

Morphoanatomy of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae) embryos

Morfoanatomía de embriones de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Arecaceae)

Maura I. Díaz-Lezcano^{1*}; Rafael M. Navarro-Cerrillo²; Francisco J. Ruíz-Gómez²

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Ingeniería Forestal, Campus de San Lorenzo. Ruta Mariscal López km 10.5. San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad de Córdoba, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Campus de Rabanales. Edificio Leonardo Da Vinci. Córdoba, España.

*Corresponding author: maura.diaz@agr.una.py, tel.: +595 21 585 606.

Abstract

Introduction: The morpho-anatomical study of seeds and their embryos serves to obtain information on germination, storage and viability.

Objective: To describe the morphoanatomy of the embryo of the palm species *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., at the cellular level.

Materials and methods: The embryos were obtained from mature fruits of *A. aculeata*, collected in individuals of a native population near the city of San Lorenzo, Central Department, Paraguay. The morpho-anatomical study was done by means of the fixation, dehydration and inclusion of the embryos in resin blocks and qualitative analysis by means of microscopy.

Results and discussion: The embryo is small, greenish yellow and lanceolate. The cotyledon is located at the proximal end, and the limbus or haustorium in the distal. The embryo has a longitudinal slit or cotyledon window that allows the emergence of the seedling (radicle and plumule). The well-differentiated plumule is positioned at an angle with respect to the longitudinal axis of the embryo, opposite to which is the meristematic zone, where the radicle will develop. The plumule consists of two leaf primordia and one apex, with the outline of a third primordium.

Conclusion: In general, the *A. aculeata* embryo is similar to that of other palms of the same group, in terms of shape and inclusion in the endosperm.

Keywords: Palm, cotyledon window, haustorium, plumule, germination.

Resumen

Introducción: El estudio morfoanatómico de las semillas y sus embriones sirve para obtener información sobre la germinación, almacenamiento y viabilidad.

Objetivo: Describir la morfoanatomía del embrión de la palma *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., a nivel celular.

Materiales y métodos: Los embriones se obtuvieron de frutos maduros de *A. aculeata*, recolectados en individuos de una población nativa, próxima a la ciudad de San Lorenzo, Departamento Central, Paraguay. El estudio morfoanatómico se hizo mediante la fijación, deshidratación e inclusión de los embriones en bloques de resina y análisis cualitativo mediante microscopía.

Resultados y discusión: El embrión es pequeño de color amarillo verdoso y de forma lanceolada. En el extremo proximal se localiza el cotiledón, y en el distal, el limbo o haustorio. El embrión presenta una hendidura longitudinal o ventana cotiledonar que permitirá la emergencia de la plántula (radícula y plúmula). La plúmula, bien diferenciada, está situada en ángulo con respecto al eje longitudinal del embrión; en forma opuesta se encuentra la zona meristemática, donde se desarrollará la radícula. La plúmula consta de dos primordios foliares y un ápice, con el esbozo de un tercer primordio.

Conclusión: En general, el embrión de *A. aculeata* es semejante al de otras palmas del mismo grupo, en cuanto a forma e inclusión en el endosperma.

Palabras clave: Palma, ventana cotiledonar, haustorio, plúmula, germinación.

Introduction

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart., known in Paraguay as *mbokaja*, belongs to the family Arecaceae and is native to tropical forests (Bandeira, 2008). This species is widely distributed throughout the tropical and subtropical regions of the Americas, from southern Mexico and the Antilles, to the southern region, including Brazil, Argentina and Paraguay (Sorol, Hauptenthal, & Reckziegel, 2012). In Paraguay, *A. aculeata* is naturally abundant in the eastern region and in some areas of the Chaco.

The species *A. aculeata* is a heliophilous palm that lives in open areas with high solar radiation. It adapts to sandy soils (60 to 75 % sand) with a low level of water, although it prefers deep and well-drained ones; it can also be found in soils derived from sandstones and basalts. The palm does not grow in low soils of a hydromorphic nature that are heavy and poorly drained (Lorenzi, 2006).

Acrocomia aculeata has a stipe that can range between 10 and 15 m in height and between 20 and 30 cm in diameter. This stem has a covering of dark-colored spines, about 10 cm long (Lorenzi, 2008). The leaves are green, pinnate and alternate, 4 to 5 m long and are arranged in different planes, giving the crown a feather crown appearance. The leaves have approximately 130 leaflets, which are 30 to 60 cm long, 1 to 2 cm wide and glossy green on each side. The underside is light green with thorns in the central region (Lorenzi, 2006).

The inflorescences appear between the leaves; they are spadix-shaped, measure 80 to 130 cm in length, are decurrent and are covered by a bract. When the inflorescence reaches maturity it becomes turgid, with a location perpendicular to the stem. Henderson, Galeano, and Bernal (1995) indicate that the flowers are unisexual, with the female flowers appearing at the base of the inflorescence and male ones at the top.

Regarding fructification, Lorenzi (2008) reports that it occurs throughout the year and that the fruits mature between September and June. The fruit is a globose drupe with a diameter between 2.5 to 5 cm, constituted by a brittle pericarp at maturity and a fibrous, mucilaginous, sugary mesocarp rich in yellow-orange glycerides. The endocarp is strongly attached to the mesocarp; it has a bony structure, is dark in color, has a thickness of approximately 3 mm and contains the edible oily seed (Bandeira, 2008).

The seeds of *A. aculeata* are orthodox and have slow germination and dormancy; they are formed by an

Introducción

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart., conocida en Paraguay como *mbokaja*, pertenece a la familia Arecaceae y es nativa de los bosques tropicales (Bandeira, 2008). Esta especie se distribuye ampliamente a lo largo de América tropical y subtropical, desde el sur de México y las Antillas, hasta la región sur, incluyendo Brasil, Argentina y Paraguay (Sorol, Hauptenthal, & Reckziegel, 2012). En Paraguay, *A. aculeata* es abundante de forma natural en la región oriental y en algunas zonas del Chaco.

La especie *A. aculeata* es una palma heliófila que habita en áreas abiertas con irradiación solar alta, se adapta a suelos arenosos (60 a 75 % arena) con bajo nivel de agua, aunque prefiere los profundos y bien drenados; también puede encontrarse en suelos derivados de areniscas y basalts. La palma no crece en suelos bajos y de naturaleza hidromórfica que sean pesados y mal drenados (Lorenzi, 2006).

Acrocomia aculeata posee un estípote que puede oscilar entre 10 y 15 m de altura y entre 20 y 30 cm de diámetro. Dicho tallo presenta una cobertura de espinas de color oscuro, de cerca de 10 cm de largo (Lorenzi, 2008). Las hojas son verdes, pinnadas y alternas, de 4 a 5 m de longitud y se encuentran ordenadas en diferentes planos, dando a la copa un aspecto de corona de plumas. Las hojas tienen aproximadamente 130 foliolos de 30 a 60 cm de largo y 1 a 2 cm de ancho de color verde lustroso en cada lado. El envés es verde claro y presenta espinas en la región central (Lorenzi, 2006).

Las inflorescencias aparecen entre las hojas; tienen forma de espádice, miden de 80 a 130 cm de longitud, son decurrentes y están recubiertas por una bráctea. Cuando la inflorescencia alcanza la madurez se vuelve túrgida, con ubicación perpendicular al tallo. Henderson, Galeano, y Bernal (1995) indican que las flores son unisexuales, apareciendo las flores femeninas en la base de la inflorescencia y las masculinas en la parte superior.

Respecto a la fructificación, Lorenzi (2008) refiere que ocurre todo el año y que los frutos maduran entre septiembre y junio. El fruto es una drupa globosa con diámetro entre 2.5 a 5 cm, constituida por un pericarpio quebradizo en la madurez y un mesocarpio fibroso, mucilaginoso, azucarado y rico en glicéridos de coloración amarillo-naranja. El endocarpio está fuertemente adherido al mesocarpio; posee una estructura ósea, es de coloración oscura, tiene un espesor de aproximadamente 3 mm y contiene la almendra oleaginosa comestible (Bandeira, 2008).

Las semillas de *A. aculeata* son ortodoxas, de germinación lenta y poseen latencia; están conformadas por un

endosperm where the embryo is immersed, usually at one end. The embryo, conical and small, is rich in nutritive material and is enveloped by a mass of corneal tissue or albumen. Knowledge of the seed's morphology is essential for the analysis of the vegetative cycle and the study of regeneration of the species. From the morpho-anatomical study of the seeds and their embryos, information on germination, storage and viability can also be obtained (Moura et al., 2008).

Oil is obtained from the fruits, both from the drupe and the internal nut, and is used to produce biodiesel. The oil is also consumed by local populations, due to its high nutritional value. In Paraguay, intensive cultivation of *A. aculeata* is being implemented, aimed at covering the demand for oil obtained from its fruits (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2007). According to IICA (2007), oil production reaches up to 4 000 L·ha⁻¹, with higher yield than other oil crops such as avocado (*Persea americana* Mill.), castor bean (*Ricinus communis* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.), peanut (*Arachis hypogaea* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.), tung (*Aleurites fordii* Hemsl.) and soybean (*Glicine max* L.). Paraguay has an estimated 6 million *mbokaja* plants, suggesting an annual production of about 170,000 t of fruit (Souto, 2008). According to Silva (2006), *A. aculeata* can become one of the most important palm oils commercially, given the variety of products derived from the fruits (20 to 30 % oil, 5 % edible flour, 35 % forage and 35 % high calorific value fuel).

In this regard, this paper aims to describe the morphoanatomy of the *A. aculeata* embryo at the cellular level.

Materials and methods

Plant material

The embryos were obtained from mature fruits of *A. aculeata*, harvested between February and March 2014. The fruits were collected in 10 individuals from a native population, near the city of San Lorenzo, Central Department (25° 21' 54.80" S and 57° 30' 8.77" W) in Paraguay. Twenty fruits were collected per bunch from each mother plant, making a total of 100 fruits per individual.

The seeds were mixed and dried at room temperature for 20 days, facilitating the removal of the pericarp. Once removed, the endocarp was broken with the aid of a manual press and the seeds containing the zygotic embryos were obtained. Seeds with symptoms of fungal infections, bacterial infections or insect attacks were removed.

endosperma donde el embrión se encuentra inmerso, por lo general, en un extremo. El embrión, cónico y pequeño, es rico en material nutritivo y está envuelto por una masa de tejido córneo o albumen. El conocimiento de la morfología de la semilla es esencial para el análisis del ciclo vegetativo y el estudio de regeneración de la especie. A partir del estudio morfoanatómico de las semillas y sus embriones se puede obtener información sobre la germinación, almacenamiento y viabilidad (Moura et al., 2008).

De los frutos se obtiene aceite y se produce biodiesel, tanto de la drupa como de la nuez interna. El aceite es consumido por las poblaciones locales, debido al valor alimenticio alto. En Paraguay se están implementando cultivos intensivos de *A. aculeata*, dirigidos a cubrir la demanda de aceite obtenido de sus frutos (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2007). De acuerdo con IICA (2007), la producción de aceite alcanza hasta 4 000 L·ha⁻¹, con rendimiento mayor que otros cultivos aceiteros como el aguacate (*Persea americana* Mill.), ricino (*Ricinus communis* L.), colza (*Brassica napus* L.), maní (*Arachis hipogaea* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), tung (*Aleurites fordii* Hemsl.) y soja (*Glicine max* L.). Se estima que en Paraguay existen alrededor de 6 millones de plantas de *mbokaja*, lo que sugeriría una producción anual de 170 000 t de frutos, aproximadamente (Souto, 2008). Según Silva (2006), *A. aculeata* puede convertirse en uno de los aceites de palma más importante comercialmente, dada la variedad de productos derivados de los frutos (20 a 30 % de aceite, 5 % de harina comestible, 35 % de forraje y 35 % de combustible de alto valor calorífico).

En ese sentido, este trabajo tiene como objetivo describir la morfoanatomía del embrión de *A. aculeata*, a nivel celular.

Materiales y métodos

Material vegetal

Los embriones se obtuvieron de frutos maduros de *A. aculeata*, cosechados entre los meses de febrero y marzo del 2014. Los frutos se recolectaron en 10 individuos de una población nativa, próxima a la ciudad de San Lorenzo, Departamento Central (25° 21' 54.80" S y 57° 30' 8.77" O) en Paraguay. De cada planta madre se colectaron 20 frutos por racimo haciendo un total de 100 frutos por individuo.

Las semillas se mezclaron y se secaron a temperatura ambiente durante 20 días, facilitando la eliminación del pericarpio. Una vez eliminado, se procedió a la ruptura del endocarpio con la ayuda de una prensa manual y se obtuvieron las almendras (semillas) que contienen los embriones cigóticos. Las almendras con síntomas de infecciones fúngicas, bacterianas o con ataques de insectos se eliminaron.

Morpho-anatomical study

Fixation, dehydration and inclusion of embryos in resin blocks

The embryos were carefully extracted from the seeds with a scalpel, for the embedding process in resin blocks. Prior to this process, the samples were fixed for 24 h with a Karnovsky solution (5 % glutaraldehyde and 4 % paraformaldehyde in 0.2 M cacodylate) and preserved with 0.025 M cacodylate. For this, the samples were deposited in 2-mL microcentrifuge tubes containing 1 mL of Karnovsky's solution. Subsequently, the support with the open tubes was placed in a vacuum hood for periods of 1 min, to facilitate the penetration of the fixative. Finally, the tubes were cooled to 4 °C for 4 h and stored at 4 °C under dark conditions (Pérez-de-Luque et al., 2006).

The samples were dehydrated using a series of ethanol/water mixtures (50, 80 and 95 %), for 12 h; subsequently, they were stored at 4 °C under dark conditions. Histresin molds were filled with infiltration solution (dimethyl sulfoxide), hardener (barbituric acid derivative) and paraffin; samples were placed in the position of interest. The resin blocks were removed from the molds and left to dry at room temperature. Two samples were placed in each block, one in a transverse position and the other in a longitudinal position, with the aim of having section cuts of both types.

Once the blocks were removed from the molds, they were trimmed with a blade. Subsequently, 2- μ m-thick cuts were obtained in the section of interest using a LEICA RM2245 microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) with Spikker Specials carbon-tungsten blades.

Microscopy

The slides were placed in a 0.1 % TBO (Toluidine Blue-O) solution for 12 h. The 2- μ m-thick sections were deposited on glass slides which were spread on a polylysine-coated slide (Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) for a better fixation of the plant material to the surface. Each of the sections was rehydrated with deionized water.

The sections were dewaxed with xylene (Pérez-de-Luque et al., 2006) and stained with a 0.05 % TBO solution (Cahill, Bennett, & McComb, 1992) in citrate buffer at pH 5 (Ruzin, 1999). The completely-dried samples were placed on slides with synthetic resin for quick mounting (Entellan®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

The sections were analyzed qualitatively through a NIKON Eclipse 50i optical microscope (Nikon Instruments Inc., Melville-NY, USA), with

Estudio morfoanatómico

Fijación, deshidratación e inclusión de los embriones en bloques de resina

Los embriones se extrajeron cuidadosamente de las semillas con un bisturí, para el proceso de inclusión en bloques de resina. Previo a este proceso, las muestras fueron fijadas durante 24 h con una solución de Karnovsky (glutaraldehído al 5 % y paraformaldehído al 4 % en cacodilato 0.2 M) y conservadas con cacodilato 0.025 M. Para ello, las muestras se depositaron en tubos de microcentrífuga de 2 mL conteniendo 1 mL de solución de Karnovsky. Posteriormente, el soporte con los tubos abiertos se colocó en una campana de vacío durante periodos de 1 min, para facilitar la penetración del fijador. Finalmente, los tubos se enfriaron a 4 °C durante 4 h y se conservaron a 4 °C en condiciones de oscuridad (Pérez-de-Luque et al., 2006).

Las muestras se deshidrataron mediante una serie de etanol/agua: 50, 80 y 95 %, durante 12 h; posteriormente, se conservaron a 4 °C en condiciones de oscuridad. Los moldes de historresina se rellenaron con solución de infiltración (dimetil sulfóxido), endurecedor (derivado de ácido barbitúrico) y parafina; las muestras se colocaron en la posición de interés. Los bloques de resina se extrajeron de los moldes y se dejaron secar a temperatura ambiente. En cada bloque se colocaron dos muestras, una en posición transversal y otra en posición longitudinal, con el objetivo de tener cortes de secciones de ambos tipos.

Una vez extraídos los bloques de los moldes, se procedió al desbastado (*trimming*) con una cuchilla. Posteriormente, se obtuvieron cortes con un grosor de 2 μ m en la sección de interés; estos se realizaron con un micrótopo LEICA RM2245 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) con cuchillas de carbono-tungsteno Spikker Specials.

Microscopía

Los portaobjetos se introdujeron en una solución TBO (Toluidine Blue-O) al 0.1 %, durante 12 h. Las secciones de 2 μ m de espesor se depositaron sobre portaobjetos de vidrio que se extendieron sobre un portaobjetos con recubrimiento de polisina (Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) para una mejor fijación del material vegetal a la superficie. Cada una de las secciones se rehidrataron con agua desionizada.

Las secciones se desparafinaron con xileno (Pérez-de-Luque et al., 2006) y se tiñeron con una solución de TBO (Cahill, Bennett, & McComb, 1992) al 0.05 % en tampón citrato a pH 5 (Ruzin, 1999). Las muestras, secadas completamente, se colocaron sobre portaobjetos con

interchangeable lenses (10x, 20x, 40x, 100x) that provided up to 1,000x magnification. Images of 2 560 x 1 920 pixels, taken with Nikon Instruments Inc. Plan Fluor series lenses, were obtained through a Nikon DS-Fi1 digital optical device (Nikon Instruments Inc., Melville-NY, USA) coupled to the microscope and connected to a computer via the Nikon DS-U2 control unit (Nikon Instruments Inc., Melville-NY, USA).

Results and discussion

Morpho-anatomical characterization of the *A. aculeata* embryo

The *A. aculeata* embryo is small, greenish-yellow with a lanceolate shape. It has a proximal region, located peripherally to the seed, which corresponds to the petiole of the cotyledon, and a distal region, in the form of a protuberance, in the limbus or cotyledon haustorium. The embryo's structure has the general pattern observed in other palm species, with a protuberance and pronounced invaginations of the haustorium. Figure 1 shows the longitudinal section of the *A. aculeata* embryo, in which three regions are distinguished: cotyledon limbus, constriction and cotyledon petiole.

The cotyledon petiole averages 4.5 mm in length and 1.5 mm in diameter; it is formed by an external protodermis, a fundamental meristem and procambial strands. The embryonic axis is inserted into a cavity in the proximal third of the cotyledon petiole and is aligned obliquely to the rest of the embryo. Figure 2 shows the primary meristematic, fundamental meristem and procambium tissues.

In the transversal and longitudinal sections of the embryos, the well-differentiated plumule was observed, situated at an angle with respect to the longitudinal axis of the embryo, opposite to which is the meristematic zone, where the radicle will develop. The plumule consists of two leaf primordia and one apex, with the outline of a third primordium (Figure 3). All these structures are enclosed by the coleoptile.

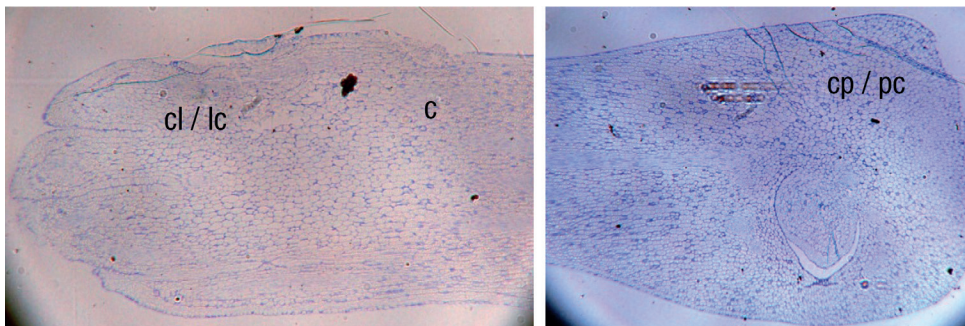


Figure 1. Longitudinal section of the *Acrocomia aculeata* embryo. The cotyledonary limbus (cl), the constriction zone (c) and the cotyledonary petiole (cp) are observed.

Figura 1. Corte longitudinal del embrión de *Acrocomia aculeata*. Se observan el limbo cotiledonar (lc), la zona de constricción (c) y el peciolo cotiledonar (pc).

resina sintética para montaje rápido (Entellan®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Las secciones se analizaron cualitativamente a través de un microscopio óptico NIKON Eclipse 50i (Nikon Instruments Inc., Melville-NY, USA), con objetivos intercambiables (10x, 20x, 40x, 100x) que proporcionaron hasta 1 000 aumentos. Se obtuvieron imágenes de 2 560 x 1 920 píxeles, tomadas con lentes de la serie Plan Fluor de Nikon Instruments Inc., a través de un dispositivo óptico digital Nikon DS-Fi1 (Nikon Instruments Inc., Melville-NY, USA) acoplado al microscopio y conectado a un ordenador mediante la unidad de control Nikon DS-U2 (Nikon Instruments Inc., Melville-NY, USA).

Resultados y discusión

Caracterización morfoanatómica del embrión de *A. aculeata*

El embrión de *A. aculeata* es pequeño de color amarillo verdoso con forma lanceolada. Presenta una región proximal, situada de forma periférica respecto a la semilla, que corresponde al peciolo del cotiledón; y una región distal, en forma de protuberancia, en el limbo o haustorio cotiledonar. La estructura del embrión tiene el patrón general observado en otras especies de palmas, con una protuberancia y las invaginaciones pronunciadas del haustorio. La Figura 1 muestra el corte longitudinal del embrión de *A. aculeata*, en el cual se distinguen tres regiones: limbo cotiledonar, constricción y peciolo cotiledonar.

El peciolo cotiledonar tiene longitud promedio de 4.5 mm y diámetro de 1.5 mm; está formado por una protodermis externa, un meristema fundamental y haces procambiales. El eje embrionario se inserta en una cavidad en el tercio proximal del peciolo cotiledonar y está alineado de forma oblicua respecto al resto del embrión. En la Figura 2 se observan los tejidos meristemático primario, meristema fundamental y procambium.

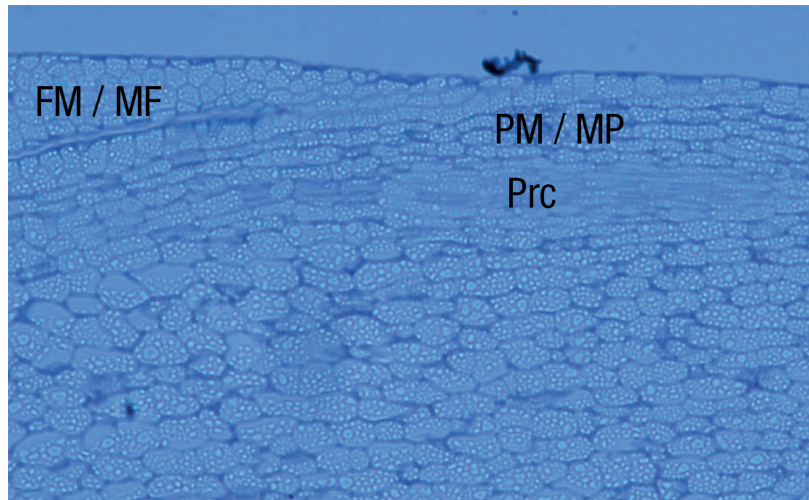


Figure 2. Primary meristematic (PM), fundamental meristem (FM) and procambium (Prc) tissues in the longitudinal section of the *Acrocomia aculeata* embryo.

Figura 2. Tejidos meristemático primario (MP), meristemo fundamental (MF) y procambium (Prc) en el corte longitudinal del embrión de *Acrocomia aculeata*.

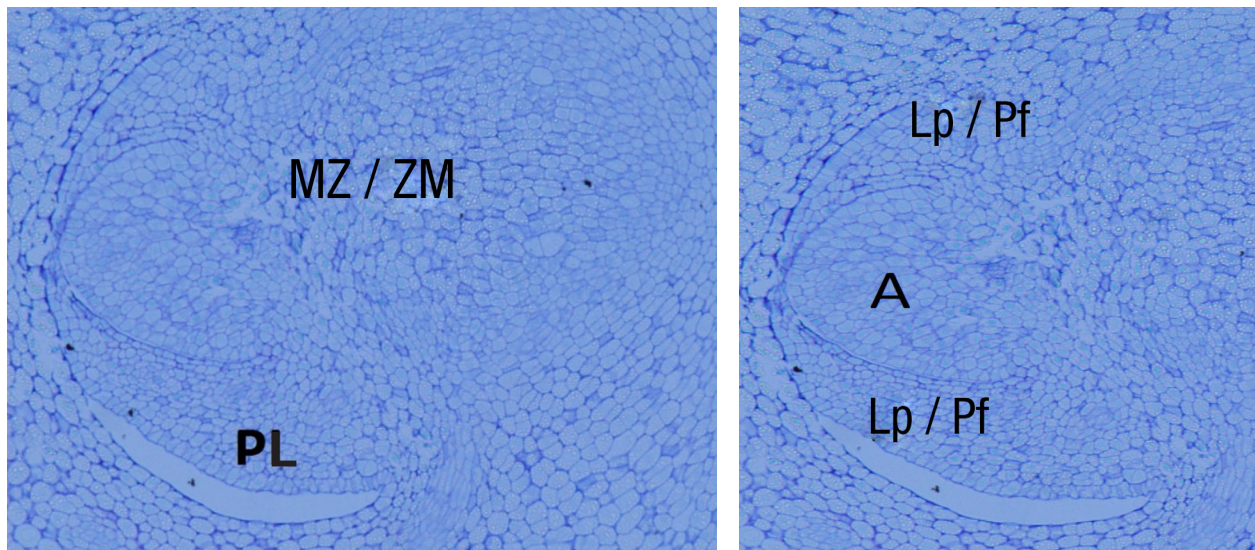


Figure 3. Longitudinal section of an *Acrocomia aculeata* embryo, where the plumule (PL) and the radical meristematic zone (MZ) are observed. Inside the plumule are the apex (A) and the leaf primordia (Lp).

Figura 3. Corte longitudinal de un embrión de *Acrocomia aculeata*, donde se observan la plúmula (PL) y zona meristemática radical (ZM). Dentro de la plúmula se encuentran el ápice (A) y los primordios foliares (Pf).

Externally, the embryo has a longitudinal slit or cotyledonary window, at the level of the seedling; the layer of protodermal cells covering said window continues with that of the coleoptile. Figure 4 shows the cross-section of an embryo, showing the cotyledon window that will allow the emergence of the seedling (radicle and plumule).

According to Cabello (2008), the seedling phase begins with the reactivation of the embryo and its emergence from the seed, through the emission of the radicle and the plumule. When germination occurs, the embryo

En los cortes transversales y longitudinales de los embriones se observó la plúmula bien diferenciada, situada en ángulo con respecto al eje longitudinal del embrión. En forma opuesta se encuentra la zona meristemática, donde se desarrollará la radícula. La plúmula consta de dos primordios foliares y un ápice, con el esbozo de un tercer primordio (Figura 3). Todas estas estructuras están encerradas por el coleóptilo.

Externamente, el embrión presenta una hendidura longitudinal o ventana cotiledonar, al nivel de la plántula; la capa de células protodérmicas que recubre dicha

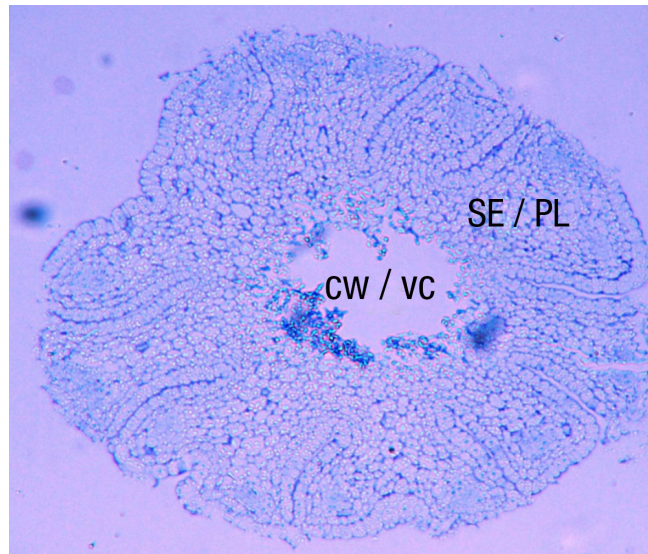


Figure 4. Cross-section of *Acrocomia aculeata* embryo, at the level of the cotyledonary petiole, showing the cotyledonary window (cw) that will allow the emergence of the seedling (SE).

Figura 4. Corte transversal de embrión de *Acrocomia aculeata*, al nivel del peciolo cotiledonario, mostrando la ventana cotiledonar (vc) que permitirá la emergencia de la plántula (PL).

is elongated by detaching the operculum, from which the cotyledonary or ligule pod emerges to the exterior, through the germinative pore. Subsequently, the ligule is included, splits and the radicle and the plumule arise. The haustorium develops from the cotyledonary limb of the embryo, occupying the internal cavity of the seed. The haustorium has an invaginated surface, with an epidermis formed by rectangular cells in radial direction, with very dense cytoplasm and prominent nuclei. The subepidermal layer, monostratified, presents cells of regular shape and size. Towards the interior, the parenchyma cells are irregular and gradually increase in size, leaving large intercellular spaces.

In palms, according to Tomlinson (1990), the embryo is always tiny in relation to the total size of the seed and the endosperm. The *A. aculeata* embryo is no exception and the observations made in this work confirm the claims of Cabello (2008), who indicates that the embryo of the palms is incompletely developed. This agrees with what has been stated by Nikolaeva (1969), who points out that the individuals of the *Arecaceae* group present endogenous morphological dormancy, since they have an embryo that has not reached its morphological development at the time of seed maturation.

In general, the *A. aculeata* embryo is similar to that of other palms of the same group, in terms of shape and inclusion in the endosperm. The endosperm arrangement of *Cocos nucifera* L. and *Jubebaea chilensis* (Molina) is similar, as is the location of the embryo under the germinative pore (Heathcock & Chapman,

ventana continúa con la del coleóptilo. En la Figura 4 se observa el corte transversal de un embrión, mostrando la ventana cotiledonar que permitirá la emergencia de la plántula (radícula y plúmula).

Según Cabello (2008), la fase de plántula inicia con la reactivación del embrión y su emergencia de la semilla, mediante la emisión de la radícula y de la plúmula. Cuando la germinación se produce, el embrión se elonga desprendiendo el opérculo, del cual emerge la vaina cotiledonaria o lígula, a través del poro germinativo. Posteriormente, la lígula se engloba, se hiende y surgen la radícula y la plúmula. A partir del limbo cotiledonar del embrión se desarrolla el haustorio, que ocupará la cavidad interna de la semilla. El haustorio presenta una superficie invaginada, con una epidermis formada por células rectangulares en sentido radial, con citoplasma muy denso y núcleos prominentes. La capa subepidérmica, monoestratificada, presenta células de forma y tamaño regulares. Hacia el interior, las células parenquimáticas son irregulares y aumentan gradualmente de tamaño, dejando grandes espacios intercelulares.

En las palmas, según Tomlinson (1990), el embrión es siempre diminuto en relación con el tamaño total de la semilla y del endosperma. El embrión de *A. aculeata* no es la excepción y las observaciones realizadas en este trabajo confirman las afirmaciones de Cabello (2008), quien indica que el embrión de las palmas está desarrollado incompletamente. Esto concuerda con lo afirmado por Nikolaeva (1969), quien señala que los individuos del grupo *Arecaceae* presentan latencia

1983; Sugimura & Murakami, 1990) in its cylindrical shape. Most of the tissue of the embryo corresponds to the cotyledon with the presence of a small constriction that divides it into two parts. The same goes for the embryo of *Elaeis guineensis* fo. *dura* Becc., which is also cylindrical-conical (Quero, 1992). The embryo of *Acrocomia mexicana* Karwinsky ex Mart. is opposite to one of the poles, while *Bactris mexicana* Martius, another species of the Arecaceae group, can be basal or dorsal (Quero, 1992).

The embryos of *A. aculeata* consist of protoderm, plumule and well-defined procambial strands (Moura et al., 2008). The protoderm shows invaginations and, below, cells of the fundamental meristem. Starch grains accumulate in the cells of the fundamental meristem under intense division (Moura et al., 2008), especially in those with less dense cytoplasm. In the case of *A. aculeata*, a cotyledonary window is located in the longitudinal direction of the embryo, which simulates a tangential cut eyelet, similar to that of *E. guineensis* (Vallade, 1966a). *Acrocomia aculeata*, like *E. guineensis* fo. *dura* and *J. chilensis*, presents the embryo plumule in lateral position and is well differentiated into two leaves and an apex, which bears on its flanks the outline of the third leaf. This plumule is completely enclosed in a fold of the cotyledon, whose lips are completely visible at the level of the cotyledonary opening. The root is not individualized; in the fundamental parenchyma, there is a region of radicular aptitude that will participate in the formation of the root, at the time of germination (Vallade, 1966a).

The epidermis of the anatomical structures of *A. aculeata* has a layer composed of thin-walled elongated cubic cells, presenting meristematic cells of globose appearance in the external region of the mesophyll, interspersed with bundles of radially elongated cells. The middle region of the mesophyll is predominantly composed of parenchymal cells (Reis, Mercadante-Simões, & Ribeiro, 2012).

Some cells of the inner part of the *A. aculeata* embryos are larger than those of the periphery with dense cytoplasm; in general, cell divisions occur in the distal region both in the periphery and in the interior. These cell divisions occur mainly in the fundamental meristem, near the procambial strands. In these tissues, groups of cells that present a wall with apparent thickening and mucilaginous appearance are concentrated. The apparent thickening may be the result of the disintegrated cell wall, pectin storage and mucilage formation (Moura et al., 2008).

Conclusions

In general, the *Acrocomia aculeata* embryo is similar to that of other palms of the same group, in terms of shape

endógena morfológica, ya que poseen un embrión que no ha alcanzado su desarrollo morfológico en el tiempo de maduración de la semilla.

En general, el embrión de *A. aculeata* es semejante al de otras palmas del mismo grupo, en cuanto a forma e inclusión en el endosperma. La disposición del endosperma de *Cocos nucifera* L. y *Jubebaea chilensis* (Molina) es similar, al igual que la ubicación del embrión bajo el poro germinativo (Heathcock & Chapman, 1983; Sugimura & Murakami, 1990) en su forma cilíndrica. La mayor parte del tejido del embrión corresponde al cotiledón con la presencia de una pequeña constricción que lo divide en dos partes. Lo mismo ocurre con el embrión de *Elaeis guineensis* fo. *dura* Becc., que también es cilíndrico-cónico (Quero, 1992). El embrión de *Acrocomia mexicana* Karwinsky ex Mart. es opuesto a uno de los polos, en tanto que *Bactris mexicana* Martius, otra especie del grupo de las Arecaceae, puede ser basal o dorsal (Quero, 1992).

Los embriones de *A. aculeata* constan de protoderma, plúmula y hebras procambiales bien definidas (Moura et al., 2008). El protoderma presenta invaginaciones y, por debajo, células del meristema fundamental. Los granos de almidón se acumulan en las células del meristema fundamental bajo intensa división (Moura et al., 2008), especialmente en las que tienen menos citoplasma denso. En el caso de *A. aculeata*, una ventana cotiledonar aparece ubicada en sentido longitudinal del embrión, la cual simula un ojal en corte tangencial, similar a la de *E. guineensis* (Vallade, 1966a). *Acrocomia aculeata*, al igual que *E. guineensis* fo. *dura* y *J. chilensis*, presenta la plúmula del embrión en posición lateral y se encuentra bien diferenciada en dos hojas y un ápice, que porta sobre sus flancos el esbozo de la tercera hoja. Esta plúmula se encuentra encerrada completamente en un repliegue del cotiledón, cuyos labios son completamente visibles al nivel de la abertura cotiledonar. La raíz no se encuentra individualizada; en el parénquima fundamental, existe una región de aptitud radicular que participará en la formación de la raíz, al momento de la germinación (Vallade, 1966a).

La epidermis de las estructuras anatómicas de *A. aculeata* presenta una capa compuesta de células cúbicas alargadas con paredes delgadas, presentando células meristemáticas de apariencia globosa en la región externa del mesófilo, intercaladas con haces de pilas alargadas radialmente. La región media del mesófilo se compone predominantemente de células parenquimatosas (Reis, Mercadante-Simões, & Ribeiro, 2012).

Algunas células de la parte interior de los embriones de *A. aculeata* son más grandes que las células de la periferia con citoplasma denso, por lo general, las divisiones celulares se producen en la región distal

and inclusion in the endosperm. Morphoanatomical studies can help to improve the description of processes that lead to a tissue reacquiring its embryogenic potential, which can be applied to the embryogenesis of *A. aculeata*. The morphoanatomical study could also be used to approach germination trials from a new perspective, in order to find treatments that overcome the dormancy in the seeds of this palm.

Acknowledgments

We thank the Linking Program of Scientists and Technologists of Paraguay's National Science and Technology Council (CONACYT for its initials in Spanish) for the grant awarded to carry out this research. We are also grateful for the collaboration of the Institute of Agricultural and Fisheries Research and Training (IFAPA for its initials in Spanish) of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Rural Development of the Regional Government of Andalucía, Spain.

End of English version

References / Referencias

- Bandeira, F. S. (2008). *Cultivo in vitro e embriogenese somática de embriões zigóticos de macuaba (Acrocomia aculeata (Jacq.) Loddiges)*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Retrieved from <http://locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/518/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cabello, A. (2008). *Técnicas de propagación de palma chilena (Jubaea chilensis (Mol.) Baillon)*. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Córdoba, España.
- Cahill, D. M., Bennett, I. J., & McComb, A. J. (1992). Resistance of micropropagated *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Disease Journal*, 76, 630–632. Retrieved from https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1992Articles/PlantDisease76n06_630.PDF
- Henderson, A., Galeano, G., & Bernal, R. (1995). *Field guide to the palms of the Americas*. New Jersey, USA: Princeton University Press.
- Heathcock, J. F., & Chapman, J. A. (1983). The structure of fresh and desiccated coconut. *Food Microstructure*, 2, 81–90. Retrieved from https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1052&context=food_microstructure
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2007). *El estado del arte de los biocombustibles en el Paraguay*. Asunción-Paraguay: Autor. Retrieved from <http://repiica.iica.int/docs/B0389e/B0389e.pdf>
- Lorenzi, G. M. C. (2006). *Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart.-Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná,

tanto en la periferia como en el interior. Esas divisiones celulares se producen principalmente en el meristemo fundamental, cerca de las hebras procambiales. En estos tejidos se concentran grupos de células que presentan pared con engrosamiento aparente y aspecto mucilaginoso. El engrosamiento aparente puede ser el resultado de la pared celular desintegrada, almacenamiento de pectina y formación de mucílago (Moura et al., 2008).

Conclusiones

En general, el embrión de *Acrocomia aculeata* es semejante al de otras palmas del mismo grupo, en cuanto a forma e inclusión en el endosperma. Los estudios morfoanatómicos pueden ayudar a mejorar la descripción de procesos que conducen a que un tejido readquiera su potencialidad embriogénica, lo cual puede ser aplicado a la embriogénesis de *A. aculeata*. El estudio morfoanatómico podría servir también para encarar los ensayos de germinación desde una nueva perspectiva, con el fin de encontrar tratamientos que superen la latencia en las semillas de esta palma.

Agradecimientos

Al Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de Paraguay, por la beca otorgada para llevar a cabo esta investigación. Se agradece también la colaboración del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, España.

Fin de la versión en español

- Curitiba, Brasil. Retrieved from <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/5279/1/Acrocomia%20aculeata.pdf>
- Lorenzi, H. (2008). *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil (5ª ed.)*. Nova Odessa, Brasil: Instituto Plantarum.
- Moura, M. F., Ventrella, M. S., Motoike, S. Y., Sá, A. Q. J., Carvalho, M., & Manfio, C. E. (2008). Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(2), 175–184. doi: 10.1007/s11240-008-9430-9
- Nikolaeva, M. G. (1969). *Physiology of deep dormancy in seeds*. Washington, D. C. USA: Kohn and Wills.
- Pérez-de-Luque, A., Lozano, M. D., Maldonado, A. M., Jorrín, J. V., Dita, M. A., Die, J., ...Rubiales, D. (2006). *Medicago truncatula* as a model for studying interactions between root parasitic plants and legumes. Retrieved

- from https://www.researchgate.net/publication/237117955_Medicago_truncatula_AS_A_MODEL_FOR_STUDYING_INTERACTIONS_BETWEEN_ROOT_PARASITIC_PLANTS_AND_LEGUMES
- Quero, H. (1992). *Las palmas silvestres de la península de Yucatán*. México: Instituto de Biología UNAM.
- Reis, S. M., Mercadante-Simões, M. O., & Ribeiro, L. M. (2012). Pericarp development in the macaw palm *Acrocomia aculeata* (Areaceae). *Rodriguésia* 63(3), 541–549. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rod/v63n3/a05v63n3.pdf>
- Ruzin, S. E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. USA: Oxford University Press.
- Silva, V. (2006). Morfologia e avaliação do crescimento inicial de plântulas de *Bactris gasipaes* Kunth. (Areaceae) em substratos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(3), 477–480.
- Sorol, C. B., Hauptenthal, D. I., Reckziegel, M. E. (2012). Caracterización de la germinación, la plántula y el crecimiento de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex. Mart. *Rojasiana*, 11(1-2), 21–30. Retrieved from [http://www.qui.una.py/files/publicaciones/rojasiana/Vol%2011%20\(1-2\)%202012/3_Caracterizacion%20de%20la%20germinaci%C3%B3n%20la%20pl%C3%A1ntula.pdf](http://www.qui.una.py/files/publicaciones/rojasiana/Vol%2011%20(1-2)%202012/3_Caracterizacion%20de%20la%20germinaci%C3%B3n%20la%20pl%C3%A1ntula.pdf)
- Souto, G. (2008). *Paraguay explora su potencial en biocombustible. Comunita (IICA)*, 4(2), 44–52. Retrieved from <http://webiica.iica.ac.cr/bibliotecas/repica/B0719E/B0719E.pdf>
- Sugimura, Y., & Murakami, T. (1990). Structure and function of the haustorium in germinating coconut palm seed. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 24, 1–14. Retrieved from <http://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/jarq/24-1/24-1-001-014.pdf>
- Tomlinson, P. B. (1990). *The structural biology of palms*. Oxford: Clarendon Press.
- Vallade, J. (1966a). Aspect morphologique et cytologique de l'embryon quiescent d' *Elaeis guineensis* Jacq. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série D: Sciences Naturelles*, 262(8), 856–859. Retrieved from http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_5/b_fdi_08-09/10545.pdf