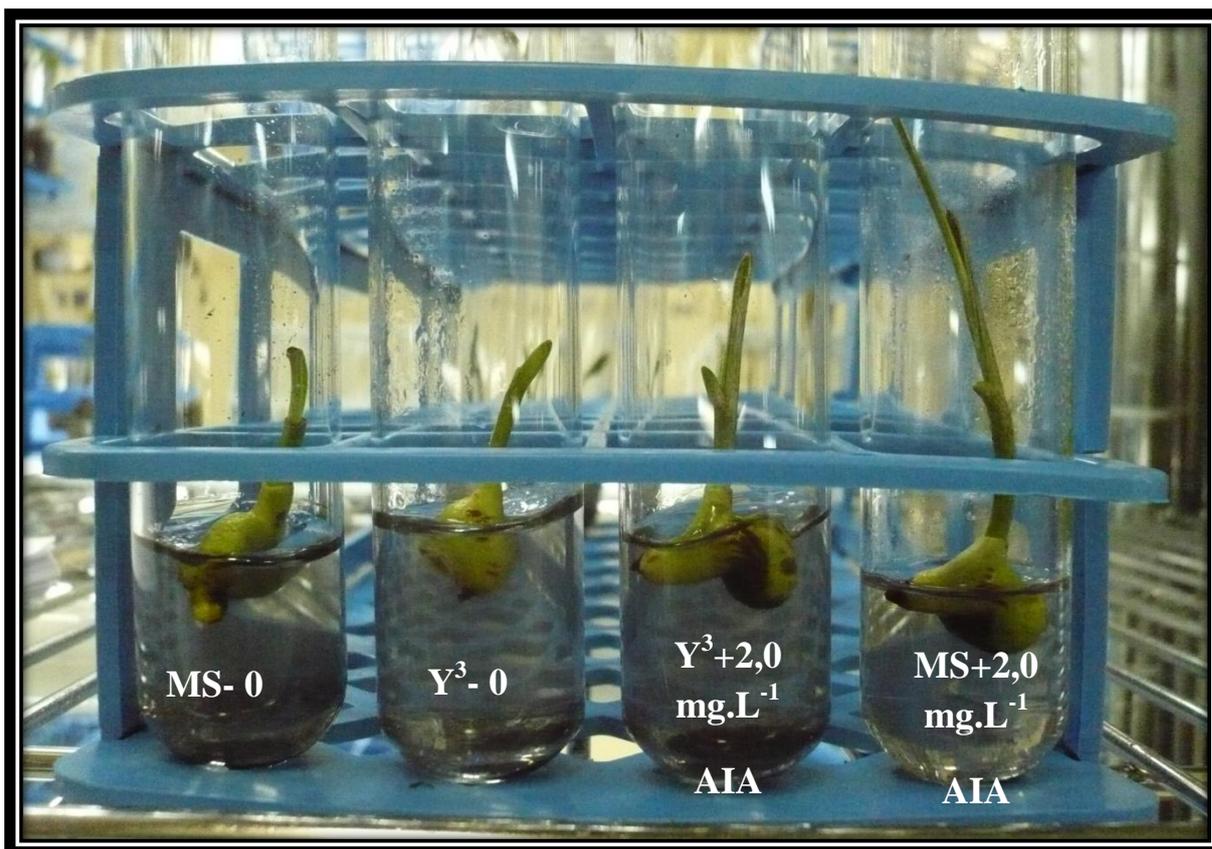


Figura 06 – Incremento em altura de plântulas de tucumã *in vitro* em função da concentração de AIA, após 60 dias.

5.3. Enraizamento de plântulas de tucumã *in vitro*

A análise de variância demonstrou que para as variáveis: (percentual de plântulas enraizadas e número de raiz por planta), o meio MS com as vitaminas reduzidas 1/3, suplementado com 5,0 mg.L⁻¹ de ANA, respondeu melhor em relação aos demais tratamentos utilizados (Gráfico 04). O mesmo apresentou percentual de plantas enraizadas de 82,5%, estatisticamente semelhante aos 75% obtidos como o meio suplementado com 10,0 mg.L⁻¹ de ANA. Ambos superiores estatisticamente aos 25% de enraizamento alcançado com meio MS e 57,5% do meio MS suplementado com 2,5 mg.L⁻¹ de ANA, evidenciado na Figura 07.

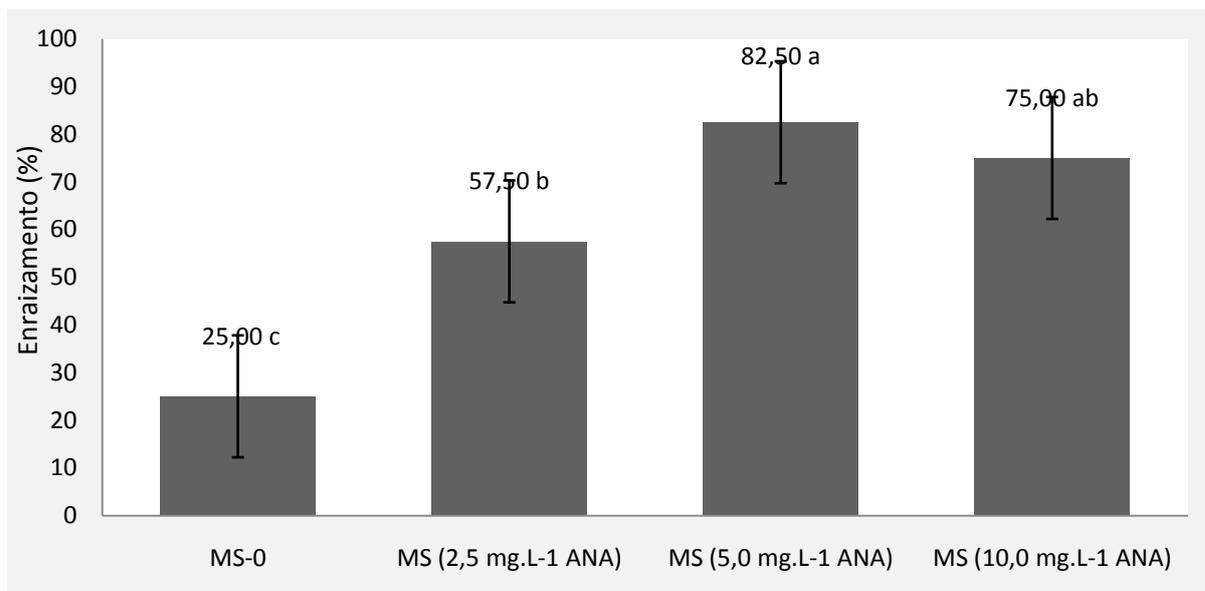


Gráfico 04 – Percentual de plântulas de tucumã enraizadas *in vitro*, em função da concentração de ANA.

Quanto à variável número de raiz, a análise de variância demonstrou que o meio MS suplementado com 10,0 mg.L⁻¹ de ANA, apresentou o melhor resultado, com índice médio de 9,08 raízes por planta, estatisticamente superior aos demais tratamentos, como mostra o Gráfico 05.

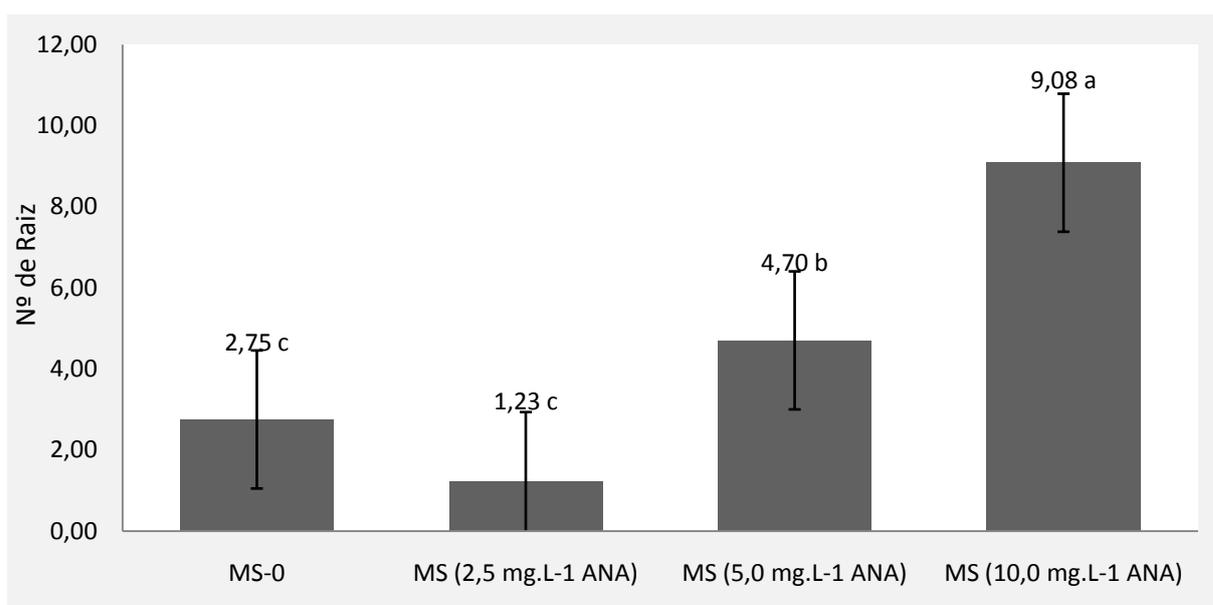


Gráfico 05 – Número médio de raízes por plântulas de tucumã *in vitro*, em função da concentração de ANA.

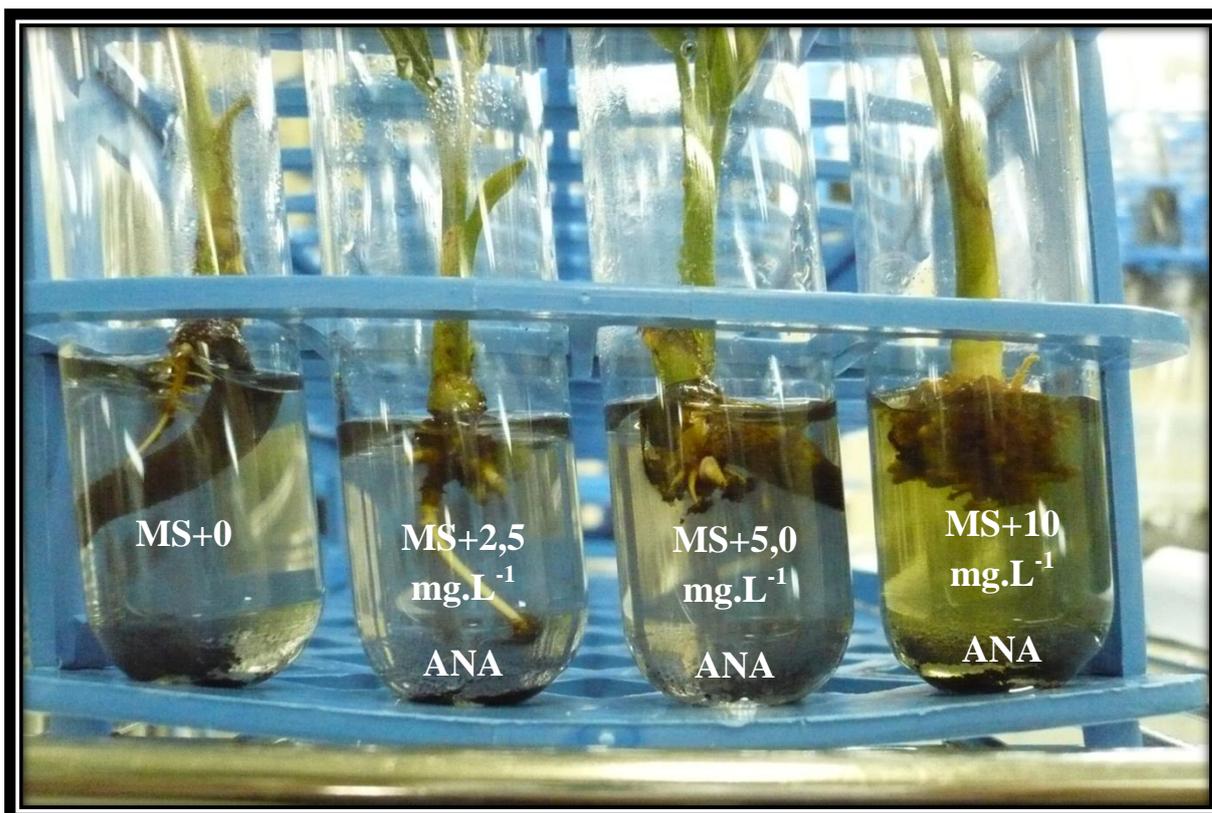


Figura 07- Enraizamento de plântulas de tucumã *in vitro* em função da concentração de ANA, após 30 dias.

Os resultados obtidos no presente trabalho são superiores aos resultados que Santana e Teixeira (2004) obtiveram em processo de enraizamento de plântulas de *Cocos nucifera*. O trabalho dos mesmos, após 30 dias de cultivo dos explantes em meio de cultura Y^3 suplementados com $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, apresentou índice médio de 5,67 raízes por planta. Assim como no trabalho de Costa e Aloufa (2007), com tamareira, onde a emissão da radícula só foi observada aos 60 dias no tratamento sem fitorreguladores e nas combinações $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA + 10 mg.L^{-1} de BAP e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA + 20 mg.L^{-1} de BAP. Não houve a formação de raízes secundárias em nenhum dos tratamentos. Apenas as plântulas do meio controle apresentavam raiz primária normal, sendo todas as dos demais tratamentos, atrofiadas ou, em alguns casos, inexistentes, caracterizando plântulas anormais.

Esta dificuldade é um problema que compromete a cultura do embrião zigótico de palmeiras e a sobrevivência das plântulas na fase de aclimatização, porque as plântulas podem

desenvolver um deficiente sistema radicular ou mesmo nenhuma raiz (VERDEIL *et al.*, 1997). A necessidade de uma fase de enraizamento com ANA para plântulas de *Astrocaryum aculeatum* cultivados *in vitro* foi confirmada neste estudo, o que concorda com os dados de Melo (2000) para plântulas da guarirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.), as quais plântulas não formaram raiz fasciculada na ausência de reguladores de crescimento. A utilização de ANA na concentração de 0.1 mg.L^{-1} no meio de cultura foi necessária para promover o enraizamento adequado dessa palmeira, uma concentração bem inferior à necessária para enraizamento de plântulas de tucumã.

5.4. Aclimatização de plântulas de *Astrocaryum aculeatum* propagadas *in vitro*

Na fase de aclimatização, não houve diferença significativa entre os substratos avaliados, quanto à porcentagem de sobrevivência aos 60 dias, após a transferência das plântulas para casa de vegetação. A areia lavada combinada com fibra de coco e Vivato® proporcionou maior sobrevivência (55,56%) de plântulas regeneradas em condições de casa de vegetação (Gráfico 06). Resultado este próximo aos obtidos por Léo *et al.* (2007) que utilizou areia lavada combinada com pó de casca de coco seco que proporcionou sobrevivência de 58,33% na aclimatização de plântulas de coco. Estes resultados foram bem superiores aos obtidos por Samosir *et al.* (1998), que alcançaram apenas 30% de sobrevivência de plântulas de coqueiro regeneradas *in vitro*. Em estudo comparativo de três protocolos de cultura de embriões de coqueiro, Capote *et al.* (2002) observou baixa sobrevivência de plântulas em areia esterilizada, que foi de 5,25 a 31,4%.

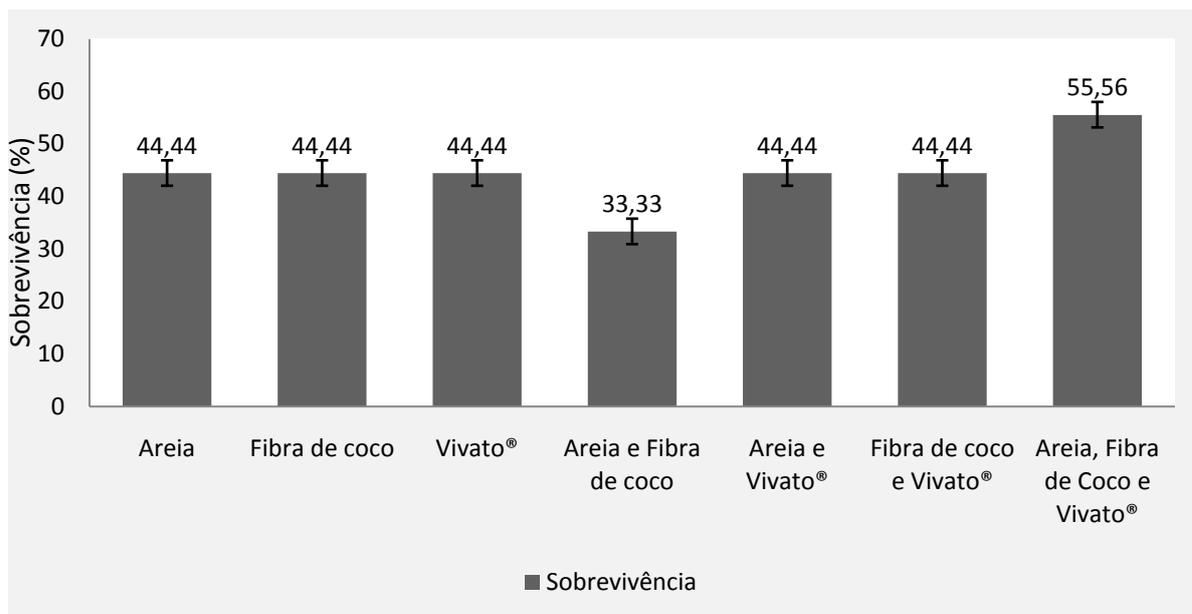


Gráfico 6 – Percentual de sobrevivência de *Astrocaryum aculeatum* no processo de aclimatização.

Quanto ao incremento da parte aérea das plântulas, o substrato comercial Vivatto® levou ao índice médio de 10,25 cm, não se diferenciando estatisticamente em relação à areia, da combinação de fibra de coco com Vivatto® na proporção de 1:1 e da combinação de areia, fibra de coco e Vivatto® nas mesmas proporções, com índices médios de 9,25; 7,25 e 8,25 cm, respectivamente. Os resultados apresentados mostraram-se estatisticamente superiores aos demais tratamentos, como mostra o Gráfico 07.

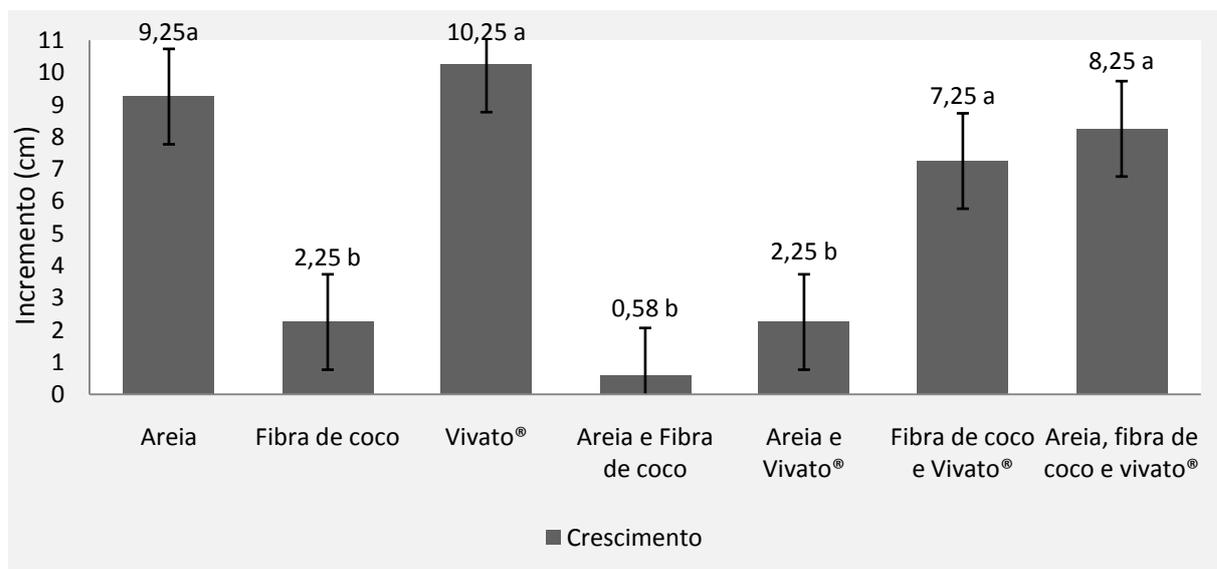


Gráfico 7 – Incremento em altura de plântulas de *Astrocaryum aculeatum*, após 60 dias, em processo de aclimatização.

Pode-se observar que para variável avaliada, número de folhas novas, o substrato Vivatto® mostrou-se mais eficiente que os demais tratamentos utilizados (Gráfico 08). O mesmo apresentou incremento médio de 05 novas folhas por plantas, ou seja, significativamente superior aos incrementos apresentados pelo substrato areia combinado com fibra de coco, também superior aos resultados obtidos pela combinação de fibra de coco e Vivatto®, com incremento médio de 02 novas folhas como mostra a Figura 08. A superioridade do substrato Vivatto® é, provavelmente, devido à adubação de arranque contida neste substrato ter influenciado no desenvolvimento da parte aérea, uma vez que as folhas tiveram mais suprimento para seu desenvolvimento, o que não foi fornecido nos outros substratos, como a areia e fibra de coco que são considerados substratos inertes, ou seja, com níveis nutricionais não significativos.

Novos trabalhos devem ser realizados no sentido de avaliar a viabilidade econômica da utilização de substratos e adubação, pois no presente trabalho a areia, que é um substrato inerte, também levou a um bom desenvolvimento da parte aérea.

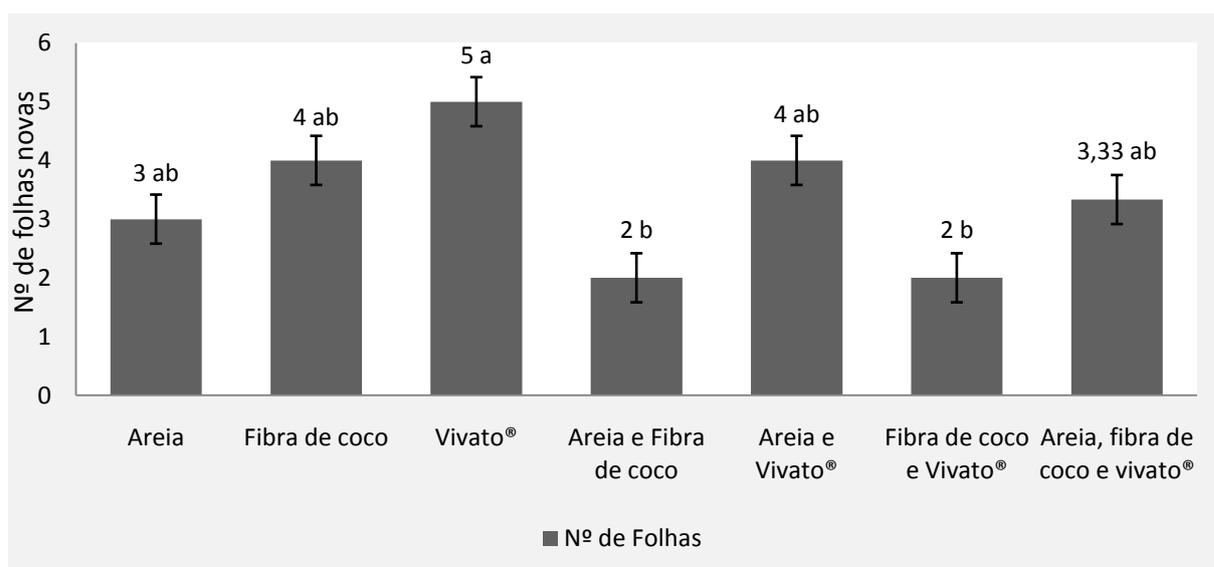


Gráfico 8 – Incremento em número de folhas de plântulas de *Astrocaryum aculeatum*, após 60 dias, em processo de aclimatização.



Figura 08- Plantas de tucumã aclimatizada em casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente, após 60 dias.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelo presente trabalho permitem concluir que:

1. Na fase de germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de *Astrocaryum aculeatum*, quando utilizado o meio MS, não se faz necessário o uso de antioxidantes. Mas com a utilização do meio Y³, se faz necessário o uso de carvão ativado na concentração de 500 mg.L⁻¹. . Sendo que o meio de cultura comumente usado no cultivo *in vitro* de palmeiras é o Y³, por tanto o resultado deste trabalho foi significativo, pois o meio de cultura MS é também, economicamente mais viável assim reduzindo os custos de produção de mudas *in vitro* de *Astrocaryum aculeatum*.
2. A germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Astrocaryum aculeatum* mostrou-se uma técnica eficiente, acelerando em 90 dias a germinação com um percentual de germinação de até 93,33%.
3. Na fase de alongamento dos explantes, os melhores resultados foram apresentados em meio MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de AIA (com incremento de 6,18 cm);
4. Para a promoção de enraizamento o meio MS suplementado com 10,0 mg.L⁻¹ de ANA, apresentou os melhores resultados em número de raiz por planta (9,0 raízes em média);
5. Na fase de aclimatização, o substrato comercial Vivato®, apresentou o maior incremento em relação à altura da planta (10,25 cm) e, em número de folhas (5,0 folhas).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.S. 2003. Palmeiras da Amazônia oriental: importância paisagística, florística e econômica. In: *Congresso Nacional de Botânica*, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. Anais... p. 218-218.

AMBRÓSIO, C.L.B.; CAMPOS, F.A.C.S.; FARO, P. 2006. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição*, 19(2).

ASHBURNER, G.R.; FAURE, M.G.; TOMLINSON, D.R.; THOMPSON, W.K. 1995. A guide to the zygotic embryo culture of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). Canberra: Aciar, 16p. (ACIAR. Technical report series, 36).

BACELAR, C.G.; PESSONI, L.A. 2000. Estrutura populacional do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) na Estação Ecológica de Maracá, RR. In: Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais, 3, Anais, Manaus, AM. 180-182.

BARCELAR-LIMA, C.G.; MENDONÇA, M.S.; BARBOSA, T.C.T.S. 2006. Morfologia Floral de uma População de Tucumã, *Astrocaryum aculeatum* G. Mey. (Arecaceae) na Amazônia Central. *Acta Amazonica* 36: 407-412.

BENARRÓS, J.F. 2002. *Morfo-anatomia do fruto e semente de Oenocarpus bacaba* Mart. (Arecaceae), ocorrendo na região de Manaus-AM. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 71p.

CAMBION, L. 2001. Palmeiras Cultivadas. Fruticultura irrigada. Disponível em: (www.geocities.com/palmaecultivadas/index.htm). Acesso em 15/07/10.

CAPOTE, M.; CUETO, J.R.; ZAMORA, V.; RÍOS, A.R.; CHACÓN, R. 2002. Increasing the efficiency of the embryo culture technology to promote germplasm collecting in Cuba. In: ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.A.; OLIVER, J. (Ed.). Coconut embryo in vitro culture. Malaysia: IPGRI-APO, v.2. p.138-145.

CAVALCANTE, P.B., 1991. Frutas comestíveis da Amazônia. Museu Paraense Emilio Goeldi. Edições CEJUP. CNPq. Belém.

CORTEZ, M.G.; MENDONÇA, M.S.DE; OLIVEIRA, M.I.B.DE; ARAÚJO, M.G.P.DE; OLIVEIRA, A.B. 2003. Descrição estrutural de uma comunidade de palmeiras de terra firme na Amazônia Central. Disponível em: (www.adaltech.com.br/evento/museugoeldi/resumoshtm). Acesso em: 20/04/10.

COSTA, N. M. S.; ALOUFA, M. A. I. 2007. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v.38, n.3, p.276-279.

CROCKER, W. & L.V. BARTON, 1957. Physiology of seeds: an introduction to the experimental study of seed and germination problems. Waltham, Massachusetts, Chronica Botanica Company 267p.

DE GUZMAN, E. V.; MANUEL, G. C. 1975. Improved root growth in embryo and seedlings cultures of coconut “makapuno” by the incorporation of charcoal in the growth medium. Rome: FAO, 6p.

DOWE, J.L. 1992. Extra-tropical palms: a statistical overview. *The palm enthusiast* 9(3): p.4-8.

EEUWENS, C.J.1978. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera* L.) and date 29 (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 42, p. 73-78.

ELIAS, M.E.A.; FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. Emergência de plântulas de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) em função da posição de semente. *Acta Amazonica*, Manaus, v.36, n.3, p.385-388, 2006.

FAO. - Food and Agriculture Organization 1987. Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos. 3. Ejemplos de America Latina. 44(3). Rome, Italia. 241p.

FECHNER, G.H. 1979. Maturation of blue spruce cones. *Forest Science*, 20(1): 47-50.

FERREIRA, V. L. P., BOVI, M. L. A., CARVALHO, C. R. L. et al. Composição química e curvas de titulação de acidez do palmito pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) de diversas localidades. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, v. 20, p.96-104, 1990.

FERREIRA, S.A.N. 1996. *Maturação fisiológica de sementes de pupunha*. Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. 73 pp.

FERREIRA, E.J.L. 2001. *Anatomical and Phylogenetic Studies of Bactris and Bactridinae (Palmae: Coccoae)*. Tese. PhD Plant Sciences, City University of New York, C. U. NY. 288p.

FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. 2002. Beneficiamento, pré-tratamento e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer – Arecaceae). In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, XVII, Belém, Resumo expandido.

FERREIRA, S.A.N.; GENTIL, D.F.O. 2006. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). Revista Acta Amazonica, Manaus, v.36, n.2, p.141-146.

FERREIRA, S. A. N.; CASTRO, A. F; GENTIL, D. F. O. 2010. Emergência de plântulas de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) em função do pré-tratamento das sementes e da condição de semeadura. Revista Brasileira Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 4, p. 1189-1195.

FLORES-VINDAS, E. 1999b. *La planta. Estructura y funcion*. Vol. II. Cartago: Libro Universitario Regional. 580p.

GENTRY, A. 1982. Patterns of neotropical plant species diversity. *Evol. Biol.* 15: 1-84.

GEORGE, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture: in practice. Edington: Exegetics, 1361p.

GRANVILLE, J.J. 1992. Life forms and growth strategies of Guianan palms as related to their ecology. *Bull. Inst. Fr. Études andines*, 21(2): 533-548.

GUARIM NETO, G. 1994. Riqueza e exploração da flora. In: IBAMA, *Amazônia: uma proposta interdisciplinar de educação ambiental: temas básicos*. Brasília. P.193-223.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. Plant propagation: principles and practices. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

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

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL R. 1995. *Field guid to the palms of the Americas*. Princeton: Princeton University Press.

JANZEN, D.H. 1967. Synchronization of sexual reproduction of trees, during the season in Central America. *Oecologia*, 67: 40-43.

JOHNSON, D.V. 1997. *Non-Wood forest products: tropical palms*. Bangkok: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 165p.

KAGEYAMA, P.Y.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. 1993. Fatores que afetam a produção de sementes. In: *Sementes florestais tropicais*. ABRATES, Brasília. P. 19-46.

KAHN, F.; MILLÁN, B. 1992. *Astrocaryum* (Palmae) in Amazonia: a preliminary treatment. *Bulletin de l'Institut Français*, 21(2):459-531.

KAHN, F. 1990. Clave para diferenciar los géneros de Palmae em la Amazônia a partir del aparato vegetativo. *Bull. Inst. Fr. Etudes andines*, 19(2):351-378.

KAHN, F.; MOUSSA, F. 1999. Economic importance of *Astrocaryum aculeatum* in central Brazilian Amazonia. *Acta Bot. Venez.* 22, 237-245.

KAHN, F. 1997. *Les palmiers de l'Eldorado*. Paris: Editions de l'Orstom.

KEND, H., ZEEVAART, J. A. D. 1997. The five "classical" plant hormones. *The Plant Cell*, 9: p.1197-1210.

KERBAUY, G.B. 1997. Clonagem de plantas *in vitro*. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33.

KOEBERNIK, J. Germination of palm seed. *Principes*, Lawrence, v.15, n.4, p.134-137, 1971.

LÉDO, A. S.; GOMES, K. K. P.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIEIRA, G. S. S.; TUPINAMBÁ, E. A.; ARAGÃO, W. M. 2007. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.42, n.2, p.147-154.

LEITÃO, M.A. 2008. *Caracterização morfológica e físico-química de frutos e sementes de Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae), de uma floresta secundária. Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. 91 pp.

LAMBREGHTS, M. Germinating *Jubaea*. *Chamaerops*, n. 21, Win,1996. Disponível em: <http://www.palmsociety.org/public/english/chamaerops/021_1.shtml>. Acesso em: 18 junho 2010.

LIMA JUNIO, M.J.; ALENCAR, J.C. 1992. Fenologia de duas espécies do gênero *Corythophora* da família *Lecytidaceae* na reserva Florestal Duck, Manaus, AM. In: *Congresso Nacional Sobre Essências Nativas*, Instituto Florestal, São Paulo. *Anais...* p.233-240.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. 2004. *Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas*. Plantarum, Nova Odessa, p.15-16; p. 44.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; MEDEIROS-COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; BHER, N. 1996. *Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas*. Plantarum, Nova Odessa, p.28-42.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. 1994. *Princípios da biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, P. 101-181.

MARINHO, H.A.; CASTRO, J.S. 2007. Carotenóides e Valor de Pró-Vitamina A em Frutos da Região Amazônica: Pajurá, Piquiá, Tucumã e Umari. Disponível em: http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/tecnologia_de_alimentos/301.htm... Acesso em: 16/06/10.

MEEROW, A.W. 2001. Palm seed germination. *IFAS Cooperative extension Bulletin*, 274:1-10.

MELO, B. 2000. Cultivo de embrião in vitro da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras 117p.

MENDONÇA, M.S. 1996. *Aspectos morfológicos das sementes de algumas espécies de palmeiras (Arecaceae= Palmae) da Amazônia*. Tese Professor Titular da universidade Federal do Amazonas. Manaus. 68p.

MENDONÇA, M.S.; ARAUJO, M. G. P. 2000. A semente de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart. – Arecaceae): Aspectos Morfológicos. *Revista Brasileira de Sementes*, 21(1): 122-124.

MIRANDA, I.P. DE A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. 2001. *Frutos e Palmeiras da Amazônia*. MCT/INPA, Manaus. 120p.

MOORE, H.E. 1973. The major groups of palms and their distribution. *Gentes Herb.* 11:27-114.

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

MURRAY, S.G. 1973. The formation of endocarp in palm fruits. *Principes*, 17:91-102.
Picanço, N.S. 1997. *Aproveitamento industrial da polpa de tucumã (Astrocaryum aculeatum G.F.W. Meyer)*. Dissertação de mestrado, Universidade do Amazonas, Manaus. 94p.

NAZÁRIO, P.; FERREIRA, S. A. N. 2010. Emergência de plântulas de *Astrocaryum aculeatum* G. May. em função da temperatura e do período de embebição das sementes. *Acta da amazônica*, vol. 40(1) , p.165 – 170.

ODETOLA, J.A. 1987. Studies on seed dormancy, viability, and germination in ornamental palms. *Principes*, 31(1): 24-30

OLIVEIRA, L.P. 2007. Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos da Amazônia para elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 177p.

PARANJOTHY, K.; OTHAMAN, R. 1982. “*In vitro*” propagation of oil palm. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE, 5., 1982, Tokio. Proceedings... Tokio: Japanese Association For Plant Tissue Culture, p.747-748.

PICANÇO, N.S. 1997. *Aproveitamento industrial da polpa de tucumã (Astrocaryum aculeatum G. F.W. Meyer)*. Dissertação de mestra, Universidade do Amazonas, Manaus. 94p.

PINA-RODRIGUES, F.C.M.; PIRATELLI, A. J. 1993. Aspectos ecológicos da produção de sementes. In: *Sementes florestais tropicais*. ABRATES, Brasília, p. 47-81.

PIRES-O'BRIEN, N.M.J.; O'BRIEN, C. M. 1995. *Ecologica e modelamento de florestas tropicais*. FCAP/ Serviço de documentação e informação, Belém, 400p.

POPINIGIS, F. 1977. *Fisiologia da semente*. Brasília: AGIPLAN. 289p.

RAGHAVAN, V. 1976. *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*. Academic Press, London.

RAMOS, S. L. F. Sistema reprodutivo do tucumazeiro (*Astrocaryum aculeatum* Mayer). 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e ambientais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

REYNOLDS, J.F. 1982. Vegetative propagation of palm trees pp.183-207. *In: Tissue culture in forestry* (Bonga, J.M. & D.J. Durzan, Eds.). The Hague, Martinus Nijhoff Publishers.

ROBERTSON. B.L. 1976. Embryology of *Jubaeopsis caffra* Becc.; I Microsporangium, microsporogenesis and microgametogenesis. *JL. S. Afr. Bot.* 42(2): 97-108.

ROBERTSON. B.L. 1977. Morphology and development of the and seed of *jubaeopsis caffra* Becc. *Principes*, 231: 23-30.

SÁ, S.T.V. 1984. *Superação da dormência de sementes de tucumã (Astrocaryum tucumã Mart.)*. Monografia (Graduação), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 53p.

SAMOSIR, Y.M.S.; GODWIN, I.D.; ADKINS, S.W. 1998. An improved protocol for somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Acta Horticulturae*, v.461, p.467-474.

SANTANA, M.C.; TEIXEIRA, S.L. 2004. Influência do ácido naftalenoacético no crescimento e enraizamento in vitro de plântulas de coqueiro (*Cocos nucifera* L.). *Biologia Geral e Experimental*, v.5, p.30-33.

TISSERAT, B. 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.30, n.19, p.1275-1283.

TORRES, A. C; FERREIRA, A. T.; SÁ F. G.; BUSO J. A.; CALDAS, L. S; NASCIMENTO A. S.; BRIGIDO M. M.; ROMANO E. 2000. *Glossário de biotecnologia vegetal*. Brasília: Embrapa – Hortaliças. 128p.

UHL, N.W.; DRANSFIEL, J. 1987. *Generum Palmarum. A classification of palms based on the work of Harold E. Moore-Jr.* Lawrence, Kansas: Allen Press. 610p.

UHL, N.W.; DRANSFIEL, J. 1999. Genera Palmarum after ten years. *Mem.. New York Bot. Gard.*. 83: 245-253.

VÁLIO, I.F.M. 1979. Frutificação. *In: Ferri, M. G. ; Felipe, G. M.; Metiver, J. R.; Dietrich, S.M.C. Ed. Da Universidade de São Paulo. Fisiologia Vegetal*. Vol. 2. São Paulo. P.313-342.

VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; TRIQUES, K.; LYAKURWA, R.; RIVAL, A.; DURAND-GASSELIN, T.; ENGELMANN, F.; HAMON, S. 1997. State of research on coconut embryo culture and acclimatization techniques in the IDEFOR (Côte d'Ivoire) and ORSTOM/CIRAD laboratories (France). In: BATUGAL, P.A.; ENGELMANN, F. (Ed.). Coconut embryo in vitro culture: Malaysia: IPGRI-APO, v.1. p.1-4.