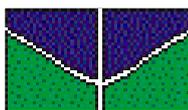


**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica**

**ESTRATÉGIAS PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE GERMOPLASMA DE MACAÚBA
[*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]**

Zanderluce Gomes Luis

Brasília-DF
Setembro de 2013



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica**

**ESTRATÉGIAS PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE GERMOPLASMA DE MACAÚBA
[*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]**

Zanderluce Gomes Luis

Orientador: Jonny Everson Scherwinski Pereira

Tese apresentada à Universidade de Brasília, para obtenção do título de Doutora em Botânica, linha de pesquisa: Cultura de tecidos de plantas.

Brasília-DF
Setembro de 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1011813.

L953e Luis, Zanderluce Gomes.
Estratégias para a embriogênese somática e conservação ex situ de germoplasma de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) / Zanderluce Gomes Luis. -- 2013.
136 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, 2013.
Inclui bibliografia.
Orientação: Jonny Everson Scherwinski Pereira.

1. Embriogênese somática. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura. 3. Plantas - Conservação.
I. Scherwinski-Pereira, Jonny Everson. II. Título.

CDU 581.142

ESTRATÉGIAS PARA A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE GERMOPLASMA DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de Doutor e aprovada em sua forma final pela comissão julgadora do Programa de Pós-graduação em Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Departamento de Botânica, UnB
(Presidente)

Dra. Conceição Eneida dos Santos Silveira
Departamento de Botânica, UnB
(Membro interno)

Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira
Departamento de Botânica, UnB
(Membro interno)

Dra. Julcéia Camillo
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Membro externo)

Dra. Leila Aparecida Salles Pio
Universidade Federal de Lavras
(Membro externo)

Dra. Gabriela Ferreira Nogueira
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Suplente)

Ofereço

À minha mãe, Marluce Gomes

À meu pai, Zander Luis

Dedico

Ao meu marido, Maricélio Guimarães

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo amor de todos os dias, palavras de incentivo, conforto e amizade.

Ao meu pai, pelo amor, confiança, apoio em todos os momentos e por acreditar sempre.

Aos meus irmãos, pelo carinho, companheirismo e por sempre compreender a minha ausência.

Ao Maricélio, agradeço pelo amor, atenção, dedicação, companheirismo, auxílio nas coletas e em tudo que fosse necessário. E a sua família, pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu orientador, Jonny Everson Scherwinski Pereira, sem o qual esse trabalho não teria sido realizado. Agradeço pela disponibilidade, apoio, paciência, amizade, enfim meu muito obrigada!

À Professora Conceição Eneida dos Santos Silveira, pela amizade, apoio e importantes sugestões.

Ao Professor Luiz Alfredo Rodrigues Pereira, que contribuiu com a minha formação profissional e pela disponibilidade em ajudar.

Ao meu querido amigo Rafael de Carvalho Silva, que mesmo distante me apoiou em cada momento. Obrigada pela alegria transmitida, carinho, conversas e risadas.

Às minhas amigas irmãs Luciene Barcelos e Letícia Zenóbia que, mesmo distantes, contribuíram com carinho e incentivo.

À Gabriela Nogueira, pela amizade sincera, sugestões e apoio nos momentos difíceis.

À amiga Julcéia Camillo, pela motivação e conhecimentos transmitidos.

Aos queridos amigos da Pós-Graduação em Botânica: Kadja Milena, Giselle Pina, Davi Rossatto, Thais Cipriano, Nádia Somavilla e Silvia Fernandes pela amizade, trocas de conhecimentos, ajudas, companheirismo e incentivo.

Ao aluno de iniciação científica, Marcus Paredes, pelo imenso auxílio no início dos experimentos e pela amizade.

Aos velhos e novos colegas de pesquisa do Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Aline Martins, Emília Saleh, Elínea Freitas,

Filipe Sathler, Gabriela Nogueira, Hugo Gomes, Jaqueline Vasconcelos, Janiffe Oliveira, Julcéia Camillo, Frederico Costa, Leandro Gomes, Luanna Pena, Maíra Andrade, Nero Carlos, Paulo César, Patrícia Monah, Rayssa Lelis, Stênio Steferson, Talita Balzon, Tatiane Monteiro, Tatiane Loureiro e Valentine Carpes.

Ao André Luís Xavier de Souza pelo auxílio nos experimentos, amizade e paciência.

À Renata Martins pela indicação das áreas de ocorrência da macaúba próximas à Brasília.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Botânica.

Aos funcionários do Departamento de Botânica.

Aos funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

À Capes pela concessão da bolsa.

À todos aqueles que, de alguma forma, deram sua contribuição para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O presente trabalho objetivou estabelecer estratégias para a clonagem por embriogênese somática e conservação *ex situ* de macaúba (*Acrocomia aculeata*). Para a embriogênese somática a partir de embriões zigóticos (EZ), foram avaliados o efeito das auxinas 2,4-D, dicamba e picloram nas concentrações de 0, 1,5 e 3,0 mg L⁻¹, assim como os meios de cultura de MS e Y3. Na diferenciação de embriões somáticos (ES) as concentrações das auxinas foram reduzidas para 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. A regeneração de plantas foi realizada em meio de cultura desprovido de auxina. A formação de calos embriogênicos (CE) foi observada em todas as auxinas e concentrações testadas e, entre os meios de cultura foi observado resultados significativos com o uso de meio Y3. ES foram observados após 60 dias em meio de diferenciação e a frequência de regeneração de plantas atingiu valores de até 31,9%. Na embriogênese somática a partir de segmentos foliares de plantas *in vitro*, EZ foram germinados em meio Y3 contendo 0 e 225 µM de 2,4-D (pré-tratamento). A parte aérea das plantas foi dividida e seccionada em quatro regiões: meristemática, basal, mediana e apical. Os segmentos de cada região foram inoculados em meio contendo 450 µM de picloram para a indução de calos. Neste experimento, a diferenciação de ES ocorreu em meio com 40 e 80 µM de picloram. O uso do pré-tratamento de indução aumentou a capacidade de formação de CE e de ES. A região meristemática foi a que apresentou os melhores resultados. Em ambos os meios de diferenciação observou-se ES formados. Para aquisição da competência para formação de calos a partir de folhas e ovários imaturos de plantas adultas, foram avaliados o efeito das auxinas 2,4-D, dicamba e picloram, os meios de cultura de MS e Y3, as regiões basal e apical do palmito, quatro tipos de explantes provenientes de ovários imaturos e três classes quanto ao estágio de desenvolvimento das inflorescências. A auxina picloram associada à concentração de 450 µM proporcionou resultados superiores na indução de CE, em ambos os explantes testados. O meio Y3 aumentou a formação de calos em explantes foliares, porém, não teve influência nos explantes provenientes de flores femininas. Para a conservação de germoplasma de macaúba a médio-longo prazo, as sementes foram avaliadas quanto a tolerância à dessecação por até 168 horas. Após a determinação da melhor umidade para o armazenamento (5% de umidade), as sementes foram armazenadas a -196, -20, 6 e 25 °C por períodos de 0, 90, 180 e 360 dias. Para avaliar a viabilidade e germinação após cada período de armazenamento, as sementes foram desinfestadas e os EZ excisados e cultivados *in vitro*. Os resultados indicaram que as sementes de macaúba podem ser dessecadas para valores de até 4,3% de umidade, sem perda da viabilidade e com germinabilidade superior a 90%. As sementes armazenadas apresentaram perda da viabilidade ao longo dos períodos de avaliação

em todas as temperaturas de conservação testadas, indicando que a categoria subortodoxa seja mais adequada para classificar as sementes desta espécie. No experimento de criopreservação de embriões zigóticos, esses foram extraídos de sementes e reidratados por 15 h em meio contendo 3% de sacarose. Em seguida, os EZ foram submetidos a dessecação por até 8 horas. Para cada período, parte dos embriões foi inoculada em meio de germinação e parte foi colocada em criotubos estéreis e imersos diretamente em nitrogênio líquido por até 360 dias. Após o período de armazenamento, foi realizado o descongelamento rápido dos criotubos em banho-maria a 40 °C por 90 segundos. Os resultados revelaram que há diminuição da germinabilidade com o aumento do tempo de dessecação dos EZ, com médias de 97 e 75% para 0 horas e 8 horas de dessecação, respectivamente. Para os embriões zigóticos criopreservados, a maior percentagem de germinação (81%) foi obtida após 6 horas de dessecação, quando os embriões apresentavam 11% de umidade. O presente trabalho contribui com informações relevantes tanto para a propagação vegetativa quanto para a conservação dessa espécie. Verificou-se que a embriogênese somática pode ser obtida a partir de diferentes fontes de explantes e a criopreservação pode representar uma nova estratégia para a conservação de germoplasma de macaúba por longos períodos.

Palavras-chave: macaúba, embriogênese somática, tecidos somáticos, conservação *ex situ*, sementes, criopreservação, embriões zigóticos.

ABSTRACT

This study aimed to establish strategies for cloning by somatic embryogenesis from different explants and evaluate the desiccation tolerance and medium to long term storage of seeds and zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) for *ex situ* conservation. For the somatic embryogenesis from zygotic embryos (ZE) the effect of the auxin 2,4-D, dicamba and picloram at concentrations of 0, 1.5, and 3.0 mg L⁻¹ and culture media MS and Y3, were evaluated. For the differentiation of somatic embryos (SE), the concentrations of auxin was reduced to 0.5 and 1.0 mg L⁻¹. Plant regeneration was performed in culture medium without auxin. The formation of embryogenic calli (EC) was higher in Y3 medium. SE were observed after 60 days in differentiation medium. The frequency of plant regeneration reached values of up to 31.9%. In somatic embryogenesis from leaf segments of *in vitro* plants, the effect of using a pre-induction treatment on calli and somatic embryo formation and was evaluated and more responsive explants characterized. For this, ZE were germinated in Y3 containing 0 and 225 µM of 2,4-D (pre-treatment). The aerial part of the plant was sectioned into four regions: meristematic, basal, median and apical. The segments from each region were inoculated in medium containing 450 µM of picloram for calli induction. The differentiation of SE occurred in medium with 40 and 80 µM of picloram. The use of the pre-treatment increased the ability to induce the formation of EC as well as SE. The meristematic region showed superior results in the induction of EC and SE compared to the other regions tested. In both differentiation media we observed differentiated SE. In the acquisition of competence for calli formation from young immature and ovaries, we evaluated the effect of auxins 2,4-D, dicamba and picloram, the culture media MS and Y3, the basal and apical foliar regions of the palmetto tree, four types of explants from ovaries and three inflorescence development stage classes. The auxin, picloram associated with concentration of 450 µM, showed superior results in the induction of EC in both explants tested. The Y3 medium increased calli formation in leaf explants, however, it did not influence explantes from ovaries. For the conservation of macaw palm seed germplasm over the medium to long term, the seeds were evaluated for tolerance to desiccation for up to 168 hours. After determining the best moisture content for storage (5% moisture), seeds were stored at -196, -20, 6, and 25° C for 0, 90, 180 and 360 days. To assess the viability and germination after each storage period, the seeds were desinfested and ZE excised and cultivated *in vitro*. The results indicated that the macaw palm seeds can be desiccated to up to 4.3% moisture, without loss of viability and with a germination rate above 90%. Seeds stored for 360 days showed loss of viability over the evaluation periods at all storage temperatures tested, indicating that the

suborthodox category is more appropriate to classify the seeds of this species. Based on the seed conservation results obtained, cryopreservation of zygotic embryos presents a viable alternative for the germplasm conservation of this species. For this experiment, ZE were extracted from seeds and rehydrated for 15 h in medium containing 3% sucrose. The ZE were then subjected to drying in a laminar flow chamber 0, 2, 4, 6 and 8 hours. For each period, a portion of the embryos was inoculated in germination medium and a portion was placed in sterile vials and immersed directly into liquid nitrogen for up to 360 days. After each storage period, rapid thawing of the cryotubes was conducted in a water bath at 40° C for 90s. The desiccation results showed that germinability decreases with increased drying time, averaging 97 and 75% for 0 hours and 8 hours of desiccation, respectively. For cryopreserved zygotic embryos, the highest germination percentage (81%) was obtained after 6 hours of desiccation, when the embryos had 11 % moisture. Embryos cryopreserved with 11% moisture content for up to 360 days showed 75% survival. This study contributes information relevant to both vegetative propagation and for the conservation of genetic resources of this species. Somatic embryogenesis can be obtained from different explant sources, and cryopreservation of zygotic embryos may represent a new strategy for the conservation of macaw palm germplasm for long periods.

Keywords: *Acrocomia aculeata*, somatic embriogenesis, somatic tissues, *ex situ* conservation, seeds, cryopreservation, zygotic embryos.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Aspectos gerais da palmeira <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq) Lodd. ex Mart.....	05
--	----

CAPÍTULO I

Figura 1. Estádios morfológicos da indução de calos durante a embriogênese somática de macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	32
Figura 2: Aspectos morfológicos da regeneração de plantas de macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.] obtida a partir de embriões zigóticos.....	38
Figura 3. Caracterização histológica da embriogênese somática em macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	40
Figura 4. Caracterização histológica da embriogênese somática em macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	42

CAPÍTULO II

Figura 1. Esquema para a obtenção de explantes de plantas de macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.] cultivadas <i>in vitro</i>	54
Figura 2. Aspecto da embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas <i>in vitro</i> de macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	60
Figura 3. Efeito do meio de diferenciação (40 e 80 μ M de Picloram) e regiões foliares na percentagem de formação de embriões somáticos por explantes de macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	61
Figura 4. Efeito do meio de cultura (MS e Y3) na formação de calos primários, calos embriogênicos e embriões somáticos em segmentos foliares de plantas <i>in vitro</i> de macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	62
Figura 5. Eventos histológicos durante a embriogênese somática a partir de segmentos foliares de plantas <i>in vitro</i> de macaúba [<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	65

CAPÍTULO III

Figura 1: Aspecto dos calos obtidos a partir de folhas imaturas aclorofiladas de plantas adultas de macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	83
Figura 2. Efeito do meio de cultura e da região do palmito na formação de calos primários (A) e embrigênicos (B) em Macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.]	85
Figura 3: Aspecto dos calos obtidos a partir de ovários de inflorescências imaturas de macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	88
Figura 4. Efeito de meios de cultura e de tipos de explantes na formação de calos nodulares em ovário de Macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.]	89
Figura 5. Influência do estágio de desenvolvimento de inflorescências sobre a formação de calos nodulares em ovário de Macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	90

CAPÍTULO IV

Figura 1. Teor de umidade das sementes e germinabilidade de embriões zigóticos extraídos de sementes de macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.] submetidas à dessecação.....	104
Figura 2. Germinabilidade de embriões zigóticos extraídos de sementes de macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.] submetidas a dois métodos de descongelamento, lento e rápido, após armazenamento por 90 dias em temperatura de -20 °C.....	105
Figura 3. Influência do tempo de armazenamento (0, 90, 180 e 360 dias) e diferentes temperaturas (25, 6, -20 e -196 °C) na percentagem de germinação de sementes de macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	106

CAPÍTULO V

Figura 1. Teor de umidade dos embriões zigóticos de macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.] em função do período de dessecação.....	121
---	-----

Figura 2. Percentagem de germinação de embriões zigóticos de macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.] em função do tempo de dessecação e da criopreservação.....	122
Figura 3. Efeito do tempo de dessecação (-NL) e da criopreservação (+NL) no comprimento da raíz principal de plantas de macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	124
Figura 4. Efeito do tempo de dessecação (-NL) e da criopreservação (+NL) no comprimento da parte aérea plantas de macaúba macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.]	124
Figura 5. Germinabilidade e anormalidade de embriões zigóticos de macaúba macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.] em função do tempo criopreservação.....	125
Figura 6. Aspectos do embrião e da germinação <i>in vitro</i> de macaúba macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.].....	127
Figura 7. Análise anatômica dos embriões zigóticos de macaúba macaúba [<i>Acrocomia aculeta</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.] submetidos à dessecação e à criopreservação.....	129

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Composição dos meios de cultura e períodos (semanas) utilizadas no processo de embriogênese somática de macaúba macaúba [*Acrocomia aculeta* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]..... 28
- Tabela 2.** Efeito dos meios de cultura MS e Y3 e diferentes concentrações de Dicamba, Picloram e 2,4-D na indução de calos primários e embriogênicos em embriões zigóticos de macaúba macaúba [*Acrocomia aculeta* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]..... 33
- Tabela 3.** Influência do meio de diferenciação e maturação sobre o número médio de embriões somáticos formados por explante e frequência de regeneração de plantas de macaúba macaúba [*Acrocomia aculeta* (Jacq.) Lodd. ex Mart.], após três meses em meio de regeneração..... 35

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Influência da germinação de embriões zigóticos em meio de cultivo contendo 225 μ M de 2,4-D e, das regiões da parte aérea de plantas de macaúba macaúba [*Acrocomia aculeta* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] na indução de calos primários e embriogênicos..... 59

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Capacidade de formação de calos em explantes foliares de macaúba [*Acrocomia aculeta* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] sob influência de diferentes concentrações de 2,4-D, Dicamba e Picloram..... 81
- Tabela 2.** Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, Dicamba e Picloram na formação de calos em ovário de inflorescências imaturas de macaúba [*Acrocomia aculeta* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]..... 86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μM	Micromolar
Atm	Atmosfera
°C	Grau Celsius
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	Dimetil-alil-amino-purina
CE	Calo embriogênico
Dicamba	Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico
ES	Embrião somático
<i>et al.</i>	Expressão latina que significa “e outros”.
EZ	Embrião zigótico
FAA	Formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico
Fe-EDTA	Solução de Sulfato Ferroso e
g	O grama (unidade de medida de massa).
h	Hora (unidade de tempo)
L	Litro (unidade de medida de volume)
MB	Meio de cultura basico
MD	Meio de diferenciação de embriões somáticos
mg	Miligramas (unidade de medida de massa)
mL	Mililitro (unidade de medida de volume)
MS	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
NL	Nitrogênio líquido
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PVC	Película de polivinilcloreto
Y3	Meio formulado por Eeuwens (1976)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex. Mart.....	4
2.2 Embriogênese somática.....	6
2.3 Conservação de germoplasma.....	10
2.3 Referências bibliográficas.....	13

CAPÍTULO I

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS EM
MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] A PARTIR DE
EMBRIÕES ZIGÓTICOS**

RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 Material vegetal.....	26
2.2 Indução de calos.....	26
2.3 Diferenciação de embriões somáticos.....	27
2.4 Sincronização e maturação de embriões somáticos.....	27
2.5 Regeneração de plantas.....	27
2.6 Análise histológica.....	29
2.7 Análise estatística.....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1 Indução de calos.....	30
3.2 Diferenciação de embriões somáticos.....	34
3.3 Sincronização e maturação de embriões somáticos.....	35
3.4 Regeneração de plantas.....	36
3.5 Análise histológica.....	39
4. CONCLUSÕES.....	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

CAPÍTULO II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDUZIDA A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE PLANTAS *IN VITRO* DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Mart.]

RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1 Obtenção dos explantes e efeito de pré-tratamentos.....	53
2.2 Influência do meio de cultura na indução de calos.....	54
2.3 Condições de cultivo.....	55
2.4 Análise histológica.....	55
2.5 Análise estatística.....	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1 Obtenção dos explantes e efeito de pré-tratamentos.....	57
3.2 Influência do meio de cultura na indução de calos e embriões somáticos.....	61
3.3 Análise histológica.....	63
4. CONCLUSÕES.....	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

CAPÍTULO III

FATORES ENVOLVIDOS COM A FORMAÇÃO DE CALOS EM TECIDOS SOMÁTICOS DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
1. INTRODUÇÃO.....	73
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1 Material vegetal	74
2.1.1 Folhas imaturas de plantas adultas.....	74
2.1.2 Ovários imaturos.....	74

2.2	Indução de calos.....	75
2.3	Influência do meio de cultura na indução de calos.....	75
2.3.1	Folhas imaturas.....	76
2.3.2	Ovários imaturos.....	76
2.4	Análise histológica	76
2.5	Coleta de dados e análise estatística.....	77
2.5.1	Folhas imaturas.....	77
2.5.2	Ovários imaturos.....	77
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
3.1	Folhas imaturas obtidas de plantas adultas	79
3.1.1	Efeitos de diferentes auxinas e concentrações na indução de calos.....	79
3.1.2	Influência do meio de cultura e da região do palmito na indução de calos.....	84
3.2	Ovários imaturos.....	85
3.2.1	Efeitos de diferentes auxinas e concentrações na indução de calos.....	85
3.2.2	Influência do meio de cultura, tamanho e região do explante e estágio de desenvolvimento da inflorescência na indução de calos.....	89
4.	CONCLUSÕES.....	91
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

CAPÍTULO IV

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] A MÉDIO-LONGO PRAZO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS

RESUMO.....	96
ABSTRACT.....	97
1. INTRODUÇÃO.....	98
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	100
2.1 Coleta do material vegetal e extração das sementes.....	100
2.2 Tolerância à dessecação e determinação da umidade.....	100
2.3 Teste de descongelamento das sementes.....	101
2.4 Armazenamento das sementes a médio-longo prazo.....	101
2.5 Avaliação da viabilidade das sementes e análise estatística.....	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
3.1 Coleta do material vegetal e extração das sementes.....	103

3.2 Tolerância das sementes à dessecação e determinação de umidade	103
3.3 Teste de descongelamento das sementes.....	104
3.4 Armazenamento das sementes a médio-longo prazo.....	106
4. CONCLUSÕES.....	110
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

CAPÍTULO V

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE MACAÚBA

[*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

RESUMO.....	114
ABSTRACT.....	115
1. INTRODUÇÃO.....	116
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	118
2.1 Coleta e desinfestação do material vegetal.....	118
2.2 Protocolo de Criopreservação	118
2.3 Criopreservação a médio-longo prazo.....	119
2.4 Caracterização da germinação	120
2.5 Análise histológica.....	120
2.6 Coleta de dados e análise estatística.....	120
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
3.1 Protocolo de Criopreservação	121
3.2 Criopreservação à médio-longo prazo.....	125
3.3 Caracterização da germinação.....	126
3.4 Análise histológica.....	128
4. CONCLUSÕES.....	130
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
ANEXOS.....	135

1. INTRODUÇÃO GERAL

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) é uma palmeira nativa das savanas e florestas da América Tropical e Subtropical (Clement *et al.* 2005). No Brasil, é considerada uma das palmeiras de maior dispersão, com populações naturais em praticamente todo o território brasileiro (Lorenzi, 2006). Detentora de características pioneiras, essa espécie está associada a ambientes abertos e antropizados, que comumente são utilizados como pastagens (Motta *et al.* 2002).

Esta palmeira possui diversas utilizações que vão desde o uso alimentício até a extração do óleo vegetal. No entanto, são os frutos que apresentam maior destaque em função da multiplicidade de uso industrial (Teixeira, 2005; Garcia *et al.*, 2006). Todas as partes do fruto podem ser aproveitadas (Silva *et al.*, 2001). O epicarpo (casca) pode ser utilizado na composição de fertilizantes e para a mistura com outras tortas na fabricação de ração animal. Da polpa pode-se extrair óleo empregado na fabricação de sabões, além de ser consumida *in natura*. Do endocarpo pode ser obtido um tipo de carvão de excelentes propriedades e, das sementes, que também podem ser utilizadas no consumo humano, o óleo extraído pode ser empregado na indústria de cosméticos (Hiane, 2005).

Em plantações naturais, estima-se que a capacidade de produção da macaúba possa alcançar cinco toneladas de óleo por hectare/ano (Tickel, 2000). Adicionalmente, essa palmeira apresenta tolerância à seca e pode ser cultivada em variadas condições edafoclimáticas brasileiras (Motta *et al.*, 2002) e por períodos superiores a cinquenta anos (Teixeira, 2005; Bandeira, 2008). Por se tratar de uma espécie com boa adaptação a regiões áridas, o cultivo da macaúba poderia ser realizado em áreas subutilizadas ou na recuperação de áreas degradadas, contribuindo para a redução dos impactos ambientais decorrentes da desordenada expansão urbana e agropecuária. Além disso, pode representar uma fonte de renda adicional para os produtores, sobretudo por poder ser consorciada com outras culturas agrícolas.

Mas apesar do seu potencial, o aproveitamento atual da macaúba apresenta características basicamente extrativistas, incluindo a exploração de plantas de baixo rendimento, que coloca em risco as populações naturais, em razão da coleta sem planejamento dos frutos (Scariot, 1998). Dessa forma, a exploração comercial dessa palmeira depende de sua domesticação e desenvolvimento de tecnologias, que incluem a conservação de germoplasma, a seleção de genótipos superiores, além do desenvolvimento de métodos eficientes de propagação, a fim de se explorar racionalmente indivíduos com maior potencial para a produção de óleo.

No entanto, não é possível propagar macaúba por técnicas convencionais de propagação vegetativa, uma vez que essa espécie não forma afillhos (Moura *et al.*, 2009). Nessa espécie, a propagação ocorre exclusivamente por sementes (via sexuada) que, em condições naturais, pode levar de um a dois anos para germinar (Lorenzi, 2006). Nesse sentido, o emprego de técnicas baseadas na cultura *in vitro* são de grande utilidade (Moura *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012).

E entre as diferentes técnicas de propagação *in vitro*, a propagação por embriogênese somática é a técnica mais indicada e utilizada para este tipo de palmeira. O processo da embriogênese somática é iniciado, em geral, expondo os explantes a um estresse que pode ser provocado pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. Assim, as células tornam-se determinadas a seguir rotas de morfogênese e desenvolver embriões somáticos (Gueye *et al.*, 2009).

Aliado ao desenvolvimento de protocolos de propagação vegetativa *in vitro*, estudos de conservação de recursos genéticos da espécie são de grande importância, uma vez que, a adoção de práticas agrícolas indiscriminadas acabam contribuindo para que ocorra uma forte erosão genética e perda de recursos naturais da espécie (Souza *et al.*, 2009).

Os recursos genéticos de plantas podem ser conservados na forma de sementes, pólen, órgãos vegetativos e plantios no campo. Para isso, é essencial que o método de conservação garanta a máxima viabilidade e estabilidade genética dos acessos, e também que os materiais possam ser conservados isentos de patógenos, em um local controlado e acessível, de forma a facilitar sua utilização (Souza *et al.*, 2009; Rajanaidu; Ainul, 2013).

A conservação de sementes é considerada uma das técnicas mais eficientes de preservação de germoplasma *ex situ* de plantas (Jain, 2011). Contudo, o armazenamento de sementes somente é indicado para espécies que possuem comportamento fisiológico ortodoxo, ou seja, que são tolerantes a dessecação e a temperaturas reduzidas e suportem longos períodos de armazenamento (Rajanaidu; Ainul, 2013).

A criopreservação de sementes ou de embriões zigóticos também é uma opção importante para a conservação do germoplasma *ex situ*, embora esta técnica dependa da tolerância embrião para níveis de umidade inferiores a 5% para evitar danos citológicos resultante da formação de cristais de gelo (Engelmann, 2004). A criopreservação permite conservação de uma estrutura vegetal em temperaturas extremamente baixas (-196 °C a -150 °C), obtidas pela utilização do nitrogênio líquido, que proporcionam a diminuição drástica do metabolismo, e impedem a deterioração fisiológica do material biológico (González-Benito, 1998). As principais vantagens de se armazenar material vegetal em nitrogênio líquido são o baixo custo de armazenamento, a longevidade da conservação, além

de necessitar de espaço físico relativamente reduzido (Dussert, 2013).

Diante do contexto, o presente trabalho objetivou estabelecer estratégias para a clonagem por embriogênese somática e conservação *ex situ* de macaúba (*Acrocomia aculeata*) por diferentes temperaturas, incluindo a subzero e criogênica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Acrocomia aculeata* Jacq. Lodd. ex Mart.

Acrocomia aculeata é uma palmeira arborescente (Figura 1A), perenifólia, heliófita, com estipe solitário que pode alcançar de 14 a 20 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro quando adulta. Ocorre desde o sul do México e Antilhas até o Sul do Brasil, com ocorrências no Paraguai e Argentina, estando ausente no Equador e Peru (Henderson *et al.*, 1995).

É a palmeira com maior distribuição em território brasileiro, formando grandes agrupamentos nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e no Distrito Federal (Henderson *et al.*, 1995; Lorenzi *et al.*, 2010). Devido à sua vasta distribuição, esta espécie possui várias sinonímias regionais, tais como: macaúba, bacaiúva, macaíba, macaiúva, coco-de-catarro ou coco-de-espinho, mocujá, imbocaiá, umbocaiúva (Lorenzi, 1992).

Nativa do bioma Cerrado (Lorenzi *et al.* 2010) e detentora de características pioneiras, a macaúba está associada a ambientes abertos e antropizados que geralmente são utilizados como pastagens (Motta *et al.* 2002), sobretudo nos estados de Goiás (~13 milhões de hectares), Minas Gerais (~12 milhões de hectares) e Mato Grosso do Sul (~11 milhões de hectares) (Sano *et al.*, 2009).

O estipe apresenta-se revestido pelas bases dos pecíolos e contém fortes espinhos que são as principais características dessa espécie (Lorenzi, 1992; Tassaró, 1996). As folhas são pinadas e inseridas em diferentes planos na raque, proporcionando aspecto plumoso à copa da árvore (Lorenzi, 2006).

É uma espécie monoica e, embora seja auto-compatível, possui um sistema reprodutivo misto, com predominância de polinização cruzada (Abreu *et al.*, 2012), a qual é realizada principalmente por besouros e pelo vento (Scariot *et al.*, 1991). As inflorescências são interfolias de coloração amarelada (Figura 1B) e inicialmente são encobertas pela espata que pode chegar até dois metros de comprimento. As flores femininas nascem na base da raque e as masculinas no ápice e possuem uma coloração amarelo-clara. A floração e a frutificação ocorrem principalmente durante a estação chuvosa (Scariot, 1991).

Os frutos são do tipo drupa globosa com diâmetro que pode variar de 2,5 a 5,0 cm (Figura 1C e D). O pericarpo rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo é fibroso,

mucilaginoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos e de coloração amarela. O endocarpo é esclerificado contendo de uma a três sementes (Bondar, 1964; Henderson *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2013).

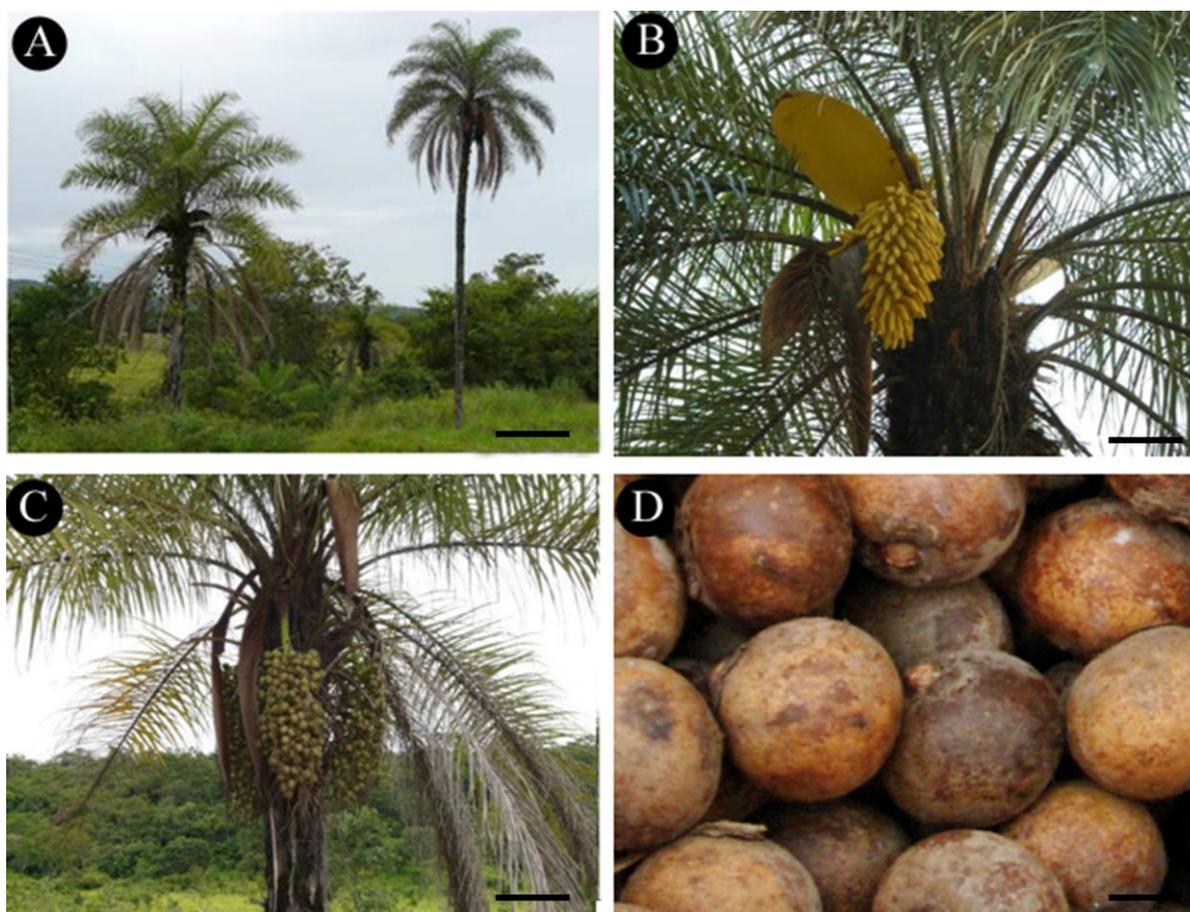


Figura 1. Aspectos gerais da palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd ex Mart. A: Indivíduos no campo. B: Indivíduo em fase de floração contendo uma inflorescência. C: Planta no campo em período de frutificação, contendo frutos verdes. D: Frutos maduros contendo epicarpo de coloração amarronzada. Barras: A= 100 cm; B= 20 cm; C= 30 cm; D = 1 cm.

No Estado de Goiás a macaúba é a palmeira mais utilizada pelas comunidades locais (Martins, 2012). O palmito, extraído do estipe, é utilizado na alimentação e todas as partes do fruto podem ser aproveitadas (Silva *et al.*, 2001). O epicarpo (casca) pode ser utilizado na composição de fertilizantes e para a mistura com outras tortas na fabricação de ração animal. Da polpa pode-se extrair óleo empregado na fabricação de sabões, além de ser consumida *in natura*. Do endocarpo pode ser obtido um carvão de excelentes propriedades, bem como as

sementes que também podem ser utilizadas no consumo humano e seu óleo empregado na indústria de cosméticos (Hiane *et al.*, 2005).

Adicionalmente, os óleos extraídos do mesocarpo e da semente constituem potencial fonte de óleo para a indústria de cosméticos e podem ser utilizados de forma satisfatória para a obtenção de biocombustível (Rodrigues, 2007). A torta obtida tanto da semente quanto do mesocarpo possui potencial como coproduto para a produção de bioetanol (Santos, 2011) e/ou alimentação animal (Mirisola-Filho, 2009). No entanto, o aproveitamento atual dos frutos é basicamente extrativista e sem planejamento que resulta em um baixo rendimento e em produtos de baixa qualidade (Scariot, 1998; Motta *et al.*, 2002).

A propagação desta espécie ocorre pela via seminífera que, em condições naturais, pode levar de um a dois anos para germinar, em consequência da dormência estabelecida pelas estruturas do fruto e da semente (Lorenzi, 2006). No entanto, os embriões isolados e cultivados *in vitro* apresentam germinabilidade elevada (Ribeiro *et al.*, 2011; Rodrigues-Junior *et al.*, 2013).

De acordo com Moura *et al.* (2009), a domesticação e a exploração comercial da macaúba dependem do desenvolvimento de tecnologias, que incluem a seleção e propagação de genótipos elite. No entanto, essa espécie não forma afilhos, inviabilizando sua multiplicação por técnicas convencionais de propagação vegetativa. Nesse contexto, a embriogênese somática representa uma alternativa para possibilitar a propagação clonal e contornar as limitações da propagação vegetativa dessa espécie (Viñas; Jiménez, 2011).

2.2 Embriogênese somática

As palmeiras são formadas por cerca de 3500 espécies, que ocorrem em regiões de clima tropical e sub-tropical (Tomlinson, 2006). Em relação a outros grupos taxonômicos, as palmeiras têm recebido menor atenção se comparadas aos estudos relacionados à genética, fisiologia e a morfogênese. Isto decorre especialmente em função das dificuldades inerentes à reprodução vegetativa dos indivíduos, por apresentarem hábitos singulares de crescimento, como o crescimento lento e um único ápice crescente, fatores que dificultam uso dos genótipos superiores (Kalil-Filho; Resende, 2001).

Diversos autores destacam a necessidade de desenvolver protocolos para a micropropagação de palmeiras em virtude dos métodos tradicionais de melhoramento genético destas espécies serem demorados e complexos, e do longo ciclo de vida e hábito de

crescimento das plantas (Kalil-Filho; Resende, 2001). No entanto, apesar dos primeiros estudos *in vitro* com palmeiras (*Cocos nucifera* L) terem sido realizados há mais de cinco décadas (Cutter; Wilson, 1954), resultando nas primeiras informações sobre o possível uso de técnicas de micropropagação em palmeiras e, no aperfeiçoamento das técnicas de biologia celular e molecular, as pesquisas com palmeiras continuam escassas.

Muitos avanços ocorreram nas pesquisas com palmeiras nos últimos anos, entretanto, ainda inexistem métodos eficientes de propagação vegetativa das palmeiras, tornando os sistemas de cultivo *in vitro* ferramentas eficientes para viabilizar programas de melhoramento genético e introduzir novos híbridos ou variedades comerciais ao sistema produtivo. Além disso, respostas precoces *in vitro* poderiam ser relacionadas ao vigor ou heterose de híbridos, reduzindo o tempo necessário para a avaliação dos cruzamentos (Durand-Gasselin *et al.*, 1990).

Nos trabalhos encontrados na literatura sobre propagação *in vitro* de palmeiras, importantes resultados foram obtidos para algumas espécies, como *Phoenix dactylifera* L. (Sané, 2006; Sané *et al.*, 2012), *Elaeis guineensis* Jacq. (Ahée *et al.*, 1981; Teixeira *et al.*, 1993; Balzon *et al.*, 2013), *Euterpe edulis* Mart. (Guerra, 1989; Saldanha *et al.*, 2006), *Euterpe oleracea* Mart. (Ledo *et al.*, 2002; Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012) e *Bactris gasipaes* Kunth (Steinmacher *et al.*, 2007; De-Almeida *et al.*, 2012).

A embriogênese somática é a técnica da cultura de tecidos mais utilizada na propagação vegetativa de palmáceas. Essa técnica de propagação *in vitro* só é factível devido à notável plasticidade que as células vegetais possuem (Fehér, 2008). Na embriogênese somática, células diferenciadas ou indiferenciadas adquirem a totipotência (Haberlandt, 1902 apud Vasil, 2008), tornando-se determinadas a seguir rotas morfogênicas e desenvolver embriões somáticos (Gueye *et al.*, 2009), sem que ocorra a fusão de gametas. E como resultado do processo, é possível originar milhares de plantas idênticas (Zimmerman, 1993; Ledo *et al.*, 2002).

A capacidade para formação de novos órgãos e tecidos é denominada morfogênese (Zhuravlev; Omelko, 2008). A morfogênese é resultado da interação dos processos de indução, competência celular, determinação e diferenciação celular, os quais são influenciados e determinados normalmente pela presença de reguladores de crescimento no meio de cultura. O processo primordial de indução está relacionado com as alterações no destino de uma ou mais células, e a competência designa a habilidade das células para responder a um determinado sinal específico (Thompson, 2008).

As células competentes podem responder aos sinais tornando-se multipotentes, pluripotentes ou totipotentes (Verdeil *et al.*, 2007; Blervacq *et al.*, 2012). As células multipotentes têm a capacidade de se desenvolver em mais de um tipo de célula no corpo da planta. As pluripotentes podem originar a maioria dos tipos celulares da planta, porém, não todos (Verdeil *et al.*, 2007). Já, as totipotentes retêm a capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares, até mesmo em um embrião e regenerar uma planta inteira (Zhuravlev; Omelko, 2008). Na cultura de tecido, a totipotência celular pode ser expressa via organogênese (diferenciação de órgãos) ou embriogênese somática (diferenciação de embriões somáticos) (Bhojwani; Dantu, 2013).

A diferenciação de órgãos ou embriões somáticos resulta de uma sequência de alterações estruturais e funcionais, altamente coordenadas e determinadas geneticamente, que culminam com a indução de células competentes e o aparecimento de novos órgãos ou embriões somáticos como resultado da totipotência celular (Kerbaudy, 1999; Tahir; Stasolla, 2006).

A formação de embriões somáticos pode ser obtida por meio de modelos diretos ou indiretos. No primeiro caso, a diferenciação de embriões somáticos ocorre diretamente a partir de um explante, sem a formação prévia de agregados celulares (calos) para sua regeneração (Tahir; Stasolla, 2006). Por outro lado, existem sequências que envolvem um estágio intermediário de calo, antes do surgimento do embrião somático. Essa diferenciação a partir de calos é denominada rediferenciação celular e caracteriza o modelo indireto (Sugimoto *et al.*, 2011).

A embriogênese somática em palmeiras não está totalmente dominada, muito embora se saiba que, em geral, o uso de auxinas e a indução de calos são pré-requisitos fundamentais para que a célula adquira competência embriogênica (Viñas; Jiménez, 2011; Balzon *et al.*, 2013). A auxina é considerada o principal regulador de crescimento exigido para a ativação da divisão celular, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Geldner *et al.*, 2000). Em geral, a embriogênese somática é induzida por análogos de auxinas considerados fortes como, por exemplo, o 2,4-D, o dicamba e o picloram. A indução da embriogênese somática, em geral, ocorre em altas concentrações de auxinas e, uma vez desenvolvidos, os embriões somáticos são transferidos para meios com baixa ou nenhuma concentração de auxina (Viñas; Jiménez, 2011).

Apesar da sua utilidade geral, os tratamentos com auxina exógena nem sempre são suficientes para induzir a reativação de células para que se obtenha a regeneração *in vitro*. Além disso, os níveis hormonais endógenos do explante utilizado, determinam a

especificidade das respostas celulares durante a embriogênese somática (Féher *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2005).

Outros fatores importantes a serem observados no processo embriogênico, referem-se ao meio de cultura, genótipo, tipos e estágio fisiológico de desenvolvimento de explantes utilizados para o cultivo *in vitro*. Na cultura de tecidos, o meio de Murashige e Skoog (1962) é amplamente utilizado para diversas espécies, visto que a maioria das plantas reagem favoravelmente a sua constituição de sais e vitaminas (Guedes *et al.*, 2011), incluindo as palmeiras (Vasil; Vasil, 1981; Zhao *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013). O meio Y3 foi estabelecido por Eeuwens em 1976 para o cultivo de *Cocos nucifera* e também tem sido utilizado frequentemente em trabalhos com palmeiras (Fernando *et al.*, 2003, Muniran *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2009).

Nos estudos de cultivo *in vitro* de palmeiras, tem sido utilizados várias fontes de explantes, tais como: embriões zigóticos, tecidos foliares jovens, ápices caulinares, gemas laterais, ápices radiculares e inflorescências (Guerra *et al.*, 1999; Tahir; Stasolla, 2006). O uso de embriões zigóticos como explantes é conveniente já que os frutos estão facilmente disponíveis, possuem elevado grau de uniformidade fisiológica e podem ser transportados para longas distâncias sem danos aos tecidos (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012).

As inflorescências constituem um dos explantes mais promissores para o cultivo *in vitro* de palmeiras, uma vez que pode existir mais de 3.000 meristemas florais em cada inflorescência (Eeuwens; Blake, 1977; Verdeil *et al.*, 1994). Neste caso, as ráquulas ou mesmo os ovários isolados são empregados com o objetivo de obter a reversão dos meristemas florais para gemas vegetativas ou embriões somáticos. Bons resultados foram obtidos em estudos utilizando inflorescências, como em coqueiro (Verdeil *et al.*, 1994), dendezeiro (Teixeira *et al.*, 1994; Guedes *et al.*, 2011), juçara (Guerra; Handro, 1988) e pupunheira (Steinmacher *et al.*, 2007).

O cultivo de ápices caulinares tem sido pouco frequente em palmeiras, tendo em vista o crescimento monopodial que provocaria a eliminação da planta doadora de explante, como é o caso, por exemplo, do coqueiro, dendezeiro e da própria macaúba. Já, em plantas que produzem afillhos na base do estipe como a pupunheira, a tamareira e o açazeiro, os ápices caulinares podem representar uma importante fonte de explante (Stein, 1988; Aslam *et al.*, 2011; De-Almeida *et al.*, 2012). Um exemplo do uso de ápices caulinares foi relatado por Sharma *et al.* (1984) na obtenção de embriões somáticos a partir de calos originados de ápices caulinares de tamareira (*Phoenix dactylifera* L.).

2.3 Conservação de germoplasma

A conservação de germoplasma pode ser realizada mediante duas estratégias: a conservação *in situ* e a *ex situ* (Vijayan *et al.*, 2011). A conservação *in situ* se dá por meio da manutenção dos recursos genéticos no seu ambiente natural permitindo a evolução natural das populações (Fernandez; González-Marténez, 2009). É uma técnica essencial para as espécies que estão em vias de extinção, parentes silvestres de plantas cultivadas, espécies arbóreas, bem como para aquelas cuja conservação *ex situ* não é exequível e eficaz (Arora, 1991).

A conservação *ex situ* é a manutenção da diversidade biológica fora do seu hábitat natural (Engelmann, 1991). Nesse tipo de conservação incluem-se métodos como o armazenamento de sementes, bancos de germoplasma no campo e a criopreservação (Rao, 2004).

A conservação de sementes é considerada uma das formas mais eficientes de preservação de germoplasma *ex situ* de plantas (Engels; Engelmann, 1998; Jain, 2011). Contudo, o armazenamento de sementes não pode ser aplicado a todas as espécies de plantas com a mesma eficácia, pois, cada espécie possui características próprias quanto à tolerância à temperaturas reduzidas e baixa umidade, fatores determinantes para a conservação (Rajanaidu; Ainul, 2013).

Segundo Ellis e Roberts (1980), o período ideal para o armazenamento das sementes está relacionado com o teor de umidade e com a temperatura que as sementes serão conservadas. Em geral, a longevidade de armazenamento aumenta logaritmicamente com a diminuição do conteúdo de umidade, apesar de existir limites de dessecação, abaixo dos quais, são prejudiciais para as sementes (Buitink *et al.*, 2000). Outro aspecto importante é a diferença significativa entre o teor de água da semente inteira e a do embrião que é mantido após a dessecação, fator que pode resultar na falha de armazenamento em temperaturas negativas (Rajanaidu; Ainul, 2013).

As respostas fisiológicas relacionadas com a tolerância das sementes a dessecação e ao resfriamento classificaram as sementes em três categorias: ortodoxas; recalcitrantes e intermediárias (Ellis *et al.*, 1990). Para as arbóreas, Bonner (1990) sugere a divisão da categoria ortodoxa em duas: ortodoxas verdadeiras e subortodoxas. As sementes classificadas como ortodoxas verdadeiras podem ser dessecadas a teores baixos de umidade (5% ou menos) sem que ocorram danos celulares, além delas tolerarem o armazenamento em baixas temperaturas por longos períodos, com pouca ou nenhuma perda de viabilidade (Bonner,

1990; Engelmann, 2004). Esse tipo de semente ocorre em cerca de 75 a 80% das espécies de angiospermas (Pritchard; Dickie, 2002).

As sementes subortodoxas podem ser armazenadas nas mesmas condições que as ortodoxas verdadeiras, no entanto, por períodos menores. Os autores relataram que uma das causas da redução da viabilidade ao longo do tempo seria o elevado teor de lipídio presente em algumas sementes (Bonner, 1990, 2008). Já, as intermediárias são produzidas por 10 a 15% das angiospermas (Pritchard; Dickie, 2002) e são moderadamente sensíveis à dessecação, ou seja, toleram a perda de água suficiente para evitar a formação de cristais de gelo, porém, não toleram o resfriamento por longos períodos, tornando suscetíveis a lesões causadas pela temperatura (Ellis *et al.* 1991).

As sementes recalcitrantes possuem alto teor de umidade e são sensíveis à perda de água, não sobrevivendo quando submetidas às mesmas condições utilizadas para armazenar as sementes ortodoxas (Walters *et al.*, 2013). Essas sementes são comumente pertencentes a espécies não pioneiras, que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em ambientes úmidos como florestas, e a proporção diminui quando o ambiente se torna mais seco e frio (Tweddle *et al.*, 2003).

O armazenamento em longo prazo do germoplasma de espécies que possuem sementes recalcitrantes e intermediárias é exequível por meio da tecnologia criogênica (Engelmann, 2011). Apesar da técnica de criopreservação ser relativamente antiga e bem estudada na área microbiológica e animal, os estudos de criopreservação com vegetais têm sido conduzidos apenas durante os últimos quarenta anos (Panis; Lambardi, 2006) e, no caso específico das palmeiras, são ainda mais escassos

A criopreservação é um método de conservação de germoplasma que consiste na manutenção do material vegetal sob temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido (-196 °C) (Rajanaidu; Ainul, 2013), na presença ou ausência de substâncias crioprotetoras (Engelmann, 2004). Nessa temperatura, os únicos estados físicos existentes são o cristalino e o vítreo e, em ambos, a viscosidade é muito elevada (Karth, 1985). A energia cinética molecular e a difusão são extremamente baixas e, em consequência, as divisões celulares e os processos metabólicos ocorrem muito lentamente, permitindo a conservação por período indeterminado (Bekheet, 2011; Vijayan *et al.*, 2011; Engelmann; Dussert, 2013).

Na criopreservação, os riscos de perda do material biológico e a variabilidade genética do material armazenado são menores. Aliado a estes aspectos, um banco criogênico requer pouca manutenção se comparado a outros sistemas disponíveis, as culturas são armazenadas

em um espaço reduzido e protegidas de contaminação (Razdan, 2003; Santos, 2004; Engelmann; Dussert, 2013).

Além das sementes, a criopreservação permite preservar por longos períodos variados tipos de explantes, como ápices e gemas, embriões zigóticos e somáticos, células em suspensão, tecidos com características específicas como linhagens de células medicinais, tecidos geneticamente transformados e linhagens competentes a transformação (Panis; Lambardi, 2006). De modo geral, materiais como sementes ortodoxas ou brotos dormentes podem ser criopreservados sem qualquer pré-tratamento, o que é atribuído ao processo natural de dessecação destes. Porém, a maior parte dos explantes criopreservados (células em suspensão, calos, ápices caulinares e embriões) é constituída de alto teor de umidade, o que os tornam mais sensíveis às lesões causadas durante o congelamento. Por essa razão, a dessecação artificial para proteger dos danos ocasionados pela cristalização da água é indispensável, o que pode ser conseguido pelo uso de protocolos de criopreservação clássicos e àqueles baseados na vitrificação (Miaja *et al.*, 2000).

Essa tecnologia tem avançado significativamente nas últimas décadas, principalmente para as culturas tropicais (Reed, 2008), que promovem a diversificação dos seus métodos e permitem ampliar seus usos (Whithers; Engelmann, 1998). No entanto, embora existam vários procedimentos criogênicos para diferentes espécies, o emprego rotineiro da criopreservação na biodiversidade vegetal é ainda considerado limitado (Panis; Lambardi, 2006; Engelmann; Dussert, 2013).

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU AG, PRIOLLI RHG, AZEVEDO-FILHO JÁ, NUCCI SM, ZUCCHI MI, COELHO RM; COLOMBO CA. (2012). The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Genetics and molecular biology*, 35(1): 119-21.
- AHÉE J, ARTHUIS P, CAS G, DUVAL Y, GUÉNIN G, HANOWER J, HANOWER P, LIEVOUX D, LIORET C, MALAURIE B, PANNETIER C, RAILLOT D, VARECHON C, ZUCKERMAN L. (1981) La multiplication vegetative *in vitro* du palmier à huile par embriogenèse somatique. *Oléagineux*, 36(3): 113-117.
- ARORA RK. (1991). Plant diversity in the Indian gene center, 25-44p. In: PARODA RS, ARORA, R.K. (Eds.), Plant Genetic Resources: Conservation and Management. *International Board for Plant Genetic Resources (NBPGR)*, New Delhi, India, 392p.
- ASLAM J, KHAN SA, CHERUTH A.J, MUJIB A, SHARMA M.P, SRIVASTAVA P.S. (2011). Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(4): 369-380.
- BALZON TA, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. (2013). New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(1), 41–50.
- BEKHEET SA. (2011) *In Vitro* Conservation of Date Palm Germplasm. In: JAIN SM, AL-KHAYRI JM, JOHNSON DV. (eds.) *Date Palm Biotechnology*. Springer Netherlands, 337–360.
- BHOJWANI SS, DANTU PK. (2013). *Plant Tissue Culture: an Introductory Text*. Springer India, (1902): 39-50.
- BLERVACQ AS, LUCAU-DANILA A, COUILLEROT JP, MORCILLO F, ABERLENC-BERTOSSI F, HAWKINS S, TRANBARGER TJ, VERDEIL JL. (2012) Stem cell-like cells and plant regeneration. In: BERHARDT LV. (eds) *Advances in medicine and biology*. Nova Publishers, New York, 15:1-60.
- BONDAR G. (1964) *Palmeiras do Brasil*. São Paulo: Instituto de Botânica, São Paulo, 2: 550-554.
- BONNER F. (1990). Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. *Forest Ecology and Management*, 35:35-43.
- BONNER FT. (2008) Storage of seeds. 85-95p. In: *The woody plant seed manual*. Bonner FT, Karrfalt RP (eds.). USDA Forest Service, Agriculture Handbook. 727p.

- BUITINK J, LEPRINCE O, HEMMINGA MA, HOEKSTRA FA. (2000) Molecular mobility in the cytoplasm: an approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(5): 2385–2390.
- CUTTER VMJR, WILSON KS. (1954) Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development in vitro of embryos of *Cocos nucifera*. *Botanical Gazette*, 115(3): 234-240.
- DE-ALMEIDA M, DE-ALMEIDA CV, GRANER EM, BRONDANI GE, ABREU-TARAZI MF. (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant cell reports* 31(8):1495-1515.
- DURAND-GASSELIN T, LE GUEN V, KONAN K, DUVAL Y. (1990) Plantation en Côte-d'Ivoire de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.), obtenus para culture *in vitro*. Premiers résultats. *Oléagineux*, 45(1):1-9.
- EEUWENS CJ. (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissues explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera* L.) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 36(1): 23-28.
- EEUWENS CJ, BLAKE J. (1977) Culture of coconut and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta Horticulturae*. 78: 277–286.
- ELLIS RH, ROBERTS EH. (1980). Improved Equations for the Prediction of Seed longevity. *Annals of Botany* 45:13-30.
- ELLIS RH, HONG TD, ROBERTS EH. (1990) An intermediate category of seed storage behaviour? *Journal of Experimental Botany*, 41(230): 1167-1174.
- ELLIS RH, HONG TD, ROBERTS EH, SOETISNA U. (1991) Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research* 1:99-104.
- ENGELMANN F. (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica*, 57: 22-243.
- ENGELMANN F. (2004) Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant*, 40(5): 427-433.
- ENGELMANN F. (2011). Cryopreservation of Embryos: An Overview In: Trevor A, Thorpe; Edward C, Yeung (eds.). *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, v.710.
- ENGELMANN F, DUSSERT S. (2013) Cryopreservation. In: Normah et al. (eds.). *Conservation of Tropical Plant Species*, 107-119p.
- ENGELS JMM, ENGELMANN F. (1998) *Botanic gardens and agricultural genebanks: building on complementary strengths for more effective global conservation of plant*

- genetic resources*. Proc. Fifth international botanic gardens conservation congress, Kirst- Enbosch, South Africa, 14-18p.
- FEHÉR A, PASTERNAK T, DUDITS D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 201-228.
- FEHÉR A. (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, 52(1):53-56.
- FERNANDEZ J, GONZÁLEZ-MARTÉNEZ SC. (2009) Allocating individuals to avoid inbreeding in *ex situ* conservation plantations: so far, so good. *Conservation Genetics*, 10:45-57.
- FERNANDO SC, VERDEIL JL, HOCHER V, WEERAKOON LK, HIRIMBUREGAMA K. (2003) Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 72: 281-284.
- GELDNER N, HAMANN T, JURGENS G. (2000) Is there a role for auxin in early embryogenesis? *Plant Growth Regulation*, 32: 187-191.
- GUEDES RS, DA-SILVA TL, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE (2011) Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. *African Journal of Biotechnology*, 10(52):10774-10780.
- GUERRA MP, HANDRO W. (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* mart. (Palmae). *Plant Cell Report*, 7:550-552.
- GUERRA MP. (1989) *Embriogênese somática em Euterpe edulis Mart. (Palmae)*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, USP, SP. 233p.
- GUERRA MP, TORRES AC, TEIXEIRA JB. (1999) Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES AC, CALDAS LS, BUSO JA. (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília, Embrapa-CBAB. 2:533-568.
- GUEYE B, MORCILLO F, COLLIN M, GARGANI D, OVERVOORDE P, ABERLENC-BERTOSSI F, TRANBARGER TJ, SANE D, TREGGAR JW, BORGEL A, VERDEIL J. (2009) Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(1): 35-45.
- HABERLANDT G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien, Math Naturwiss, 111:69-92. In: VASIL IK. (2008) *A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops*. *Plant Cell Reports*, 27:1423–1440.

- HENDERSON A, GALEANO G, BERNAL R. (1995) *Field Guide to the Palms of the Americas*. New Jersey: Princeton University, 166-167p.
- HIANE PA, FILHO MMR, RAMOS MIL, MACEDO MLR. (2005) Óleo da polpa e amêndoa de bociúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. caracterização e composição em ácido graxos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8(3): 256-259.
- JAIN SM. (2011) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118: 153-166.
- JIMÉNEZ VM, GUEVARA E, HERRERA J, BANGERTH F. (2005) Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 23(8):567–572.
- KALIL-FILHO NA, RESENDE MDV. (2001) *Melhoramento de Palmáceas* IN: RESENDE, MDV. Workshop de melhoramento de espécies florestais e palmáceas no Brasil. Colombo, PR. Embrapa, Documentos 62p.
- KARTHA KK. (1985) *Meristem culture and germplasm preservation*. In: KARTHA, K.K. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton, Florida, CRC Press, 115-134p.
- KERBAUY GB. (1999) *Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas*. In: TORRES AC, CALDAS LS; BUSO JA. (Org.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. 1ªed. Brasília: Serviço de Produção de Informação-SPI (Embrapa), 2: 519-531.
- LEDO AS, LAMEIRA OA, MENEZES IC. (2002) *Embriogênese somática e regeneração de plantas em açaizeiro*. Rio Branco: Boletim de Pesquisa-Embrapa Acre, 34: 22.
- LORENZI H. (1992) *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 352p.
- LORENZI GMAC. (2006) *Acrocomia aculeata (Lodd.) ex Mart. – Arecaceae: Bases para o extrativismo sustentável*. Curitiba: Tese, Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, 172p.
- LORENZI H, NOBLICK L, KAHN F, FERREIRA E. (2010) *Flora Brasileira: Arecaceae (Palmae)*. Instituto Plantarium, Nova Odessa, Brasil, 394p.
- MARTINS RC. (2012) *A família arecaceae (Palmae) no estado de Goiás: florística e etnobotânica*. Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 297p.
- MIAJA ML, GRIBAUDO I, VALLANIA R, FERNANDEZ LF. (2000) Low temperature storage and cryopreservation of a *Vitis vinifera* L. germplasm collection: first results. *Acta Horticulturae*, 538: 177-181.

- MIRISOLA-FILHO LA. (2009) *Cultivo e Processamento do coco macaúba para produção de biodiesel*. Viçosa, Centro de Produções Técnicas, 336p.
- MOTTA PEF, CURI N, OLIVEIRA-FILHO AT, GOMES JBV. (2002) Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedagógicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(7): 1023-1031.
- MOURA EF, MOTOIKE SY, VENTRELLA MC, SÁJÚNIOR AQ, FERREIRA MC, CARVALHO M. (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, 119: 447-454.
- MUNIRAN F, BHORE SJ, SHAH FH. (2008) Micropropagation of *Elaeis guineensis* Jacq. 'Dura': Comparison of three basal media for efficient regeneration. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46:79-82.
- MURASHIGE T, SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-49.
- PANIS B, LAMBARDI M. (2006) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE J, SONNINO A. (eds.) *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. FAO, Corporate Document Repository, 61-78p.
- PRITCHARD HW, DICKIE JB. (2002) *Predicting Seed Longevity: the use and abuse of seed viability equations*. Seed Conservation Department, Royal Botanic, chapter 35, 653-722p.
- RAJANAIDU N, AINUL MM. (2013) *Advanced biotechnology and breeding centre, malaysian palm oil board* In: Normah MN, Chin HF, Reed BM. (Eds.) *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer, New York.
- RAO NK (2004) Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal Biotechnology*, 3(2):136-145.
- RAZDAN M.K. (2003) Germplasm conservation. In: *Introduction to plant tissue culture*. Second Edition. Science Publishers, 287-306p.
- REED BM, DUMET D, DENOMA JM, BENSON EE. (2001) Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes L.* *Biodiversity and Conservation* 10: 939-949.
- RIBEIRO LM, OLIVEIRA DMT, GARCIA QDS. (2011) Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, *Arecaceae*) during in vitro germination. *Trees*, 26(3):851-863.

- RODRIGUES HS. (2007) *Obtenção de ésteres etílicos e metílicos , por reações de transesterificação , a partir do óleo da palmeira Latino Americana macaúba - Acrocomia aculeata*. Tese de doutorado, Departamento de Química, Universidade de São Paulo, USP. 1–236p.
- RODRIGUES-JUNIOR AG, OLIVEIRA TGS, DE-SOUZA PP, RIBEIRO LM. (2013) Water uptake and pre-germination treatments in macaw palm (*Acrocomia aculeata* - Areaceae) seeds. *Journal of Seed Science*, 35(1): 99-105.
- SALDANHA CW, MARTINS-CORDER MP, STEINMACHER DA, GUERRA MP. (2006) *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* Martius (Areaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6:228-235.
- SANÉ D, ABERLENC-BERTOSSI F, GASSAMA-DIA YK, SAGNA M, TROUSLOT MF, DUVAL Y, BORGEL A. (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany*, 98: 301-308.
- SANÉ, D. ABERLENC-BERTOSSI F, DIATTA LID, GUÈYE B, DAHER A, SAGNA M, DUVAL Y, BORGEL A. (2012) Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. *The Scientific World Journal*, 2012: 1-8.
- SANO EE, ROSA R, BRITO JLS, FERREIRA LG, BEZERRA HS. (2009) Mapeamento da cobertura vegetal natural e antrópica do bioma Cerrado por meio de imagens Landsat ETM. *Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*, Natal, Brasil, INPE, 1199-1206p.
- SANTOS HTL. (2011) *Avaliação da torta de macaúba como insumo para produção de bioetanol*. UFVJM. Dissertação de Mestrado, Diamantina-MG, 85p.
- SANTOS IRI. (2004) Criopreservação de eixos embrionários de espécies de *Citrus* usando encapsulamento e desidratação. *Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 17p.
- SCARIOT AO, LLERAS E, HAY JD. (1991) Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. *Biotropica* 23: 12-22.
- SCARIOT A. (1998) Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. *Principes*, 42: 5-8.
- SCHERWINSKI-PEREIRA JE, GUEDES RS, SILVA RA, FERMINO PCP JR, LUIS ZG, FREITAS EO. (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in açaí palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, Doi: 10.1007/s11240-012-0115-z.

- SHARMA DR, DAWRA S, CHOUDHURY JB. (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadravi through tissue culture. *Indian Journal Experimental of Biology*, 22: 596-598.
- SILVA DB, SILVA AS, JUNQUEIRA NTV, ANDREADE RM. (2001) *Frutas do Cerrado*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 179p.
- SILVA, P. O. RIBEIRO LM, SIMÕES MOM, LOPES PSN, FARIAS TM, GARCIA QS. (2013) Fruit maturation and in vitro germination of macaw palm embryos. *African Journal of Biotechnology*, 12(5):446-452.
- STEIN RLB. (1988) *Efeito de Pseudomonas spp. fluorescentes no controle "in vitro" de fungos do solo e no desenvolvimento do tomateiro (Lycopersicon esculentum Mill)*. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 176p.
- STEINMACHER DA, CANGAHUALA-INOCENTE GC, CLEMENT CR, GUERRA MP. (2007) Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 43:124-132.
- SUGIMOTO K, GORDON SP, MEYEROWITZ EM. (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology*, 21(4):212-218.
- TAHIR M, STASOLLA C. (2006) Shoot apical development during in vitro embryogenesis. *Canadian Journal of Botany*, 84:1650-1659.
- TASSARO H. (1996) *Frutas no Brasil*. São Paulo: Empresa das Artes.
- TEIXEIRA, J.B.; SONDAHLL, M.R.; KIRB, E.G. (1993) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 227-233.
- TEIXEIRA JB, SONDAHL MR, KIRBY EG. (1994) Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports*, 13(5):247-250.
- TICKEL J. (2000) *From the Fryer to the Tank: The Complete Guide to using Vegetable Oil as an Alternative Fuel*. Tickel Energy Consulting, Tallahassee, FL. Disponível em <<http://www.chanvre-info.ch/info/en/The-Complete-Guide-to-Using.html>>. Acessado em: 24/7/2012 às 21:51:01.
- THOMPSON DS. (2008) Space and time in the plant cell wall: relationships between cell type, cell wall rheology and cell function. *Annals Botany*, 101(2):203-211.
- TOMLINSON PB. (2006) The uniqueness of palms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151: 5-14.

- TWEDDLE JC, DICKIE JB, BASKIN CC, BASKIN JM. (2003). Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology* 91(2):294-304.
- VASIL V, VASIL IK. (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* x *P. purpureum* hybrid. *American Journal of Botany*, 68(6): 864-872.
- VERDEIL JL, HUET C, GROSDÉMANGE F, BUFFARD-MOREL J. (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 13:218-221.
- VERDEIL JL, ALEMANNI L, NIEMENAK N, TRANBARGER TJ. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *TRENDS in Plant Science*, 12(6):245-252.
- VIJAYAN K, SARATCHANDRA B, TEIXEIRA JAIME A. (2011) Germplasm conservation in mulberry (*Morus* spp.). *Scientia Horticulturae*, 128(4):371–79.
- VIÑAS M, JIMÉNEZ VM. (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIII(2):229-242.
- WALTERS C, BERJAK P, PAMMENTER N, KENNEDY K, RAVEN P. (2013) Preservation of recalcitrant seeds. *Science*, 339(6122):915-16.
- WHITHERS L, ENGELMANN F. (1998) *In vitro* conservation of plant genetic resources. *Agricultural biotechnology*, 57-88p.
- ZHAO J, CUI J, LIU J, LIAO F, HENNY RJ, CHEN J. (2012) Direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Spathiphyllum* ‘Supreme’ and analysis of regenerants using flow cytometry. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 110:239-249.
- ZHURAVLEV YN, OMELKO AM. (2008) Plant morphogenesis *in vitro*. *Russian Journal Plant Physiology*, 55(5): 579-596.
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411- 1423, 1993.

CAPÍTULO I

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS

RESUMO

Um protocolo de regeneração de plantas via embriogênese somática foi desenvolvido utilizando embriões zigóticos maduros de macaúba (*Acrocomia aculeata*) como explante inicial. Para indução de calos embriogênicos (CE), foram testados dois meios básicos (MB) composto pelos sais de Murashige e Skoog (MS) e de Eeuwens (Y3) com 3% de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina e 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel. As auxinas ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foram adicionadas aos meios de cultura nas concentrações de 0,0, 1,5 e 3,0 mg.L⁻¹. Após 240 dias, os CE foram transferidos para os respectivos meios MB com concentrações de auxinas reduzidas para 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ visando a diferenciação de embriões somáticos (ES). A regeneração de plantas foi realizada em MB desprovido de reguladores de crescimento. Calos embriogênicos foram observados aos 180 dias de cultivo em todos os tratamentos. O meio Y3 apresentou melhores resultados na formação de calos embriogênicos (60,8%). Esses calos apresentaram coloração amarelada, consistência compacta e aspecto nodular. Após 60 dias, em meio de diferenciação, verificou-se ES em diferentes fases de desenvolvimento. A análise histológica evidenciou que os ES foram formados a partir de calo embriogênico nodular. Os ES, em geral, apresentaram origem unicelular com formação de suspensor e, ao final do desenvolvimento, observou-se embriões bipolares. A frequência de regeneração de plantas atingiu valores de até 31,9%, quando se utilizou meio de indução constituído por Y3 associado a 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e, posterior redução da auxina para 0,5 mg.L⁻¹ na fase de diferenciação. As plantas regeneradas apresentaram desenvolvimento normal, com crescimento de raízes e parte aérea.

Palavras-chave: palmeira, embriões somáticos, auxinas, regeneração de plantas.

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION IN MACAW PALM [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] FROM ZYGOTIC EMBRYOS

ABSTRACT

A protocol for plant regeneration via somatic embryogenesis was developed using mature macaw palm (*Acrocomia aculeata*) zygotic embryos as initial explant. For induction of the embryogenic calli (EC), we tested two basic media (BM) consisting of Murashige and Skoog (MS) and Eeuwens (Y3) salts with 3% sucrose, 0.5g.L⁻¹ glutamine and 2.5 g L⁻¹ Phytigel. The 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (Dicamba), 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) and 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) auxins were added to the culture media at concentrations of 0, 1.5 and 3.0 mg L⁻¹. After 240 days, the EC were transferred to the respective BM media with auxin concentrations reduced to 1.0 to 0.5 mg L⁻¹ in order to differentiate the somatic embryos (SE). Plant regeneration was performed on the BM media without growth regulators. Embryogenic calli were observed after 180 days of cultivation and in all treatments. The Y3 medium showed the best embryogenic callus formation results (60.8%). These calli showed yellowish coloration, compact consistency and nodular aspect. After 60 days in differentiation medium, SEs were verified in different stages of development. Histological analysis showed that the SEs were formed from a nodular embryogenic callus. The SEs generally presented unicellular origin with suspensor formation, and at the end of development, bipolar embryos were observed. The plant regeneration frequency reached levels up to 31.9% when using induction medium consisting of Y3 associated to 1.5 mg L⁻¹ of 2,4-D and the subsequent auxin reduction to 0.5 mg L⁻¹ in the differentiation stage. Regenerated plants showed normal development, with of root and areial part growth.

Keywords: palm, somatic embryos, auxin, plant regeneration.

1. INTRODUÇÃO

A macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius] é uma palmeira pertencente à família Arecaceae que pode atingir mais de 15 metros de altura (Tassaró, 1996). Esta espécie é nativa das savanas e florestas abertas da América Tropical e Subtropical ocorrendo em muitas áreas antropizadas (Clement *et al.* 2005). No Brasil, é considerada uma das palmeiras de maior dispersão, com ocorrência de populações naturais em praticamente todo o território (Lorenzi, 2006).

Esta palmeira pode apresentar produção de óleo de até 5000 Kg por hectare/ano (Tickel, 2000), valor que se assemelha aos melhores genótipos de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) atualmente plantados (Vargas, 2007). Esses fatores caracterizam-na como uma das espécies de maior produtividade de óleo vegetal no mundo, com a vantagem de poder ser explorada num prazo superior a cinquenta anos (Teixeira, 2005). Além do potencial para produção de óleos, essa espécie se destaca por ser de ampla distribuição territorial e poder ser cultivada em variadas condições edafoclimáticas (Motta *et al.* 2002) que são inviáveis para o plantio de outras oleaginosas como dendezeiro e o coqueiro (Arkcoll, 1990).

No entanto, a propagação da macaúba ocorre exclusivamente por sementes, e essa técnica apresenta desvantagens como germinação lenta, que pode demorar de um a dois anos (Lorenzi, 2006) e há a formação de plantas heterogêneas, o que acarreta plantios desuniformes. Além disso, esta espécie não forma afilhos ou rebentos, impedindo que sua multiplicação seja feita vegetativamente por métodos convencionais (Moura *et al.* 2009).

Neste contexto, a embriogênese somática surge como uma excelente alternativa para a multiplicação clonal desta espécie (Moura *et al.* 2009), seja para a produção de populações mais homogêneas ou para acelerar programas de melhoramento genético por meio da clonagem de híbridos. Nessa técnica, células somáticas diferenciadas ou indiferenciadas tornam-se determinadas a seguir rotas de morfogênese e desenvolver embriões somáticos (Gueye *et al.*, 2009) sem que ocorra a fusão de gametas.

Até o presente momento, apenas um trabalho descreve a embriogênese somática da macaúba a partir de embriões zigóticos (Moura *et al.* 2009). Entretanto, os resultados obtidos demonstram deficiências nas fases de maturação e no desenvolvimento dos embriões somáticos, com raros casos de regeneração e frequência elevada de plantas anormais. Dessa

forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de macaúba.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Embriões zigóticos obtidos a partir de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*) foram utilizados como fonte de explantes. As sementes foram extraídas de frutos em estágio fisiológico maduro, caracterizado por mesocarpo com consistência macia e coloração amarelada. Os frutos foram coletados de populações naturais localizadas próximas ao Setor Habitacional Fercal em Sobradinho, Distrito Federal, Brasil (Anexo 1).

Após a coleta, os frutos foram processados manualmente para a retirada do epicarpo e armazenados por 15 dias em estufa de circulação de ar a 35 °C para secagem. Em seguida, o endocarpo foi quebrado com o auxílio de um torno manual para retirada das sementes.

Em câmara de fluxo laminar, a desinfestação das sementes foi realizada por meio da imersão em álcool etílico 70 % (v/v) durante três minutos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 30 minutos. Posteriormente, foram efetuadas três enxágues sucessivos em água destilada e autoclavada, por um minuto cada, para retirar o excesso de NaOCl. As sementes foram então seccionadas, e os embriões extraídos com auxílio de bisturi, alicate e pinça de ponta fina.

Para os estudos da embriogênese somática em macaúba, os experimentos foram divididos em quatro fases: indução de calos; diferenciação de embriões somáticos; maturação e sincronização de embriões e regeneração de plantas. Os componentes dos meios de cultura utilizados nas diferentes fases da embriogênese somática em macaúba podem ser visualizados na Tabela 1.

2.2 Indução de calos

Para a fase de indução, embriões zigóticos foram inoculados em dois meios de cultura, denominados meios basais (MB). O primeiro meio foi composto pelos sais de MS (Murashige e Skoog 1962) e o segundo pelos sais do meio Y3 (Eeuwens 1976). A fonte de ferro e vitaminas foi mantida de acordo com a concentração original de MS. As auxinas dicamba, picloram e 2,4-D foram acrescentadas nas concentrações de 0,0, 1,5 e 3,0 mg.L⁻¹.

Todos os meios foram suplementados com 3% de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, sendo gelificados com 2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO). Durante a fase de

indução, os explantes foram cultivados em placas de *Petri* (15 x 90 mm) e armazenados no escuro, em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por 240 dias.

Os subcultivos foram realizados mensalmente e aos 90 e 180 dias foi determinada a percentagem de explantes com formação de calo primário e calo embriogênico, respectivamente. A determinação do percentual de calos foi obtida por meio da quantidade de explantes contendo calo, divididos pela quantidade total de explantes por placa e multiplicados por 100.

2.3 Diferenciação de embriões somáticos

Os calos obtidos na indução foram transferidos para meio de diferenciação (MD) de embriões somáticos (ES). O meio consistiu na redução das concentrações das auxinas utilizadas na indução (1,5 e 3,0 mg.L⁻¹) para 0,5 mg.L⁻¹ (MDI) e 1,0 mg.L⁻¹ (MDII), conservando os MB de origem (Tabela 1).

Nesta fase, os agregados embriogênicos foram cultivados em frascos tipo Magenta (77 x 77 x 97 mm), que continham 45 mL de meio de cultura e vedados com filme de PVC transparente, sendo mantidos no escuro em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por 90 dias.

Os subcultivos foram realizados a cada 45 dias, e a cada subcultivo foi determinado o número de ES por explante.

2.4 Sincronização e maturação de embriões somáticos

Após 90 dias em meio de diferenciação, os explantes foram transferidos para os respectivos MB, adicionados de vitaminas de MS, 4,5% de sacarose, 500 mg L⁻¹ de glutamina e gelificado com 2,5 g L⁻¹ de *Phytigel*. Nesta fase, os meios de cultura foram desprovidos de reguladores de crescimento. Os explantes permaneceram nessa condição por 60 dias em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, na ausência de luz.

2.5 Regeneração de plantas

Para a regeneração de plantas, explantes com embriões somáticos diferenciados foram inoculados em meio de regeneração constituído por MB contendo 3% de sacarose, 0,5 g.L⁻¹

de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e gelificado com 2,5 g.L⁻¹ de *Phytigel* por aproximadamente 45 dias, até o desenvolvimento de radícula e parte aérea. As plântulas obtidas foram transferidas para meio desprovido de carvão ativado para o desenvolvimento e crescimento. As plântulas que se apresentaram fundidas umas às outras foram isoladas antes da transferência para o meio de regeneração.

As plantas, mantidas nas condições descritas acima, que continham raiz, primeiro eófilo e altura superior a 0,5 cm foram selecionadas para a aclimatização. Essas plantas foram lavadas em água corrente para remoção dos resíduos do meio de cultura e o plantio foi realizado em copos plásticos de 300 mL, perfurados e contendo substrato Bioplante (Nova Ponte, MG) e areia (1:1). Após o plantio, os copos plásticos foram cobertos com pequenos sacos plásticos transparentes individuais e fixados com barbante, a fim de evitar a desidratação dos brotos e mantidos em câmara incubadora a 25 °C por 30 dias. A cada semana foi feita uma abertura no saco plástico, cada vez maior, até que as plantas estivessem aclimatizadas as condições ambientais (cerca de 14 dias). Posteriormente, as plantas foram transferidas para casa de vegetação.

Todos os meios utilizados nesse trabalho tiveram seu pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ seguido de autoclavagem por 121 °C por 20 minutos e a 1,1 atm de pressão.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura e períodos (semanas) utilizadas no processo de embriogênese somática de macaúba (*Acrocomia aculeata*),

Componentes	Indução de calos (32 semanas)	Diferenciação de embriões somáticos (12 semanas)	Sincronização e maturação (8 semanas)	Regeneração de plantas (> 5 semanas)
Meio de cultura	MS e Y3	MS e Y3	MS e Y3	MS e Y3
Vitaminas	MS	MS	MS	MS
Glutamina (mg.L ⁻¹)	500	500	500	500
Dicamba (mg.L ⁻¹)	0; 1,5 e 3,0	0,5 e 1,0	-	-
Picloram (mg.L ⁻¹)	0; 1,5 e 3,0	0,5 e 1,0	-	-
2,4-D (mg.L ⁻¹)	0; 1,5 e 3,0	0,5 e 1,0	-	-
Sacarose (%)	3,0	3,0	4,5	3,0
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,5	2,5	2,5	2,5
Carvão ativado (g.L ⁻¹)	-	-	-	2,5

2.6 Análise histológica

Para a análise de microscopia de luz, as amostras foram fixadas em solução de FAA 70% (paraformaldeído, álcool 70% e ácido acético) por um período mínimo de 24 horas, sob vácuo durante a primeira hora, seguida de desidratação em série alcoólica crescente (70 - 100%), e infiltradas em historesina (Leica®). Cortes seriados longitudinais e transversais (5 e 7 µm) foram obtidos em micrótomo rotatório manual, distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecedora a 40 °C. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (O' Brien, 1964) e montados com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os resultados foram registrados em microscópio acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram fixadas em karnovisk (Johansen, 1940) por 24 h, enxaguadas em tampão de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,1) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% e tampão cacodilato de sódio por 03 horas. Em seguida, elas foram lavadas três vezes em mesmo tampão de fixação, desidratadas em série etanólica crescente (25 a 100%) secadas ao ponto crítico com CO₂ e metalizadas com ouro-paládio. As observações e captação de imagem foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 962.

2.7 Análise estatística

Em todas as fases, os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado. Na fase de indução, as variáveis foram avaliadas segundo um esquema fatorial 2 x 3 x 3 (meio de cultura x auxinas x concentrações de auxina) totalizando 18 tratamentos. Na diferenciação de embriões somáticos, as variáveis foram analisadas segundo esquema fatorial 2 x 3 x 2 (meio de cultura x auxinas x concentrações) totalizando 12 tratamentos. Em todas as fases, os tratamentos foram compostos por cinco repetições contendo cinco explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (Ferreira, 2011). Dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{0.5}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de calos

Para a indução de calos foram utilizados embriões zigóticos (EZ) de macaúba recém extraídos das sementes, que apresentaram coloração esbranquiçada e com a região proximal mais estreita que a distal (cotilédone); medindo aproximadamente 6 mm de comprimento e 1 mm de largura (Figura 1A, B), foram inoculados em meio de cultura para indução de calos. Após uma semana de cultivo, verificou-se que os embriões responderam a todos os tratamentos testados. A resposta foi caracterizada pelo intumescimento dos EZ que, de maneira geral, duplicaram de tamanho.

Com exceção dos tratamentos controle, verificou-se que após 15 dias de cultivo, os EZ exibiram alargamento da região do mesocótilo e adquiriram coloração amarelada. Nessa fase, os explantes apresentavam tamanho de cerca de quatro vezes superior ao inicial, independentemente do tipo e da concentração de auxina testada, embora tal alargamento do mesocótilo tenha sido mais evidente nos explantes inoculados em meios de cultura contendo picloram.

Nesse estudo, a embriogênese somática seguiu um modelo indireto. A formação de calos iniciou após 30 dias de cultivo em meio de indução e ocorreu, principalmente, na região distal e no mesocótilo do EZ (Figura 1C-E). Os calos formados nessas duas regiões apresentaram diferenças morfológicas: os calos formados no mesocótilo foram compactos e de coloração amarelo-escura, enquanto que os da região distal possuíram aspecto friável e coloração esbranquiçada e ocorreu principalmente nas áreas em contato com o meio de cultura (Figura 1D, E). Nos tratamentos controles, sem auxina, verificou-se o alongamento do cotilédone e, em seguida, a germinação de 100% dos embriões (Figura 1F).

Diferenças morfológicas também foram observadas no padrão de resposta dos EZ às auxinas aplicadas. Em geral, os EZ inoculados em meio contendo picloram (Figura 1C), independente do MB e concentração, apresentaram crescimento cerca de duas vezes maior que aqueles inoculados em meio com 2,4-D (Figura 1D) e dicamba. Além disso, em meio com picloram, a formação de calo primário teve início na região do mesocótilo, mas somente após o intumescimento e aumento de pelo menos três vezes o tamanho inicial do EZ. Já nos tratamentos com 2,4-D e dicamba, embora os embriões também tenham apresentado

intumescimento antes do início do surgimento dos calos, esse aumento de tamanho foi inferior, além dos calos iniciarem sua formação mais precocemente.

Ao comparar o efeito dessas três auxinas em dendezeiro, Thuzar *et al.* (2011) observaram resultados superiores na formação de calos embriogênicos quando se utilizou 2,4-D, enquanto Moura *et al.* (2009), ao testarem o efeito de 2,4-D e picloram em macaúba, não observaram diferenças entre as auxinas na formação de calos. No entanto, segundo esses últimos autores, as diferenças tornaram-se evidentes na fase de diferenciação de embriões somáticos (ES), com os melhores resultados obtidos nos meios com picloram.

No presente trabalho a oxidação dos explantes foi discreta ou quase nula e, quando observada, ocorreu nas regiões de contato do explante com o meio de cultura. Esses resultados contrastam os encontrados por Moura *et al.* (2009), os quais relatam que os calos oxidaram e perderam a prolificidade quando cultivados em meio desprovido de carvão ativado.

A percentagem de calos primários formados foi analisada após 90 dias de cultivo. Nesse período, todos os tratamentos contendo auxina formaram calos primários. Para dicamba, a menor concentração ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$) foi a mais eficaz na indução de calos primários, com 60% a 75% em meio Y3 e MS, respectivamente. Em concentração mais elevada ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$), os explantes tenderam a apresentar leve oxidação e pouca formação de calos (25 a 30%). Nos tratamentos contendo picloram foi possível observar de 30% a 50% dos explantes com formação de calos nos meios de MS e Y3, respectivamente, resultados inferiores se comparados ao uso de 2,4-D e superiores ao dicamba (Tabela 2).

Em média, ao analisar a influência do meio básico, quanto à produção de calos primários não foram constatadas diferenças significativas. Em *Elaeis guineenses*, Thuzar *et al.* (2011) observaram que durante a fase de indução de calos, as auxinas exercem maior efeito do que os meios de cultura, sugerindo que nessa fase são elas que governam as respostas iniciais devido à forte pressão exercida nas células para a reprogramação celular e aquisição da competência embriogênica.

Aos 150 dias, os calos formados na região distal iniciaram a mudança da fase primária para a embriogênica. Esses calos exibiram ganho de pigmentação amarela e, posteriormente, progrediram para a formação de calos embriogênicos (CE) (Figura 1 G). Nessa etapa também foi observada a formação de estruturas nodulares, semelhantes a embriões somáticos nos calos formados a partir do mesocótilo (Figura 1 H). Essas estruturas foram mais evidentes nos tratamentos contendo picloram.

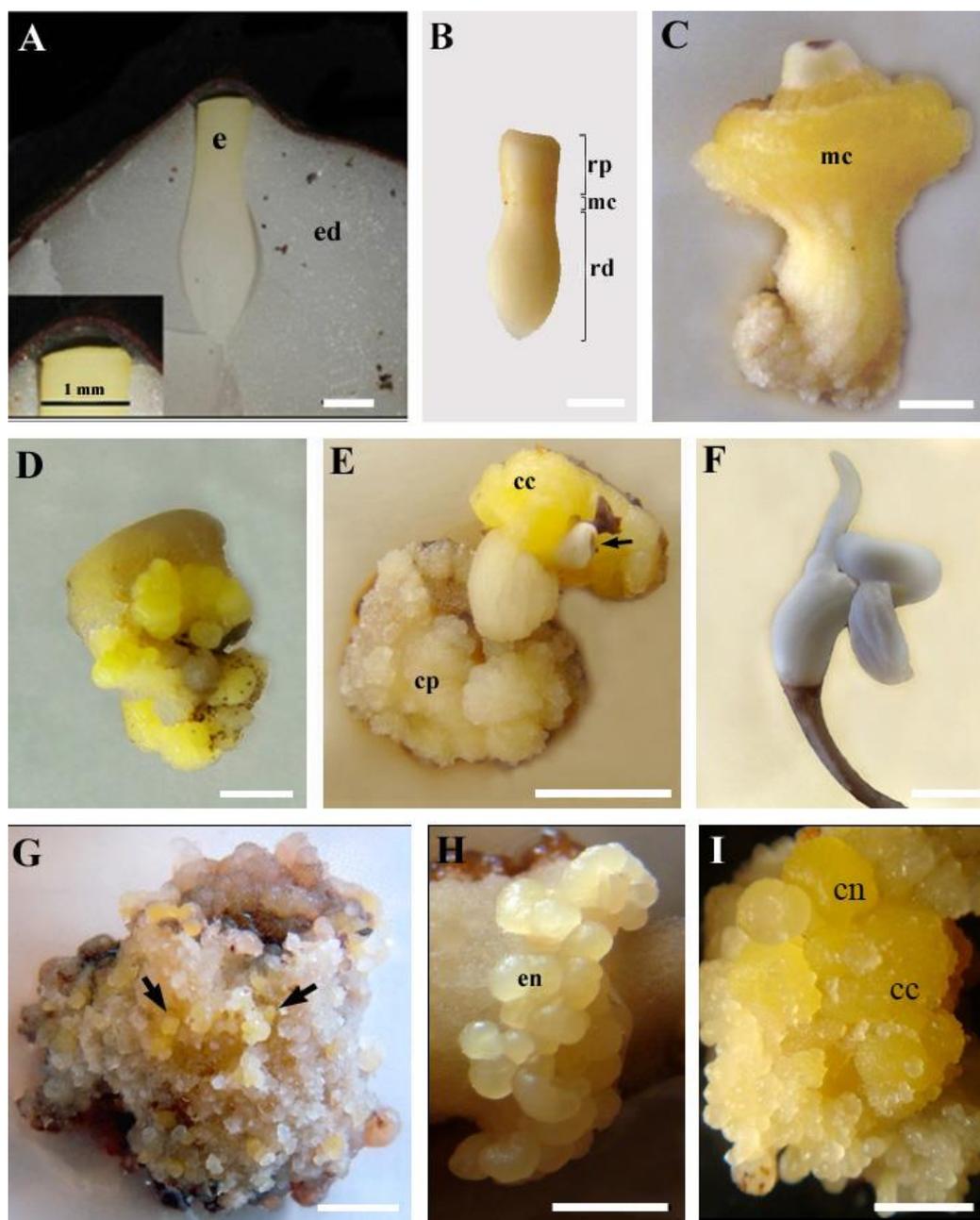


Figura 1. Estádios morfológicos da indução de calos durante a embriogênese somática de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Secção da semente de macaúba evidenciando o embrião zigótico inserido no endosperma. B: Detalhe da região proximal, distal e do mesocótilo do embrião zigótico. C: Embrião zigótico intumescido, apresentando início de formação de calo primário na região distal (seta) e calo compacto no mesocótilo, após 30 dias em meio contendo picloram. D: Embrião zigótico com formação de calo compacto amarelado, após 30 dias em meio com 2,4-D. E: Embrião zigótico apresentando calo primário na região distal e calo compacto no mesocótilo. F: Detalhe da germinação do embrião zigótico em meio desprovido de auxina. G: Calo primário apresentando início de formação de calo embriogênico (setas). H: Mesocótilo com estruturas nodulares aos 150 dias de cultivo. I: Calo embriogênico amarelado e nodular. Abreviações: (e) embrião zigótico, (ed) endosperma, (rp) região proximal, (mc) mesocótilo, (rd) região distal, (cp) calo primário, (cc) calo compacto, (en) estruturas nodulares. Escalas: A, B: 1 mm; C, D: 3 mm; E, F, G, H e I: 1cm.

Aos 180 dias de cultivo em meio de indução, foi possível observar a formação de CE em todos os tratamentos contendo auxina. Esses calos apresentavam coloração amarelada com duas regiões distintas: uma porção central com aspecto compacto e uma periférica nodular que se desprendiam com facilidade do explante (Figura 1I). Em meio de MS, resultados significativos foram obtidos apenas quando os explantes foram cultivados com 1,5 e 3,0 mg.L⁻¹ de dicamba e 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, com 75, 50 e 55% de explantes com CE, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito dos meios de cultura MS e Y3 e diferentes concentrações de dicamba, picloram e 2,4-D na percentagem de explantes com calos primários no 120° dia de cultivo e embriogênicos no 180° dia de cultivo em embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata*)

Meio	Concentração (mg L ⁻¹)	Calo primário (%)				Calo Embriogênico (%)			
		Dicamba	Picloram	2,4-D	Média *	Dicamba	Picloram	2,4-D	Média *
MS	0,0	0,0 cA	0,0 bA	0,0 bA		0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	
	1,5	75,0 aA	30,0 aB	60,0 aA	27,0 a	75,0 aA	25,0 bB	55,0 aA	39,2 b
	3,0	25,0 bA	25,0 aA	35,0 aA		50,0 aA	20,0 bB	10,0 bB	
Y3	0	0,0 cA	0,0 bA	0,0 bA		0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	
	1,5	60,0 aA	45,0 aA	60,0 aA	34,4 a	65,0 aA	60,0 aA	60,0 aA	60,8 a
	3,0	30,0 bA	50,0 aA	65,0 aA		35,0 bB	70,0 aA	75,0 aA	

Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada item, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, pertencem ao mesmo grupo a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Dados transformados segundo arco-seno. * Média excluindo o tratamento testemunha/controle

Em meio Y3 todas as auxinas testadas proporcionaram resultados para obtenção de CE, com exceção do tratamento contendo 3,0 mg L⁻¹ de dicamba, no qual se obteve valor significativamente inferior aos demais tratamentos, com 35% dos explantes com indução de CE.

Ao analisar a influência do meio de cultura, observaram-se influências significativas na indução de CE, uma vez que explantes cultivados em meio Y3 apresentaram, em média, 60,8% de formação de calos, valor superior ao observado em meio de MS, com 39,2% de explantes com CE (Tabela 2).

3.2 Diferenciação de embriões somáticos

Os calos embriogênicos formados no meio de indução foram transferidos para meios contendo baixas concentrações de auxinas, visando à conversão dos calos embriogênicos em embriões somáticos. Em *Cocos nucifera* L. a transferência para meio, com concentrações reduzidas de auxinas e adição de citocininas, aumentou o número de ES diferenciados (Fernando; Gamage, 2000). Outros trabalhos também relatam esse comportamento, após a redução da concentração da auxina utilizada na fase de indução de calos (Dias *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2012).

Aos 30 dias em meio de diferenciação, observou-se o desenvolvimento da massa embriogênica (Figura 2A). Nessa fase, foi possível visualizar estruturas globulares e translúcidas, caracterizando embriões somáticos em fase semelhante à globular. Após 60 dias em meio de diferenciação, verificaram-se vários embriões em fase globular, e outros em fase mais avançada (Figura 2B). Nessa etapa, os ES formados apresentavam-se morfológicamente normais. Na maioria dos casos, na base do embrião globular, observaram-se estruturas semelhantes ao suspensor da embriogênese zigótica (Figura 2B, detalhe) fazendo a conexão do embrião somático ao explante de origem. Nas fases seguintes à globular, o suspensor não foi mais observado, sugerindo sua absorção.

Aos 90 dias em meio de diferenciação, foi realizada avaliação do número de embriões somáticos formado por explante (Tabela 3). De maneira geral, as respostas relacionadas ao número de embriões formados foram significativamente mais elevadas em meio Y3 (5,7) em comparação com o de MS (0,6). Esses resultados sugerem que a composição do meio Y3 tenha sido mais eficiente na diferenciação de embriões somáticos. O meio Y3 foi descrito por Eeuwens (1976), que revelaram ser o mais indicado para a cultura *in vitro* de *Cocos nucifera*, se comparado Murashige e Skoog (1962), possivelmente, por essa espécie exigir altos níveis de potássio e iodo e menos nitrogênio.

Em meio Y3 contendo dicamba, observaram-se resultados superiores na diferenciação de embriões somáticos quando os CE, oriundos de ambas as concentrações de indução, foram transferidos para MDI. Nos tratamentos utilizando picloram, a concentração da auxina não influenciou a diferenciação dos ES. Já em 2,4-D, os CE induzidos em 1,5 mg.L⁻¹ apresentaram maior percentagem de conversão em embriões somáticos quando transferidos para MDII, enquanto aqueles induzidos em 3,0 mg.L⁻¹ diferenciaram mais em MDI, com número médio de 12,5 e 6,7 de embriões por explante, respectivamente.

Em meio de MS, somente o tratamento com dicamba em MDII, proveniente da concentração de 1,5 mg.L⁻¹, apresentou resultados significativos. Entretanto, não foi observado desenvolvimento e a germinação desses embriões, demonstrando que esse tratamento não é indicado para a regeneração de plantas de macaúba.

Tabela 3. Influência do meio de diferenciação e maturação sobre o número médio de embriões somáticos formados por explante e frequência de regeneração de plantas de macaúba (*Acrocomia aculeata*), após 90 dias em meio de regeneração.

MB	MI (mg L ⁻¹)	MD	Nº de embriões somáticos/calos			Média do Meio	Frequência de Regeneração*			Média do Meio
			Dicamba	Picloram	2,4-D		Dicamba	Picloram	2,4-D	
MS	1,5	MDI	0,0 cA	0,0 bA	0,0 bA	0,6 b	0,0 bA	0,0 bA	0,0 cA	0,0b
		MDII	5,0 bA	0,0 bB	0,0 bB		0,0 bA	0,0 bA	0,0 cA	
	3,0	MDI	1,5 cA	0,0 bA	0,0 bA		0,0 bA	0,0 bA	0,0 cA	
		MDII	0,0 cA	1,0 bA	0,0 bA		0,0 bA	0,0 bA	0,0 cA	
Y3	1,5	MDI	6,7 bA	4,7 aA	1,5 bB	5,7 a	13,0 aA	0,0 bB	0,0 cB	5,8a
		MDII	0,0 cB	6,3 aA	12,5 aA		0,0 bB	0,0 bB	31,9 aA	
	3,0	MDI	11,5 aA	10,3 aA	6,7 aA		9,1 aA	3,3 aB	12,5 bA	
		MDII	0,0 cB	6,7 aA	2,2 bB		0,0 bA	0,0 bA	0,0 cA	

Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada item, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, pertencem ao mesmo grupo a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Dados transformados segundo $(x + 1)^{0,5}$. MB: meio básico. MI: meio de indução. MD: meio de diferenciação. MDI: meio de diferenciação com 0,5 mg.L⁻¹ de

3.3 Sincronização e maturação de embriões somáticos

Em meio de diferenciação, calos e ES em diferentes fases de desenvolvimento foram observados em um mesmo explante, caracterizando um processo assincronizado. Em busca da sincronização e maturação dos ES, os explantes foram transferidos para novo meio de cultura, desprovidos de reguladores de crescimento e contendo concentração sacarose mais elevada (4,5%), visando melhorar a sincronização e a maturação. Segundo Ikeda-Iwai *et al.* (2003), períodos de estresse, como a desidratação durante o cultivo *in vitro*, podem promover aumentos nas taxas de indução, maturação e germinação de embriões somáticos. O tipo e a concentração de carboidratos no meio de cultura têm sido apontados como fatores que afetam

fortemente maturação e a conversão do embrião somático (Troch *et al.* 2009). Esses fatores são capazes de melhorar a maturação e a germinação porque podem simular o ambiente de desenvolvimento dos embriões zigóticos (Te-chato; Hilae, 2007). Shi *et al.* (2009) em trabalhos com *Cinnamomum camphora* L. verificaram que os melhores resultados para maturação de ES foram obtidos com concentrações variando de 20-50 g L⁻¹ de sacarose, enquanto concentrações mais elevadas, 70-90 g L⁻¹ de sacarose, proporcionaram diminuição no número médio de ES.

Nesse estudo, após 30 dias em meio de sincronização/maturação, os ES apresentaram-se mais desenvolvidos e com coloração esbranquiçada, enquanto as regiões com calos exibiram aspecto desidratado (Figura 2C), progredindo para uma intensa oxidação e necrose. Após 60 dias nessa condição, os ES foram visualizados em diferentes fases de desenvolvimento (Figura 2D). ES conectados aos explantes foram visualizados e apresentaram coloração branca e cotilédone (haustório) diferenciado, o que caracterizou o estágio cotiledonar (Figura 2E). Segundo Arnold *et al.* (2002), somente ES maduros e com morfologia normal foram capazes de acumular substâncias de reservas suficiente, e dessa forma, tolerar períodos de desidratação e serem convertidos em plantas normais.

3.4 Regeneração de plantas

A germinação dos ES ocorreu, em média, após 45 dias em meio de regeneração desprovido de auxinas, e foi constatada inicialmente pela expansão da região proximal do embrião, onde está inserido o eixo embrionário, seguida da protrusão da radícula (Figura 2F). Após o crescimento de pelo menos 1,0 cm da radícula ocorreu a emissão e desenvolvimento da parte aérea (Figura 2G). Em geral, os ES formados apresentaram-se isolados e, os que permaneceram unidos entre si e ao explante, foram separados e colocados para se desenvolver. O uso de meio de cultivo desprovido de reguladores de crescimento tem sido citado em vários trabalhos com palmeiras. Scherwinski-Pereira *et al.* (2012) e Silva *et al.* (2012) ao utilizarem meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento e contendo carvão ativado, obtiveram sucesso na germinação de ES em trabalhos realizados com as palmeiras *Euterpe oleraceae* e *Elaeis guineensis*, respectivamente.

Os tratamentos utilizados nas fases de indução, diferenciação e sincronização/maturação dos ES foram determinantes no sucesso da germinação e regeneração de plantas de macaúba. A frequência máxima de regeneração de plantas (31,9%)

foi obtida quando os ES foram induzidos em meio Y3 com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e transferidos para MDI (Tabela 3). Esses resultados corroboram os obtidos por Thuzar *et al.* (2011) em trabalhos com *Elaeis guineensis*, no qual, os autores também observaram a superioridade dos resultados com o uso do 2,4-D, comparativamente aos tratamentos com dicamba e picloram, visto que foi obtida germinação apenas dos ES induzidos em 2,4-D.

Diversos trabalhos relatando o sucesso da embriogênese somática em palmeiras a partir de diferentes explantes foram alcançados com sucesso utilizando principalmente a auxina 2,4-D (Teixeira *et al.*, 1993; Eke *et al.*, 2005; Othmani *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2012). No entanto, o picloram também tem sido usado com frequência em protocolos de embriogênese somática de palmeiras. Nos estudos realizados por Moura *et al.* (2009), o maior número de ES aptos a germinação foram obtidos com o uso de picloram, porém, esses autores relataram que em meio de regeneração poucos completaram a germinação.

Em meio de regeneração, além da germinação dos ES, foi possível observar diferentes respostas morfológicas dos CE, como a formação de raízes adventícias e casos de anormalidade do ES. Alguns ES germinaram com desenvolvimento normal da raiz, entretanto, o meristema apical pareceu estar ausente ou pouco desenvolvido. A falta de desenvolvimento da parte aérea de ES também foi observada durante a germinação dos EZ do tratamento controle.

A maioria das plantas regeneradas apresentou desenvolvimento normal, com crescimento de raízes e parte aérea (Figura 2H). Uma vez regeneradas, as plantas foram aclimatizadas após o desenvolvimento da parte aérea e emissão de, no mínimo, duas raízes (Figura 2I). Observou-se que as plantas que não apresentaram no mínimo duas raízes não sobrevivem à aclimatização.

O processo de embriogênese somática em macaúba, desde a indução até a regeneração completa das plantas, foi realizado em 15 meses.

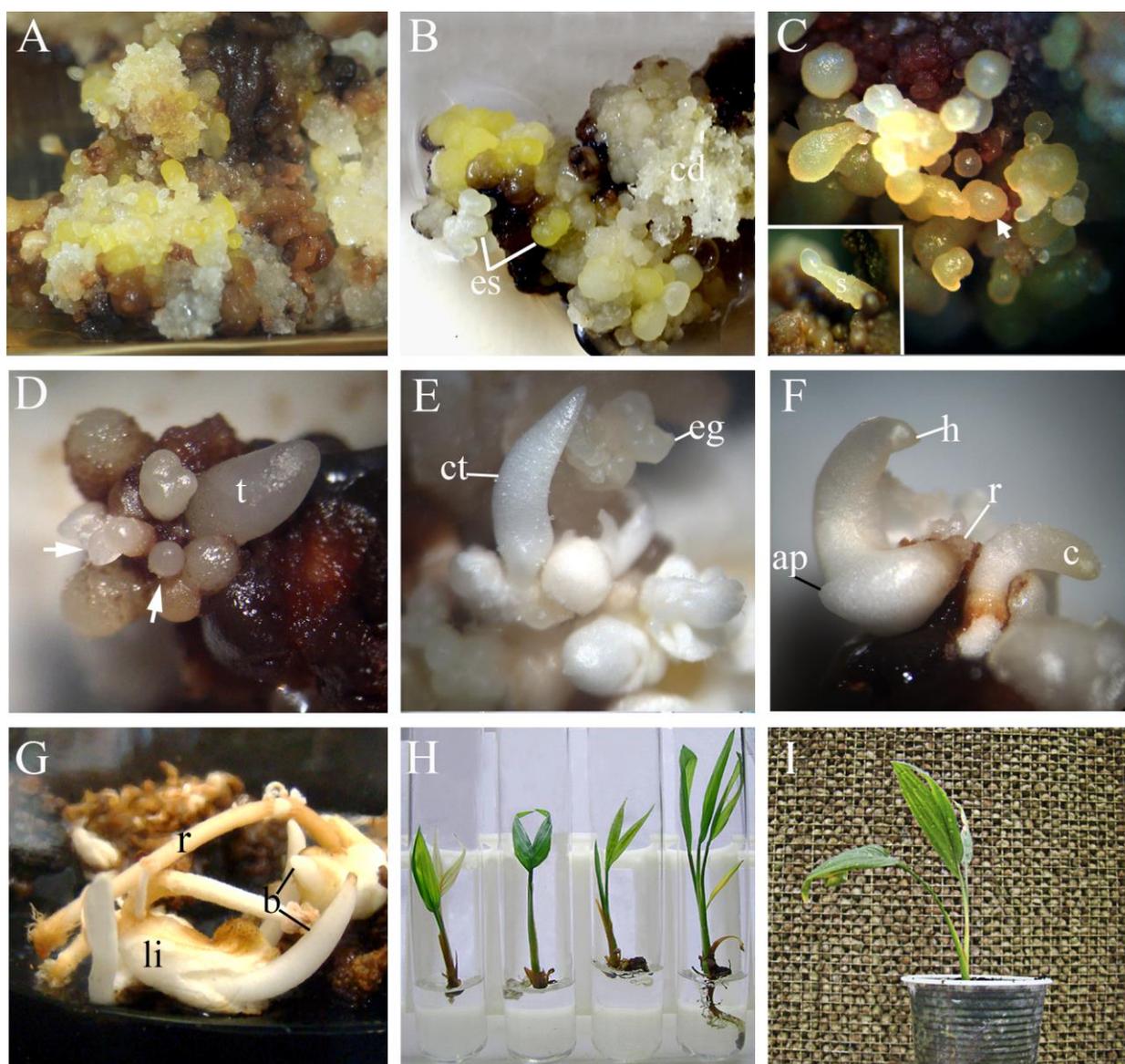


Figura 2: Aspectos morfológicos da regeneração de plantas de macaúba (*Acrocomia aculeata*) obtida a partir de embriões zigóticos. A: Calo embriogênico contendo embriões somáticos (seta) após 30 dias em meio de diferenciação. B: Embriões somáticos em fase globular (seta), detalhe do embrião globular com suspensor conectando o embrião globular ao explante. C: Embriões somáticos e região do explante com aspecto desidratado após 30 dias em meio de sincronização e maturação. D: Embriões somáticos em diferentes fases, torpedão e globular (seta) após 60 dias em meio de sincronização e maturação. E: Embrião em fase cotiledonar após 60 dias em meio de sincronização e maturação. F: Embrião somático com início de protrusão da radícula, contendo cotilédone, lígula e fenda cotiledonar após 45 dias em meio de regeneração de plantas. G: Germinação dos embriões somáticos em meio de regeneração, contendo radícula, lígula e bainha foliar. H: Clones individualizados apresentando raiz e parte aérea. I: Planta aclimatizada. Abreviações: (b) bainha foliar, (c) cotilédone, (cd) calo desidratado, (ct) embrião em fase cotiledonar, (es) embrião somático, (fc) fenda cotiledonar, (li) lígula, (r) radícula, (s) suspensor, (t) embrião em fase torpedão. Escalas: A, B, G, H: 1cm; C, D, E, F: 0,4 cm; I: 5 cm.

3.5 Análise histológica

A análise histológica mostrou diferenças entre o calo formado na região distal do embrião (cotilédone) e o do mesocótilo. O calo formado a partir da região distal do embrião zigótico (Figura 3A) possui diferentes constituições celulares: células vacuoladas com baixa relação núcleo/citoplasma em maior quantidade e, células meristemáticas com núcleo volumoso e citoplasma denso em menor quantidade (Figura 3B).

O calo compacto formado na região do mesocótilo apresenta constituição celular diferente do calo formado na região distal do EZ. Nesses calos predominam células meristemáticas (Figura 3C). A diferença observada entre o calo formado no mesocótilo e na região distal, provavelmente, esteja relacionada com a constituição celular dessas regiões do explante (embrião zigótico). O mesocótilo se localiza próximo ao eixo embrionário que contém maior quantidade de células meristemáticas, enquanto a região distal é formada, em maior parte, por células parenquimáticas (Ribeiro *et al.* 2012). Portanto, o tipo de calo formado é influenciado pela região do explante utilizado na indução.

Apesar das diferenças constitutivas, ambas as regiões desenvolveram calos embriogênicos com aspecto nodular (Figura 3D), caracterizadas por células meristemáticas embriogênicas. Na região periférica do calo embriogênico foram visualizados embriões bicelulares apresentando uma célula apical e outra basal, responsáveis pela formação dos tecidos embrionários e do suspensor, respectivamente (Figura 3E). Posteriormente, observou-se o embrião globular com suspensor pluricelular (Figura 3F). A presença do suspensor confirma a origem unicelular desses embriões, uma vez que tal estrutura indica que suspensor e o embrião são formados a partir da divisão assimétrica de uma única célula (Heidstra, 2007). Adicionalmente, Almeida *et al.* (2012) relataram que embriões de origem unicelular se formam a partir de células externas dos tecidos e se isolam do explante facilmente, enquanto os multicelulares são formados internamente de um grupo de células meristemáticas e, por isso, o isolamento do explante é dificultado.

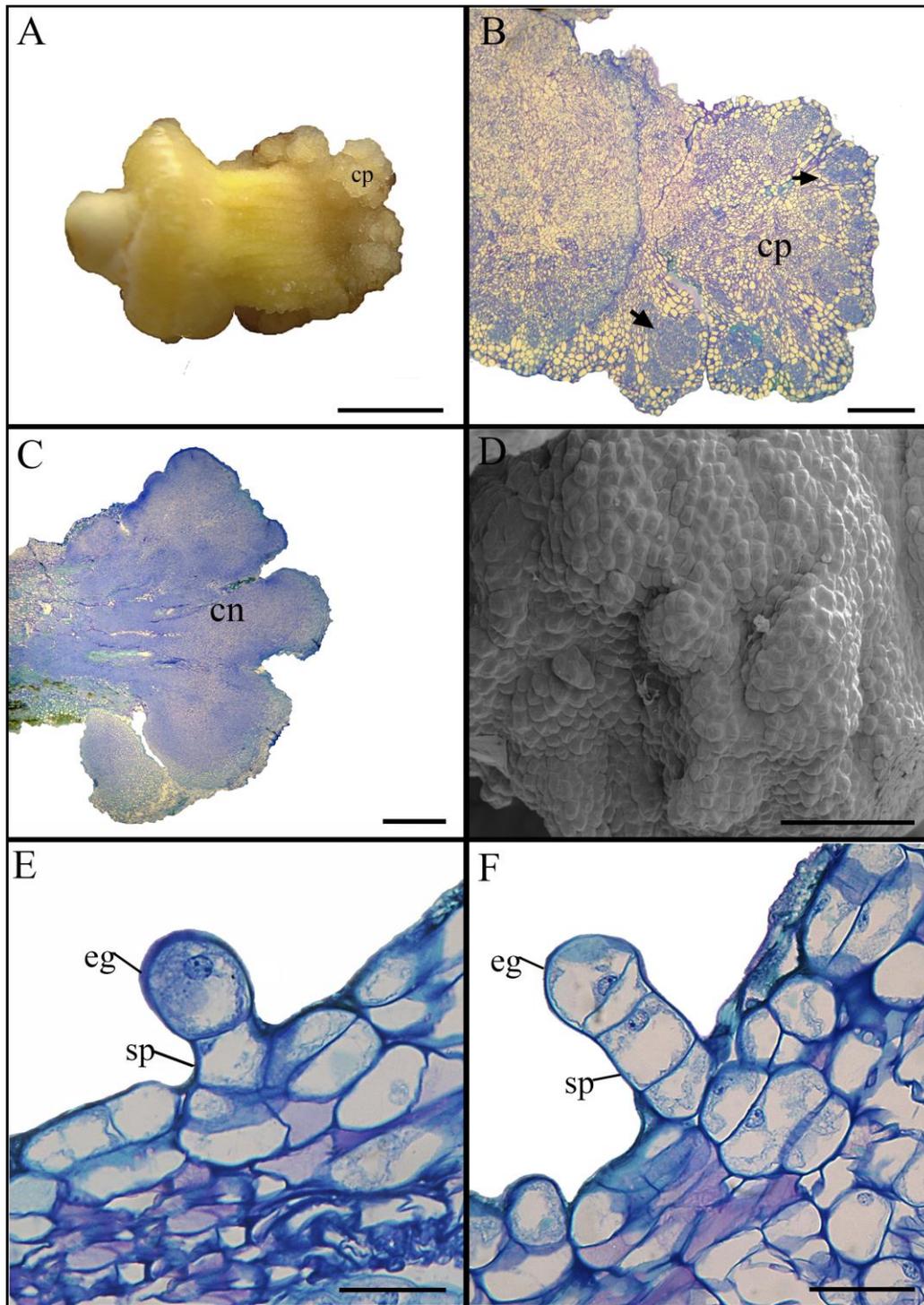


Figura 3. Caracterização histológica da embriogênese somática em macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Aspecto morfológico do embrião zigótico contendo calo primário na borda da região distal. B: Calo primário contendo aglomerados meristemáticos na periferia (setas). C: Calo embriogênico nodular constituído por células meristemáticas. D: Eletromicrografia de varredura evidenciando o aspecto do calo embriogênico. E: Embrião globular bicelular conectado ao explante de origem. F: Embrião globular apresentando suspensor pluricelular. Abreviações: (ce) calo embriogênico; (cn) calo embriogênico nodular; (cp) calo primário; (eg) embrião globular; (es) embrião somático; (h) haustório; (pd) protoderme; (sp) suspensor. Barras: A = 1cm; B, M = 150 μ m; C, D, H, I, J = 200 μ m; E, F = 15 μ m; G = 50 μ m; L = 100 μ m.

Estruturas globulares aparentemente isoladas e constituídas por células meristemáticas também foram visualizadas em meio a células meristemáticas na região central do calo nodular (Figura 4A). Esse tipo de estrutura caracteriza a formação de embriões de origem multicelular. Esses resultados corroboram os encontrados por Moura *et al.* (2008), tais autores relataram que embriões de origem multicelular formaram-se a partir de calos nodulares. Embriões globulares de origem multicelular também foram observados por Balzon *et al.* (2013) a partir de calos embriogênicos de *Elaeis guineenses*.

Em meio de diferenciação, embriões somáticos foram visualizados em diferentes estádios de desenvolvimento, incluindo àqueles em estágio posterior ao globular conectados ao explante (Figura 4B, C).

Aglomerados de embriões delimitados por protoderme e fusionados ao calo foram visualizados com frequência (Figura 4D). Embriões somáticos em fases mais avançadas, caracterizados por conterem feixes procambiais, elementos de vaso diferenciados e protoderme com camada única de células justapostas, retangulares e com divisões celulares no sentido anticlinal, foram visualizados após a transferência para meio de regeneração (Figura 4E).

A polaridade dos ES foi estabelecida na fase torpedo, evidenciada a distinção de um polo distal e um proximal (Figura 4F). No polo distal observou-se o cotilédone do embrião somático que contém feixes procambiais, células parenquimáticas e protoderme. O polo proximal, denominado pela proximidade ao suspensor, contém o futuro eixo embrionário. Na embriogênese somática de *Cocos nucifera* e *Elaeis guineenses*, Fernando *et al.* (2003) e Silva *et al.* (2013) também caracterizaram embriões somáticos apresentando bipolaridade e cotilédone diferenciado, respectivamente.

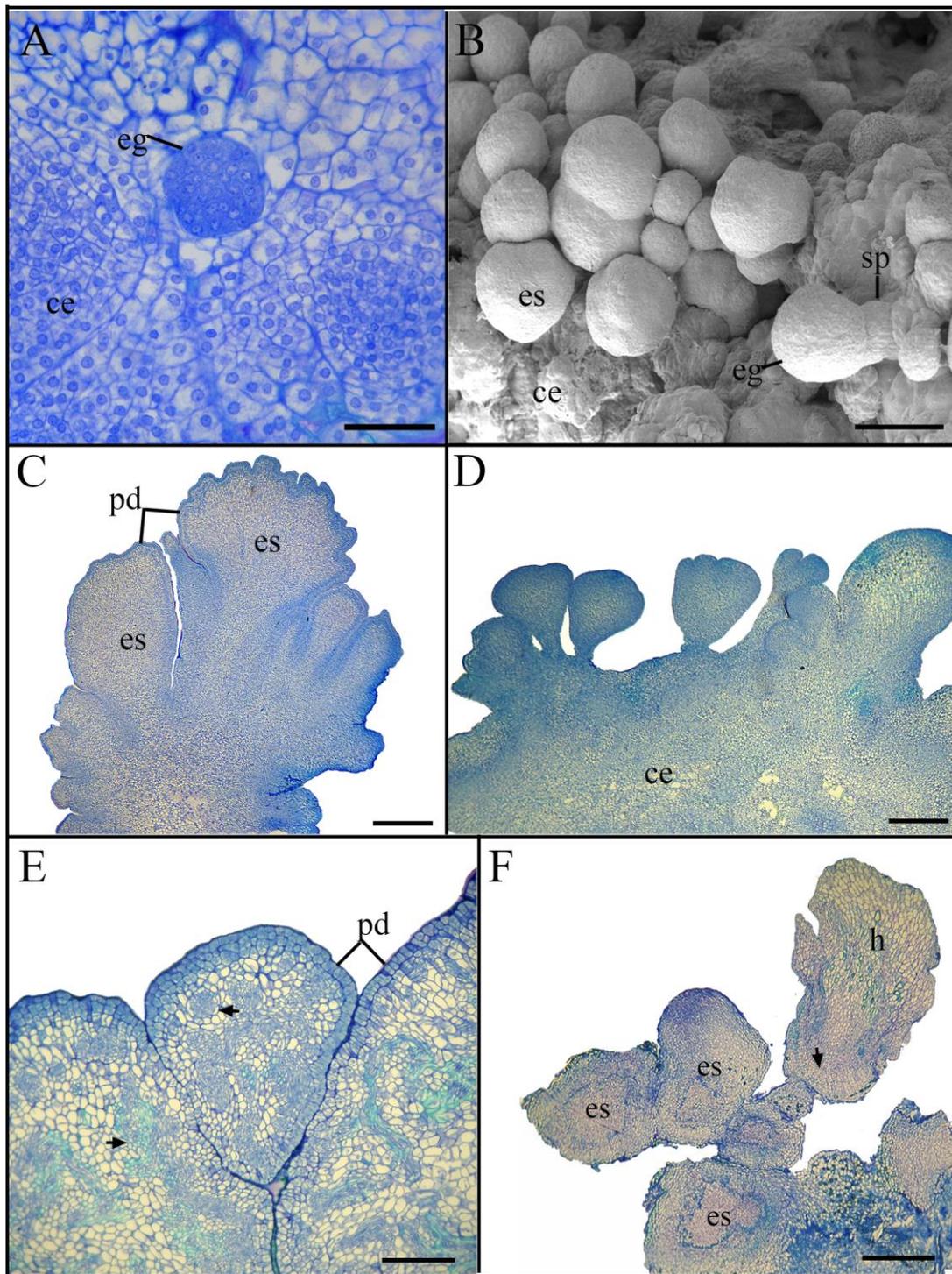


Figura 4. Caracterização histológica da embriogênese somática em macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Estrutura globular isolada em meio a células da região central do calo embriogênico. B: Eletromicrografia de varredura evidenciando embriões somáticos formados a partir de calos embriogênicos. C: Embriões somáticos formados na extremidade do calo e conectados pelo suspensor. D: Embriões fusionados delimitados pela protoderme. E: Embriões somáticos em fase avançada apresentando protoderme, feixes procambiais (setas) e elementos de vaso em início de diferenciação (cabeça da seta). F: Embrião torpedo apresentando região distal e proximal (seta). Abreviações: (ce) calo embriogênico; (eg) embrião globular; (es) embrião somático; (h) haustório; (pd) protoderme; (sp) suspensor. Barras: A = 50 μm ; B, C, D = 200 μm ; E = 100 μm ; F = 150 μm .

4. CONCLUSÕES

- O protocolo de embriogênese somática estabelecido nesse estudo é eficaz e permite a obtenção de plantas regeneradas;
- A embriogênese somática a partir de embriões zigóticos de macaúba segue um modelo indireto;
- O meio Y3 é mais adequado que o meio de MS na obtenção de calo embriogênico, embrião somático e na regeneração de plantas;
- O uso de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D é mais eficiente na regeneração de plantas de macaúba.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA M DE, ALMEIDA CV DE, GRANER EM, BRONDANI GE, ABREU-TARAZI MF. (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Reports* 31:1495-1515.
- ARKCOLL D. (1990). *New crops from Brazil*. In: JANICK, J, SIMON EJ. (eds.), *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, 367-371p.
- ARNOLD SV, SABALA I, BOZHOKOV P, DYACHOK J. FILONOVA L. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249.
- BALZON TA, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. (2013). New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 49(1):41-50.
- CLEMENT CR, LLERAS PÉREZ E, VAN LEEUWEN J. (2005). O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociencias*, 9(1-2): 67-71.
- DIAS AC, GUERRA MP, CORDOBA AS, KEMPER EL (1994). Somatic embryogenesis and plant regeneration in the tissue culture of *Genoma gamiova* (Arecaceae). *Acta Horticulture*, 360:167–171.
- EEUWENS CJ (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 36: 23-28.
- EKE CR, AKOMEAH P, ASEMOTA O (2005). Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from ‘zebia’ and ‘loko’ landraces. *African Journal of Biotechnology*, 4 (3): 244-246.
- FEHÉR A, PASTERNAK TP, DUDITS D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74:201-228.
- FERNANDO SC, GAMAGE CK (2000). Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Scienc*, 151:193-198.
- FERNANDO SC, VERDEIL JL, HOCHER V, WEERAKOON LK, HIRIMBUREGAMA K. (2003) Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 72: 281-284.

- FERREIRA DF. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6):1039-1042
- GUEYE B, MORCILLO F, COLLIN M, GARGANI D, OVERVOORDE P, ABERLENC-BERTOSSI F, TRANBARGER TJ, SANE D, TREGEAR JW, BORGEL A, VERDEIL J. (2009) Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(1):35-45.
- HEIDSTRA R. (2007) Asymmetric cell division in plant development. *Progress In Molecular and Subcellular Biology* 45:1-37.
- HUONG LTL, BAIOTTO M, HUY BP, MEZZETTI B, SANTILOCCHI R, ROSATI P (1999). Somatic embryogenesis in Canary Island date palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56:1-7.
- IKEDA-IWAI M, UMEHARA M, SATOH S, KAMADA H. (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 34: 107-114.
- JOHANSEN DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, New York.
- LORENZI GMAC. (2006) *Acrocomia aculeata* (Lodd.) ex Mart. – *Arecaceae: Bases para o extrativismo sustentável*. Curitiba: Tese, Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, 172p.
- MOURA EF, VENTRELLA MC, MOTOIKE SY, SÁ JÚNIOR AQ, CARVALHO M, MANFI CE. (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*, 95:175-184.
- MOURA EF, MOTOIKE SY, VENTRELLA MC, SÁ JÚNIOR AQ, CARVALHO M. (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae* 119: 447-454.
- MOTTA PEF, CURI N, OLIVEIRA FILHO AT, GOMES JBV (2002). Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedagógicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37(7): 1023-1031.
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- O' BRIEN TP, FEDER N, MCCULLY ME. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59(2):368-373.
- OTHMANI A, BAYOUDH C, DRIRA N, MARRAKCHI M, TRIFI M (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous

- is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 97:71-79
- RIBEIRO LM, OLIVEIRA DMT, GARCIA QS. (2012) Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. *Trees* 26:851-863.
- SCHERWINSKI-PEREIRA JE, GUEDES RS, SILVA RA, FERMINO PCP JR, LUIS ZG, FREITAS EO (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration in açaí palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Doi: 10.1007/s11240-012-0115-z.
- SHI X, DAI X, LIU G, BAO M (2009). Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.): osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. *Trees*, 23:1033–1042.
- SILVA RC, LUIS ZL, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. (2012) Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Doi: 10.1007/s11240-012-0170-5.
- SILVA RC, LUIS ZL, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. (2013) The histodifferentiation events involved during the acquisition and development of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Growth Regulation*. Doi 10.1007/s10725-013-9837-0
- TASSARO H (1996). *Frutas no Brasil*. São Paulo: Empresa das Artes. 15p.
- TE-CHATO S, HILAE A (2007). High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. Var. tenera). *Journal of Agricultural Technology*, 3(2): 345-357.
- TEIXEIRA JB, SONDAHL MR, KIRBY EG. (1993) Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34:227-233.
- TEIXEIRA LC (2005). Potencialidades de oleaginosas para a produção de biodiesel. *Informe Agropecuário*, 26:18-27.
- TICKEL J (2000). *From the Fryer to the Tank: The Complete Guide to using Vegetable Oil as an Alternative Fuel*. Tickel Energy Consulting, Tallahassee, FL. Disponível em <<http://www.chanvre-info.ch/info/en/The-Complete-Guide-to-Using.html>>. Acessado em: 24/7/2012 às 21:51:01.
- THUZAR M, VANAVICHIT A, TRAGOONRUNG S, JANTASURIYARAT C (2011) Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. ‘Tenera’ through somatic embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 123–128.

- TROCH V, WERBROUCH S, GEELEN D, LABEKE MCV. (2009) Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 98:115-123.
- VARGAS J. (2007) Vegetable oils as substitutes for diesel oil. *Revista de política agrícola*, 1:17-30.

CAPÍTULO II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDUZIDA A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES DE PLANTAS *IN VITRO* DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDUZIDA A PARTIR DE SEGMENTOS
FOLIARES DE PLANTAS *IN VITRO* DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.
ex. Mart.]**

RESUMO

Entre os vários fatores que afetam as respostas morfogênicas, a origem do explante, o estado fisiológico e o nível de diferenciação dos tecidos podem ser considerados elementos chaves para a aquisição da competência celular e indução de embriões somáticos. O objetivo deste trabalho foi definir um protocolo de embriogênese somática a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro*, avaliar o efeito do uso de pré-tratamento de indução na formação de calos e embriões somáticos e identificar os explantes mais responsivos. Para a obtenção dos explantes, embriões zigóticos foram germinados *in vitro* em meio de cultura Y3 suplementado com 2,4-D (0 e 225 μM). As plantas obtidas tiveram a parte aérea seccionada transversalmente em quatro regiões: meristemática, basal, mediana e apical. Cada região foi seccionada transversalmente e os segmentos obtidos foram inoculados em meio de cultura acrescido de 450 μM de picloram para a indução de calos. Uma vez obtidos, os calos foram transferidos para novo meio de cultura, mas com concentrações reduzidas de picloram (40 e 80 μM) para a diferenciação de embriões somáticos. As respostas morfogênicas foram avaliadas em função da região do explante, associada ao uso ou não de pré-tratamento de indução (0 e 225 μM de 2,4-D). Após 90 dias de cultivo observou-se que a região meristemática apresentou resultados superiores na indução de calos primários em comparação às outras regiões testadas. O uso do pré-tratamento aumentou a capacidade de formação de calos primários nos explantes da região meristemática com resultados significativamente superiores (59%) aos observados no tratamento controle (21%). Aos 150 dias em meio de indução, observou-se a formação de calos com aspecto embriogênico. Os calos embriogênicos foram observados somente nos explantes obtidos das regiões meristemática e basal de plantas submetidas ao pré-tratamento. No entanto, a região meristemática apresentou resultados significativamente superiores à basal, com percentagens de 18% e 5,5%, respectivamente. Aos 60 dias em ambos os meios de diferenciação observou-se a formação de embriões somáticos. A diferenciação de embriões foi superior em calos embriogênicos provenientes da região meristemática em comparação com a região basal, independente do tratamento de diferenciação. Estudos histológicos revelaram que os primeiros eventos de divisão celular ocorreram em células do feixe vascular.

Palavras-chave: palmeira, folhas, pré-tratamento, embriogênese somática.

**SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCED FROM LEAF SEGMENTS OF
MACAW PALM PLANTS *IN VITRO* [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]**

ABSTRACT

Among the various factors that affect the morphogenic responses, the origin of the explant, physiological state and the level of tissue differentiation can be considered key elements for the acquisition of cellular competence and induction of somatic embryos. The aim of this work was to define a protocol for somatic embryogenesis from leaf segments of plants germinated *in vitro*, evaluate the effect of using a pre-treatment for induction on the calli and somatic embryos formation and characterize the most responsive explants. To obtain the explants, zygotic embryos were germinated *in vitro* in Y3 culture medium supplemented with 2,4-D (0 and 225 μM). All obtained plants had the aerial part sectioned transversely into four regions: meristematic, basal, median and apical. Each region was sectioned transversely and the obtained segments were inoculated in culture medium plus 450 μM of picloram for calli induction. The calli were transferred to new culture medium (Y3) with reduced concentrations of picloram (40 and 80 μM) for somatic embryo differentiation. The morphogenetic responses were evaluated according to the region of the explant associated with the use of the pretreatments (0 and 225 μM of 2,4-D). After 90 days of culture it was seen that the meristematic region showed superior results regarding the induction of primary calli compared to the other regions tested. The use of the pre-treatment increased the formation capacity of the primary calli in the explants from the meristematic region with results significantly higher (59%) to those observed in the control (21%). After 150 days in induction medium, we observed the formation of calli with embryogenic aspects. The embryogenic calli were observed only in explants obtained from meristematic and basal regions of plants subjected to the pre-treatment. However, the meristematic region presented significantly higher results than the basal, with percentages of 18% and 5.5%, respectively. After 60 days in both differentiation media, we observed the formation of somatic embryos. The differentiation of somatic embryos was higher in calli derived from the meristematic region in comparison with the basal region, regardless of differentiation treatment. Histological studies revealed that the early cell division events occurred in cells of the vascular bundle. The somatic embryos showed protoderm and procambium bundles.

Keywords: palm, leaf, pre-treatment, somatic embryogenesis.

1. INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é um dos exemplos mais intrigantes da plasticidade celular. Nessa técnica, células somáticas diferenciadas ou indiferenciadas adquirem totipotência (Haberland 1902 apud Vasil, 2008) que confere à célula a capacidade de reverter seu estado de diferenciação em condições específicas, e entrar novamente no ciclo mitótico tornando-se determinada a seguir rotas de morfogênese e desenvolver embriões somáticos (Féher *et al.*, 2003; Gueye *et al.*, 2009). E como resultado do processo, é possível originar milhares de plantas idênticas (Sugimoto *et al.*, 2011).

Para que as células adquiram a totipotência e possam, posteriormente, dar origem a embriões somáticos, elas devem ser submetidas a algum tipo de estresse que, em condições de cultivo *in vitro*, ocorre geralmente sob altas concentrações de auxinas exógenas (Verdeil *et al.*, 2007). Adicionalmente, a origem do explante, o estado fisiológico e o nível de diferenciação dos tecidos são considerados elementos chaves para a alteração da competência celular e indução de embriões somáticos (Merkle *et al.*, 1995).

Para a obtenção de embriões somáticos, utilizam-se várias fontes de explantes, tais como: embriões zigóticos, tecidos foliares jovens, ápices caulinares, gemas laterais, ápices radiculares e inflorescências (Tahir; Stasolla, 2006). No entanto, os tecidos foliares apresentam vantagens, uma vez que podem ser obtidos a partir de plantas adultas selecionadas e, em qualquer fase de desenvolvimento, com a vantagem de se obter plantas regeneradas idênticas a planta matriz.

A embriogênese somática tem sido relatada com frequência em diversos trabalhos com palmáceas, como em *Areca catechu* (Karun *et al.*, 2004), *Bactris gasipaes* (Almeida; Almeida, 2006), *Cocos nucifera* (Perera *et al.*, 2009), *Elaeis guineenses* (Te-chato; Hilae, 2007; Balzon *et al.*, 2013), *Euterpe edulis* (Saldanha *et al.*, 2006), *Euterpe oleracea* (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2012) e *Phoenix dactylifera* (Othmani *et al.*, 2009; Sané *et al.*, 2012).

Em macaúba (*Acrocomia aculeata*), há apenas um estudo ligado ao desenvolvimento de tecnologias para o cultivo *in vitro* por meio da embriogênese somática com o uso de embriões zigóticos como explante (Moura *et al.*, 2009). No entanto, estudos utilizando folhas como explantes na indução da embriogênese somática desta espécie são desconhecidos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de embriogênese somática a

partir de segmentos de folhas de plantas *in vitro* e caracterizar os explantes mais responsivos na formação de embriões somáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos explantes e efeito de pré-tratamentos

Para a realização desse experimento, embriões zigóticos obtidos de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*) foram utilizados como fonte de explantes. Para a obtenção dos embriões zigóticos, sementes foram extraídas de frutos maduros coletados de populações naturais localizadas próximas ao Setor Habitacional Fercal em Sobradinho, Distrito Federal, Brasil (Anexo 1) (cf Capítulo 1 § 2.1).

As sementes foram desinfestadas por meio da imersão em álcool etílico 70 % (v/v) durante três minutos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 30 minutos. Posteriormente, foram efetuadas três enxágues sucessivos em água destilada e autoclavada, por um minuto cada, para retirar o excesso de NaOCl. As sementes foram então seccionadas, e os embriões extraídos e inoculados em meio de germinação.

Na etapa de germinação, os embriões zigóticos foram inoculados em meio básico (MB) constituído pelos sais de Y3 (Eeuwens 1976), contendo Fe-EDTA e vitaminas do meio de MS (Murashige; Skoog, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e gelificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel (Sigma, St. Louis, MO). A auxina 2,4-D foi acrescentada ao meio de germinação nas concentrações de 0 e 225 µM constituindo o pré-tratamento para a indução de calos.

Após a germinação dos embriões zigóticos, as plantas obtidas com pelo menos 10 cm de altura tiveram as raízes e o cotilédone (haustório) removidos. A parte aérea da planta, contendo o meristema apical e folhas, foi dividida transversalmente em quatro regiões, denominadas a partir do epicótilo de: meristemática, basal, mediana e apical. Cada região continha cerca de dois centímetros de comprimento e foram seccionadas transversalmente em segmentos de cinco milímetros (Figura 1).

Os segmentos obtidos foram inoculados em MB acrescido de 450 µM de picloram para a indução de calos, onde permaneceram por sete meses até a transferência para meio de multiplicação de calos e diferenciação de embriões somáticos. Para a multiplicação dos calos e diferenciação de embriões somáticos, os explantes contendo calos embriogênicos foram transferidos para MB suplementando com concentrações de 40 e 80 µM de picloram.



Figura 1. Esquema para a obtenção de explantes de plantas de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] cultivadas *in vitro*. 1: Planta cultivada *in vitro*. 2: Parte aérea isolada e dividida transversalmente em quatro regiões, denominadas a partir do epicótilo de meristemática (segmentos de 1 a 5), basal (segmentos de 6 a 10), mediana (segmentos de 11 a 15) e apical (segmentos de 16 a 20). 3: Segmentos obtidos a partir da secção transversal de cada região. 4: Segmentos obtidos de cada região e inoculados em meio para a indução de calos.

2.2 Influência do meio de cultura na indução de calos

Após a avaliação do uso de um pré-tratamento para a indução e as regiões da parte aérea das plantas mais responsivas para na formação de calos e embriões somáticos, foi realizado um novo experimento para verificar o efeito de duas formulações salinas na fase de indução de calos: MS e Y3.

Para este experimento, os embriões obtidos de sementes desinfestadas (cf. capítulo I § 2.1.1) foram inoculados em dois meios de cultura, de MS e Y3, ambos contendo Fe-EDTA e vitaminas de MS, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e gelificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel. Aos meios de cultura foram associados 225 µM de 2,4-D, caracterizando o pré-tratamento, conforme resultados obtidos previamente.

As plantas germinadas *in vitro* foram mantidas até que atingissem aproximadamente 10 cm de altura. Posteriormente, a parte aérea correspondendo às regiões meristemática e basal foram seccionadas, conforme as especificações descritas no experimento anterior (cf. § 2.1). Os explantes foram então inoculados nos respectivos meios de cultura (MS e Y3), suplementados com 450 µM de picloram. As regiões foliares localizadas acima da região basal foram eliminadas.

2.3 Condições de cultivo

Em todos os experimentos, os subcultivos foram realizados a cada 30 dias e os meios de cultura tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do agente gelificante, sendo os mesmos esterilizados por autoclavagem à 121°C durante 20 minutos à 1,5 atm de pressão. Para a germinação, os embriões zigóticos foram cultivados em tubos de ensaio (25 x 150 mL) contendo 10 mL de meio de cultivo. Na indução de calos e diferenciação de embriões somáticos os cultivos foram realizados em placas de petri (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa. Em todas as fases, os cultivos foram mantidos no escuro em sala de crescimento a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.4 Análise histológica

Para a análise histológica as amostras foram fixadas em solução de FAA 70% (paraformaldeído, álcool 70% e ácido acético) por um período mínimo de 24 horas, sob vácuo durante a primeira hora, seguida de desidratação em série alcoólica crescente (70 - 100%), e infiltradas em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha). Cortes seriados longitudinais e transversais (5 e 7 μm) foram obtidos em micrótomo rotatório manual, distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecedora a 40°C . Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (O' Brien, 1965) e montados com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os resultados foram registrados em microscópio acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

2.5 Análise estatística

Em todas as fases, os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. O primeiro experimento seguiu um esquema fatorial 2 x 4 (pré-tratamento x regiões da parte aérea da planta) totalizando 8 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 5 repetições contendo 4 explantes. O segundo experimento foi realizado em esquema fatorial 2 x 2 (meio de cultura x regiões foliares) totalizando 4 tratamentos contendo 6 repetições com 4 explantes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (Ferreira, 2011). Dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{0.5}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção dos explantes e efeito de pré-tratamentos

Experimentos preliminares foram realizados para verificar as respostas de explantes foliares obtidos de plantas germinadas *in vitro* de macaúba. Por meio destes experimentos foi possível observar que explantes mantidos em meio de cultura suplementados com dicamba e 2,4-D desenvolveram oxidação não ocorrendo a formação de calos. Por outro lado, bons resultados foram obtidos em meio contendo picloram. A partir destes resultados foi desenvolvido o presente estudo para avaliar a influência do pré-tratamento, das regiões de desenvolvimento da folha de plantas *in vitro* e de dois meios de cultura (MS e Y3) suplementados com picloram.

Após uma semana de cultivo verificou-se o intumescimento dos explantes em ambos os pré-tratamentos. Na região meristemática, o intumescimento ocorreu em todo o explante, enquanto nas regiões basal, mediana e apical, o intumescimento foi verificado principalmente nas folhas internas (Figura 2A). Em geral, após o intumescimento, as folhas internas se desprenderam do interior das bainhas externas e expandiram-se, enquanto nas bainhas externas iniciou-se um processo oxidativo.

A primeira avaliação, quanto à percentagem de calos formados nos diferentes tratamentos, foi realizada aos 90 dias após a inoculação dos explantes em meio de indução da embriogênese somática. Entretanto, após 45 dias de cultivo já foi possível observar o início da formação de calos primários nos explantes oriundos da região meristemática e basal. Nas regiões mediana e apical, o início da formação de calos foi visualizado somente após 60 dias de cultivo. Em geral, os calos foram observados nas bordas dos explantes foliares e apresentaram coloração amarelo-clara (Figura 2B e C). Ressalta-se que a formação de calos nos explantes ocorreu exclusivamente nas bainhas foliares internas dos segmentos foliares.

Após 90 dias de cultivo, observou-se que o pré-tratamento realizado antes da fase de indução de calos, que consistiu da germinação de embriões zigóticos e crescimento das plantas em meio de cultura contendo 225 μM de 2,4-D, foi eficaz para melhorar a formação de calos. A percentagem de calos induzidos em explantes oriundos do pré-tratamento foi significativamente superior à observada nos explantes provenientes do meio desprovido de 2,4-D (tratamento controle) (Tabela 1).

As diferenças observadas podem estar ligadas ao nível de auxina endógena nos tecidos foliares proporcionado pela germinação dos embriões zigóticos e cultivo das plantas em meio contendo elevada concentração de 2,4-D. O nível hormonal endógeno nos tecidos pode ser considerado um dos fatores mais importantes no estímulo da resposta embriogênica (Féher, *et al.*, 2003). Gueye *et al.* (2009) verificaram que as regiões que induziram maiores percentagem de calos em segmentos de folhas de plantas de tamareira (*Phoenix dactylifera*) foram os que apresentaram os maiores níveis endógenos de AIA antes do cultivo *in vitro*.

As análises da influência da região da parte aérea de plantas *in vitro* associada ao uso ou não do pré-tratamento na indução de calos mostraram diferenças significativas (Tabela 1). De maneira geral, a região meristemática, considerada até 2 cm acima do epicótilo, apresentou valores superiores na indução de calos primários em comparação às demais regiões testadas. O uso do pré-tratamento em plantas onde explantes da região meristemática foram obtidos aumentou a capacidade de formação de calos destes explantes com resultados superiores (59%) aos observados no tratamento controle (21%). Respostas superiores na embriogênese somática também foram observadas em segmentos de folhas extraídos de regiões próximas ao meristema apical do caule de *Bactris gasipaes* e *Elaeis guineensis* por Steinmacher *et al.* (2007) e Scherwinski-Pereira *et al.* (2010), respectivamente.

A região basal foi a segunda mais responsiva na indução de calos primários, com os melhores resultados obtidos nos explantes oriundos de plantas pré-tratadas (16,7%) em comparação ao tratamento controle (4,5%). A região apical apresentou a menor taxa de indução, seguida pela região mediana, independente do pré-tratamento de indução.

A diferença observada na competência para formação de calos em cada região, possivelmente se deve ao nível de diferenciação dos tecidos do explante. Tecidos menos diferenciados possuem maior quantidade de células capazes de adquirir totipotência. As células totipotentes são capazes de reverter seu estado de diferenciação, entrar novamente no ciclo celular e submeter-se a morfogênese e formação de embriões somáticos (Verdeil *et al.*, 2007).

Tabela 1. Influência da germinação de embriões zigóticos em meio de cultivo contendo 0 e 225 μM de 2,4-D e, das regiões da parte aérea de plantas de macaúba (*Acrocomia aculeata*) na indução de calos primários e embriogênicos em meio Y3 suplementado com 450 μM de picloram.

Região	Calo primário (%)		Calo embriogênico (%)	
	Pré-tratamento (2,4-D)		Pré-tratamento (2,4-D)	
	0 μM	225 μM	0 μM	225 μM
Meristemática	21,0 aB	59,0 aA	0,0 aB	18,0 aA
Basal	4,5 bB	16,7 bA	0,0 aA	5,5 bA
Mediana	4,2 bA	5,3 bA	0,0 aA	0,0 bA
Apical	0,0 bA	4,1 bA	0,0 aA	0,0 bA
Média	7,5 B	21,3 A	0,0 B	5,8 A

Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada item, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Aos 150 dias em meio de indução foi avaliada a percentagem de formação de calos embriogênicos (Tabela 1). Em geral, os calos embriogênicos apresentaram aspecto nodular, consistência compacta e coloração amarelo-escuro (Figura 2D). Diferente do observado na indução de calos primários, os calos embriogênicos foram observados somente em explante obtidos das regiões meristemática e basal de plantas submetidas ao pré-tratamento. Ao avaliar a influência da região na formação de calos embriogênicos, verificou-se que na meristemática o resultado foi significativamente superior à basal, com percentagens de 18% e 5,5%, respectivamente. Na embriogênese somática de *Elaeis guineenses* (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010) e *Bactris gasipaes* (Steinmacker *et al.*, 2007), os explantes provenientes das regiões próximas ao meristema também foram os mais responsivos na formação de calo embriogênico, com 30% e 40%, respectivamente.

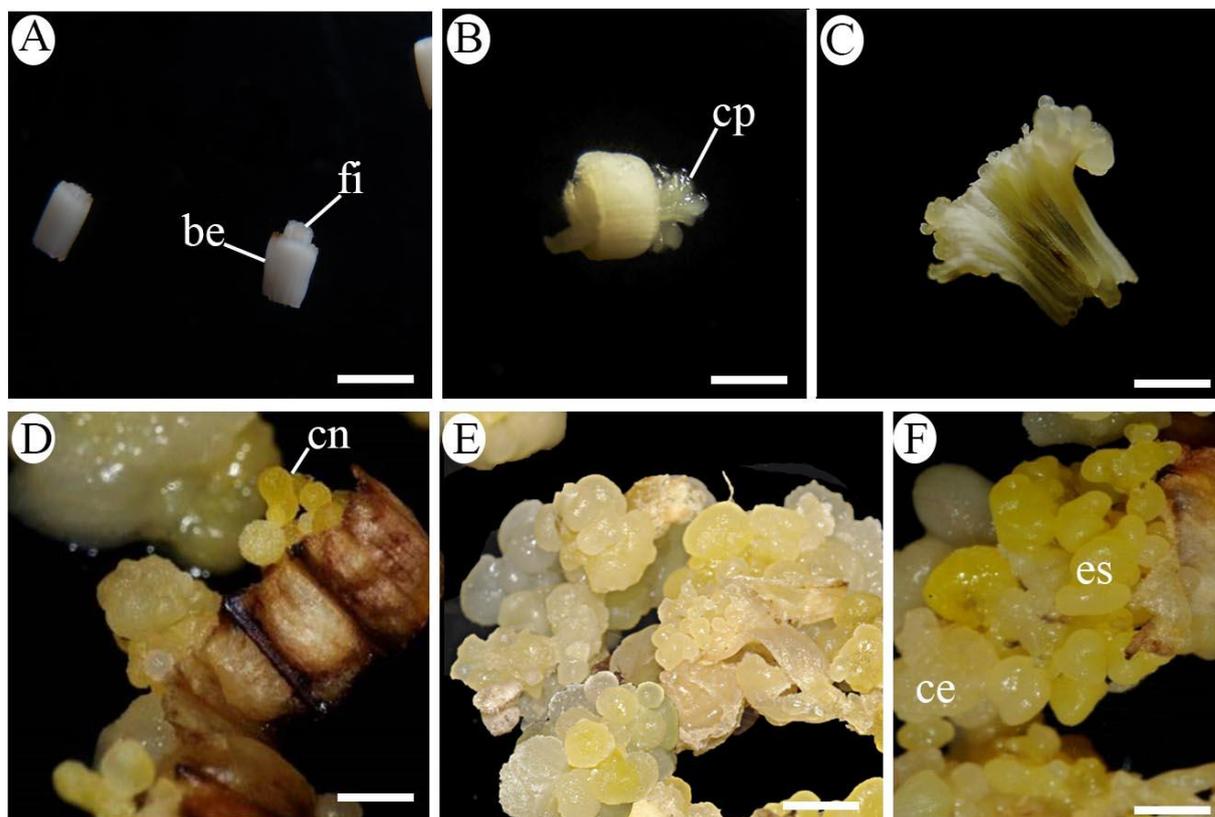


Figura 2. Aspecto da embriogênese somática induzida a partir de segmentos foliares de plantas germinadas *in vitro* de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A, B, C e D: meio de indução. E e F: meio de diferenciação. A: Segmentos foliares intumescidos após sete dias de cultivo. B: Calo primário formado a partir da folha interna. C: Folha interna expandida com calos primários na borda seccionada. D: Calos embriogênicos nodulares formados na borda da folha. E: Calos embriogênicos nodulares. F: Calos embriogênicos e embriões somáticos. Abreviações: (be) bainha externa; (fi) folha interna; (cp) calo primário; (cn) calo embriogênico nodular; (ce) calo embriogênico; (es) embrião somático. Barras: 5 mm.

Após 210 dias em meio de indução, os calos embriogênicos formados a partir da região meristemática e basal foram transferidos para meio contendo concentrações de picloram inferiores (40 e 80 μM) à utilizada na fase de indução (450 μM de picloram). Inicialmente, a redução da concentração da auxina no meio de cultura de 450 μM para 40 e 80 μM de picloram favoreceu a multiplicação dos calos de ambas as regiões. A redução do nível de auxina é importante para estabelecer ciclos repetitivos de divisão celular possibilitando a contínua multiplicação e crescimento dos calos formados (Viñas; Jiménez, 2011; Balzon *et al.*, 2013).

Após 60 dias de cultivo, em ambos os tratamentos de diferenciação, verificou-se o desenvolvimento de embriões somáticos. Os embriões somáticos apresentaram inicialmente coloração translúcida e amarelada (Figura 2F).

A diferenciação de embriões somáticos foi superior em calos embriogênicos provenientes da região meristemática em comparação com a região basal, independente do tratamento de diferenciação (Figura 3). Ao avaliar cada região foliar separadamente, não se constatou diferenças entre os meios de diferenciação de embriões testados.

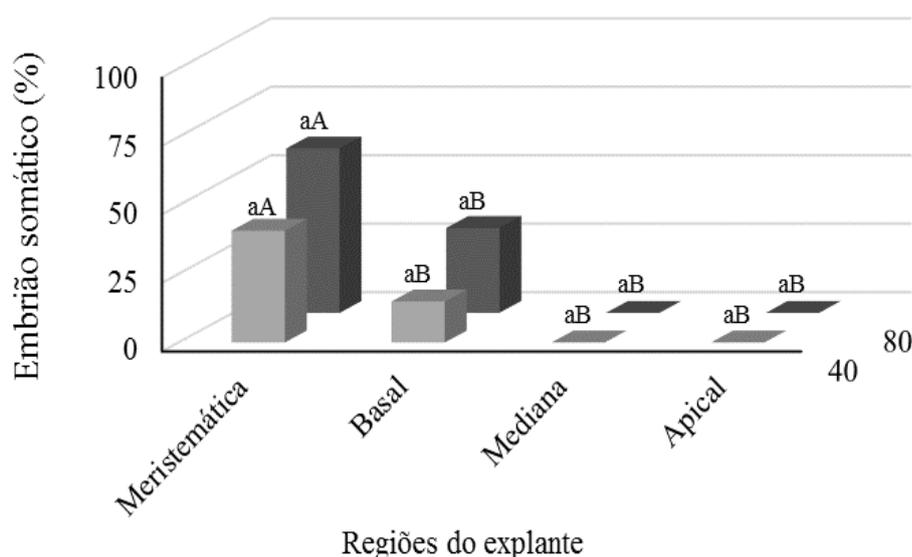


Figura 3. Efeito do meio de multiplicação e diferenciação (40 e 80 µM de Picloram) e de regiões foliares na porcentagem de formação de embriões somáticos por explantes em macaúba (*Acrocomia aculeata*). Letras iguais, minúsculas na vertical (entre as concentrações de picloram dentro de cada região foliar avaliada) e maiúsculas na horizontal (entre as regiões foliares e dentro de cada concentração testada), pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

3.2 Influência do meio de cultura na indução de calos e embriões somáticos

Após estabelecimento das regiões foliares mais responsivas na formação de calos e o efeito do uso de pré-tratamento de indução, foi avaliado a influência de duas soluções salinas

(MS e Y3) na indução de calos e embriões somáticos em explantes foliares obtidos de plantas *in vitro* macaúba.

Em ambos os meios testados observou-se a formação de calos primários e embriogênicos. Contudo, assim como verificado na indução de calos a partir de embriões zigóticos (cf. capítulo I), a percentagem de calos primários e embriogênicos foi significativamente superior em meio Y3 em relação ao de MS, com 67% e 41% de explantes com calos primários e 39% e 17% de calos embriogênicos, respectivamente (Figura 4).

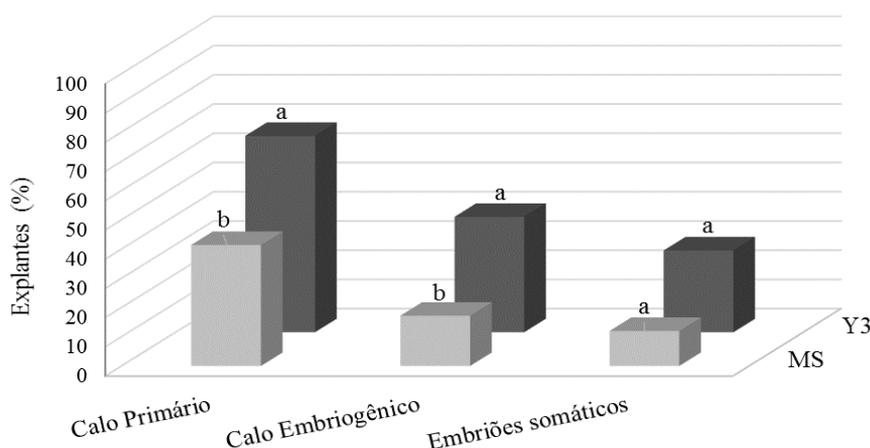


Figura 4. Efeito do meio de cultura (MS e Y3) na formação de calos primários, calos embriogênicos e embriões somáticos em segmentos foliares oriundos de plantas germinadas *in vitro* de macaúba (*Acrocomia aculeata*). Letras iguais, na vertical (entre os meios de cultura) pertencem ao mesmo grupo segundo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Após a transferência para meio de multiplicação e diferenciação, o meio de cultura Y3 proporcionou os melhores resultados também quanto à percentagem de embriões somáticos formados por calo comparativamente ao de MS, com 28% e 12%, respectivamente. Os resultados obtidos evidenciam que tanto para a indução de calos primários e embriogênicos quanto para a fase de diferenciação de embriões somáticos o meio Y3 apresentou resultados superiores. No cultivo *in vitro* é importante avaliar as necessidades de sais em cada fase do processo de propagação da cultura para otimizar os sistemas de micropropagação de plantas, pois, a formulação salina ideal para uma fase em particular pode não ser a melhor para os outros estádios do cultivo *in vitro*. Thuzar *et al.* (2011) também observaram que o meio de

cultura de MS não foi o mais adequado para a formação de calos em *Elaeis guineenses* cv. 'Tenera'.

3.3 Análise histológica

Assim como descrito anteriormente, verificou-se que os primeiros calos formados foram observados nas bordas seccionadas dos explantes. No entanto, a análise histológica revelou que o início da formação de calos ocorreu por meio de divisões celulares das células dos feixes vasculares das folhas (Figura 5A), possivelmente, de células procambiais existentes. Rose *et al.* (2006) relata que no tecido vascular de explantes foliares pode existir um reservatório de células procambiais que adquirem totipotência após o estímulo auxínico.

No feixe vascular foi observado agrupamentos de células com alta relação núcleo/citoplasma caracterizando células meristemáticas. Elementos de vaso também foram visualizados e identificados pelo espessamento de parede. Em meio às células parenquimáticas do mesofilo, localizadas próximas aos feixes vasculares, foi visualizado a presença de células meristemáticas (Figura 5A). A presença dessas células no mesofilo, provavelmente, ocorreu em consequência da atividade mitótica das células procambiais que influenciaram a desdiferenciação das células do mesofilo adjacentes aos feixes vasculares (Gueye *et al.*, 2009).

O corte longitudinal do feixe vascular possibilitou visualizar células meristemáticas, procambiais (Figura 5B) e elementos de vaso. As células meristemáticas apresentaram formato isodiamétrico e núcleo volumoso ocupando a posição central, caracterizando células totipotentes. Já, as células procambiais foram caracterizadas por apresentar formato fusiforme, núcleo volumoso e citoplasma denso. Elementos de vasos foram distinguidos pelo espessamento de parede (Figura 5C).

A partir de intensas divisões das células do feixe vascular verificou-se a formação de aglomerados de células meristemáticas (Figura 5C, D). A multiplicação dos aglomerados celulares resultou na formação de calos nodulares observados inicialmente na borda da folha (Figura 5D, E). Estes calos foram constituídos, exclusivamente, por células meristemáticas.

Com a permanência dos explantes em meio de indução, observou-se a formação de calos nodulares e embriogênicos, individualizados do explante e constituídos por células meristemáticas (Figura 5F, G). A partir dos calos nodulares e embriogênicos foi observada a

diferenciação de embriões somáticos em ambos os meios de diferenciação (40 e 80 μM de picloram). Os embriões somáticos surgiram, em geral, de divisões celulares que ocorrem na periferia do explante (Figura 5G). Posteriormente, embriões somáticos foram visualizados individualizados do explante (Figura 5H), delimitados por uma camada de células justapostas (Figura 5H, I). No interior dos embriões somáticos foram visualizados feixes procambiais (Figura 5J).

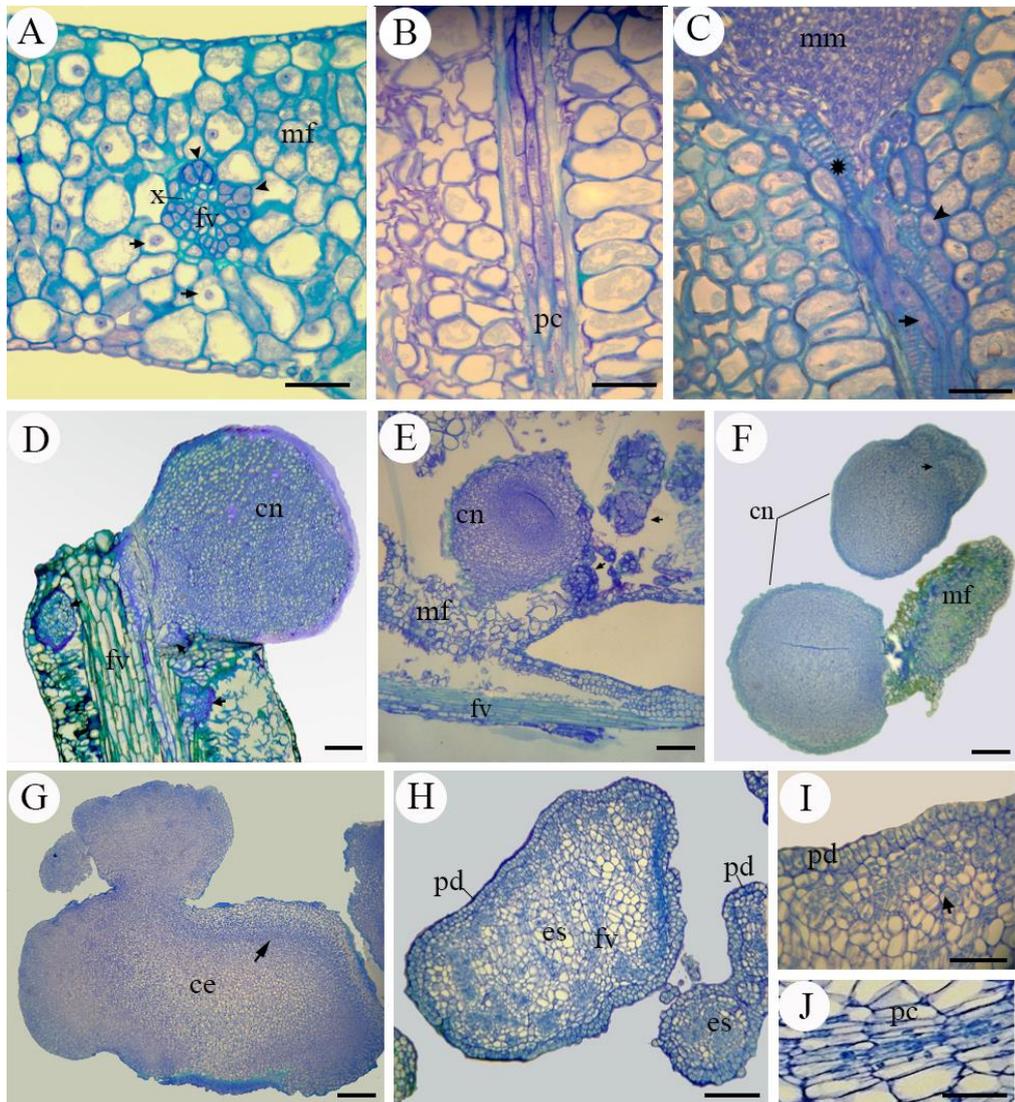


Figura 5. Eventos histológicos durante a embriogênese somática a partir de segmentos foliares oriundos de plantas germinadas *in vitro* de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Secção transversal apresentando feixe vascular com células meristemáticas (ponta da seta) e elementos de xilema após 30 dias de cultivo. B: Secção longitudinal do feixe vascular contendo células procâmbiais após 30 dias de cultivo. C: Feixe vascular contendo células procâmbiais (seta) e meristemáticas (ponta da seta), massas meristemáticas e elementos de vaso diferenciados (*) após 45 dias de cultivo. D: Calo nodular e início de formação de aglomerados celulares (seta) a partir do feixe vascular após 60 dias de cultivo. E: Mesofilo colapsado pela formação de calos (seta). F: Calos nodulares isolados do explante foliar. G: Calo nodular com intensa região de multiplicação celular (seta) e formação de estrutura semelhante a um embrião somático. H: Embrião somático delimitado por protoderme e apresentando em seu interior feixes de procâmbio após 60 dias em meio de diferenciação. I: Detalhe da protoderme do embrião somático com células justapostas e divisões periclinais (seta). J: Detalhe do feixe de procâmbio do embrião somático. Abreviações: (ce) calo embriogênico; (cn) calo nodular; (es) embrião somático; (fv) feixe vascular; (mf) mesofilo; (mm) massa meristemática; (pc) procâmbio; (pd) protoderme; (x) xilema. Barras: A, B, C e J = 20µm; D e H: = 50 µm; E, G= 80 µm; F= 100 µm; I= 30 µm.

4. CONCLUSÕES

- A germinação de embriões zigóticos e crescimento das plantas de macaúba em meio de cultura contendo 225 μM de 2,4-D, caracterizando um pré-tratamento, aumentam o percentual de formação de calos primários, embriogênicos e embriões somáticos;
- O uso de explantes obtidos de regiões meristemática e basal de plantas de macaúba germinadas *in vitro*, associadas a concentração de 450 μM de picloram promovem aumento significativo da formação de calos primários, embriogênicos e embriões somáticos;
- O meio de cultura Y3 promove melhores resultados se comparado com o meio de MS na formação de calos primários e embriogênicos em explantes foliares de macaúba;
- Os primeiros eventos de divisão celular durante a formação de calos em tecidos foliares de plantas *in vitro* de macaúba ocorrem em células dos feixes vasculares e adjacentes a eles;
- Embriões somáticos originários de explantes foliares de plantas germinadas *in vitro* de macaúba são formados a partir de calos embriogênicos nodulares e podem ser caracterizados por apresentarem protoderme e feixes vasculares bem desenvolvidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA M, ALMEIDA CV. (2006) Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejobaye adult plant leaf primordia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(9): 1449-1452.
- BALZON TA, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. (2013) New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(1):41-50.
- EEUWENS CJ. (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissues explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera* L.) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 36(1): 23-28.
- FÉHER A, PASTERNAK T, DUDITS D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 201-228.
- FERREIRA DF. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6):1039-1042.
- GUEYE B, MORCILLO F, COLLIN M, GARGANI D, OVERVOORDE P, ABERLENC-BERTOSSI F, TRANBARGER TJ, SANE D, TREGEAR JW, BORGEL A, VERDEIL J. (2009) Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(1): 35-45.
- HABERLANDT G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien, Math Naturwiss, 111:69-92. In: VASIL IK. (2008) A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27:1423–1440.
- KARUN A, SIRIL E. (2004) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). *Current Science*, 86(12): 1623-1628.
- LEDO AS, LAMEIRA OA, MENEZES IC. (2002) Embriogênese somática e regeneração de plantas em açazeiro. Rio Branco: *Boletim de Pesquisa-Embrapa Acre*, 34: 22.
- MERKLE SA, PARROTT WA, FLINN BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Dordrecht, Kluwer Academic, 155-203p.

- MOURA EF, MOTOIKE SY, VENTRELLA MC, SÁJÚNIOR AQ, FERREIRA MC, CARVALHO M. (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, 119: 447-454.
- MURASHIGE T, SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-49.
- OTHMANI A.; BAYOUDH C.; DRIRA N.; MARRAKCHI M.; TRIFI M. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97: 71-79.
- PERERA PIP, VIDHANAARACHCHI VRM, GUNATHILAKE TR, YAKANDAWALA DMD, HOCHER V, VERDEIL JL, WEERAKOON LK. (2009) Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 73-81.
- ROSE RJ, WANG XD, NOLAN KE, ROLFE BG. (2006) Root meristems in *Medicago truncatula* tissue culture arise from vascular derived procambial-like cells in a process regulated by ethylene. *Journal of Experimental Botany* 57:2227-2235
- SALDANHA CW, MARTINS-CORDER MP, STEINMACHER DA, GUERRA MP. (2006) *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* M. (Arecaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 6: 228–235.
- SANÉ, D. ABERLENC-BERTOSSI F, DIATTA LID, GUÈYE B, DAHER A, SAGNA M, DUVAL Y, BORGEL A. (2012) Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Sahelian cultivars. *The Scientific World Journal*, 2012: 1-8.
- SCHERWINSKI-PEREIRA JE, GUEDES RS, COSTA FHS. (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*. DOI 10.1007/s11627-010-9279-6
- SCHERWINSKI-PEREIRA JE, GUEDES RS, SILVA RA, FERMINO PCP JR, LUIS ZG, FREITAS EO. (2012) Somatic embryogenesis and plant regeneration in açaí palm (*Euterpe oleracea*). *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, Doi: 10.1007/s11240-012-0115-z.
- SUGIMOTO K, GORDON SP, MEYEROWITZ EM. (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology*, 21(4):212-218.
- STEINMACHER, DA, KROHN, NG, DANTAS, ACM, STEFENON VM, CLEMENT, CR. (2007) Somatic embryogenesis in peach Palm Using the *Thin Cell Layer* Technique:

- Induction, Morpho-histological aspects and AFLP Analysis of somaclonal variation. *Annals of Botany*, 100: 699-709.
- TAHIR M, STASOLLA C. (2006) Shoot apical development during in vitro embryogenesis. *Canadian Journal of Botany*, 84:1650-1659.
- TE-CHATO S, HILAE A (2007). High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. Var. tenera). *Journal of Agricultural Technology* 3(2): 345-357.
- THUZAR M, VANAVICHIT A, TRAGOONRUNG S, JANTASURIYARAT C (2011) Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 123–128.
- VERDEIL JL, ALEMANN L, NIEMENAK N, TRANBARGER TJ. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science*, 12(6): 245-252.
- VIÑAS M, JIMÉNEZ VM. (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIII(2): 229-242.

CAPÍTULO III

FATORES ENVOLVIDOS COM A FORMAÇÃO DE CALOS EM TECIDOS SOMÁTICOS DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

FATORES ENVOLVIDOS COM A FORMAÇÃO DE CALOS EM TECIDOS SOMÁTICOS DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

RESUMO

Neste estudo buscou-se determinar os principais fatores envolvidos na aquisição da competência para formação de calos a partir de folhas e ovários imaturos de plantas adultas de macaúba. Para cada explante foram identificados e avaliados o efeito de auxinas e concentrações, tipos de meios de cultura, além de regiões e estágio de desenvolvimento dos explantes utilizados na capacidade de formação de calos primários e embriogênicos. Para tanto se utilizou as auxinas 2,4-D, dicamba e picloram, os meios de cultura de MS e Y3, as regiões basais e apicais do palmito, quatro tipos de explantes provenientes de ovários e três classes quanto ao estágio de desenvolvimento de inflorescências. Dentre os vários fatores testados, a fonte de auxina e a concentração apresentaram maior influência para as respostas avaliadas, tanto em explantes foliares, quanto em ovários. A auxina picloram associada à concentração de 450 μM apresentou resultados superiores na indução de calos embriogênicos em ambos os explantes testados. A eficiência na formação de calos em explantes foliares foi aumentada quando se utilizou o meio básico Y3, associado à região apical do palmito. Já, em ovários a eficiência foi aumentada com o uso da região basal associada ao meio de cultura de MS. Em ovários a fase de desenvolvimento das inflorescências influenciou significativamente a competência para formação de calos. Os resultados obtidos sugerem que tanto os explantes provenientes de folhas imaturas como ovários imaturos podem ser utilizados como fontes de explantes para a indução da embriogênese somática em plantas adultas de macaúba.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*, folhas imaturas, ovários, tecidos somáticos, calos.

**FACTORS INVOLVED IN THE FORMATION OF CALLI IN SOMATIC TISSUE IN
MACAW PALM [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]**

ABSTRACT

In this study we sought to determine the main factors involved in the acquisition of competence for calli formation from immature leaves and ovaries of adult macaw palm plants. For each explant, the effect of auxin concentrations and types, culture media as well as regions and developmental stage of the explants were identified and evaluated regarding the ability of primary calli formation and embryogenesis. For this we used the auxins 2,4-D, dicamba and picloram, the culture media MS and Y3, basal and apical regions of palm heart, four types of explants from ovaries and three inflorescences stage development classes. Among the various factors tested, the auxin source and concentration showed greater influence on the responses evaluated, in leaf explants as well as in the ovaries. The auxin picloram at a concentration of 450 μM showed superior results in the induction of calli in both explants tested. The efficiency of calli formation in the leaf explants was increased when using the Y3 basic medium associated with the apical region of the palm heart, and in the ovaries, with using the MS basic medium associated with the basal region of the ovary. In the ovaries, the basic medium did not affect calli formation, although the development stage significantly influenced the calli formation competence. The results suggest that both the explants derived from immature leaves and the ovaries can be used for the induction of somatic embryogenesis from mature macaw palm plants.

Keywords: *Acrocomia aculeata*, immature leaves, ovaries, somatic tissues, calli.

1. INTRODUÇÃO

Acrocomia aculeata é uma palmeira conhecida popularmente como macaúba e encontra-se amplamente distribuída pelo território brasileiro (Lorenzi, 2006). Essa espécie apresenta significativo potencial agroindustrial para a produção de biodiesel em função da sua tolerância à seca, alta produtividade e da qualidade dos óleos, que podem ser extraídos do mesocarpo e sementes (Roscoe, 2007). Contudo, o estabelecimento de cultivos comerciais tem sido limitado, principalmente pela dificuldade de germinação das sementes e falta de matrizes selecionadas para compor os plantios (Lorenzi, 2006; Ribeiro *et al.*, 2011).

A exploração comercial dessa espécie depende do desenvolvimento de tecnologias que incluam a seleção e a propagação de plantas elite. No entanto, não é possível propagar a referida palmeira por meio de técnicas de propagação vegetativa convencional, uma vez que essa espécie não produz afillhos (Moura *et al.*, 2009). Dessa forma, o cultivo *in vitro* torna-se uma alternativa para a propagação dessa espécie, com a possibilidade de obtenção de clones de genótipos selecionados e em menor tempo, se comparado com a propagação por sementes, que requer um período relativamente longo até que novas plantas sejam regeneradas (Perera *et al.*, 2007)

No cultivo *in vitro* de palmeiras, a indução de calos parece ser um pré-requisito essencial para a embriogênese somática e regeneração de plantas (Sané *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012; Balzon *et al.*, 2013). Para isso, diversos explantes podem ser utilizados, mas as folhas e inflorescências têm a vantagem de permitir que se obtenha o explante de plantas adultas, sem a necessidade de sua destruição (Asemota *et al.*, 2010), tendo como resultado a regeneração de plantas idênticas a planta doadora de explantes.

Em macaúba não há relatos na literatura do uso de tecidos somáticos obtidos de plantas adultas como explantes para o cultivo *in vitro*. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo determinar fatores envolvidos na aquisição da competência para formação de calos a partir de folhas e ovários imaturos de plantas adultas de macaúba.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo foi coletado de populações naturais localizadas próximas de Sobradinho, Distrito Federal, Brasil (Anexo 1).

2.1.1 Folhas imaturas de plantas adultas

As folhas aclorofiladas foram coletadas de plantas adultas no campo. Na coleta, o caule da planta foi seccionado aproximadamente 10 cm acima do meristema apical do caule para retirada das folhas aclorofiladas. As folhas aclorofiladas ainda não expandidas estavam contidas na região apical do eixo caulinar da palmeira denominada palmito e envolvidas por bainhas remanescentes de folhas senescidas.

Para a coleta, inicialmente, os pecíolos remanescentes das folhas foram removidos, e deixou-se apenas o cilindro de folhas aclorofiladas não expandidas. Após a limpeza e retirada das bainhas foliares externas, as folhas internas e aclorofiladas foram desinfestadas mediante imersão em álcool 70% por 1 minuto, seguida pela imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e três lavagens consecutivas por 1 minuto cada em água destilada e autoclavada

2.1.2 Ovários imaturos

Para a obtenção dos ovários imaturos, as inflorescências foram coletadas de plantas adultas no campo. Na coleta, selecionaram-se inflorescências em estágio anterior à antese, isto é, ainda encobertas pelas espatas e apresentando diferentes estádios de desenvolvimento, caracterizado de acordo com o comprimento das espatas (40 - 120 cm). Para a coleta, as folhas próximas às inflorescências foram removidas para que o pecíolo das inflorescências fosse seccionado o mais próximo do estipe, evitando que as espatas fossem danificadas.

Uma vez coletadas, as inflorescências foram desinfestadas externamente por imersão em álcool (70%, v/v) por 3 minutos e NaOCl (2,5% de cloro ativo, v/v) por 40 minutos, seguido por um enxágue em água destilada e autoclavada por 5 minutos. As espatas foram abertas com o auxílio de bisturi, e as ráquias que continham a flor feminina e masculina

foram isoladas. Os ovários foram utilizados como explantes na indução de calos e as flores masculinas foram descartadas. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

2.2 Indução de calos

Para a indução de calos, as folhas e ovários (provenientes das inflorescências), foram inoculados em meio de cultura Y3 (Eeuwens, 1976). A fonte de Fe-EDTA e vitaminas foi mantida de acordo com a concentração original de MS (Murashige e Skoog, 1962). As auxinas dicamba, picloram e 2,4-D foram acrescentadas em cinco concentrações: 0, 225, 450, 675 e 900 μM . Todos os meios foram suplementados com 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e gelificado com 2,5 g.L^{-1} de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO). Os explantes permaneceram no meio de indução até a obtenção de calo primário.

Nos explantes foliares, os calos formados foram isolados e transferidos para meio de multiplicação contendo os mesmos componentes do meio de indução, exceto pela retirada do carvão ativado e a concentração de auxina que foi reduzida para 40 μM e acrescentada a citocina 2iP na concentração de 10 μM . Após o isolamento dos calos formados, os explantes foliares foram mantidos em meio de indução para continuarem a formação de novos calos por um período de até 12 meses.

2.3 Influência do meio de cultura na indução de calos

Após a determinação da melhor auxina e concentração na indução de calos, foi realizado um novo experimento, tanto para folhas quanto para ovários, para verificar o efeito das formulações salinas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962) e Y3 (Eeuwens, 1976) na formação de calos.

Em ambos os meios de cultura testados, a fonte de Fe-EDTA e vitaminas foi mantida de acordo com a concentração original de MS. Adicionalmente, os meios foram suplementados com 30 g.L^{-1} de sacarose, 0,5 g.L^{-1} de glutamina e 2,5 g.L^{-1} de carvão ativado e gelificado com 2,5 g.L^{-1} de *Phytigel*. A auxina picloram foi acrescentada na concentração de 450 μM .

2.3.1 Folhas imaturas

No experimento com folhas imaturas e aclorofiladas, além dos meios de cultura testou-se a região foliar de origem dos explante.

O palmito foi coletado com aproximadamente 20 cm de comprimento e desinfestado conforme descrito anteriormente, e dividido em duas regiões de 10 cm cada, denominadas de basal e apical. As regiões foram classificadas segundo a proximidade do meristema apical do caule, sendo basal a mais próxima ao meristema e apical a mais distante. As folhas, de cada região, foram separadas, e os folíolos não expandidos e agrupados foram seccionados transversalmente em retângulos de cerca de 0,5 de altura por 1,0 cm de largura e imediatamente colocados em contato com o meio de indução de calos.

2.3.2 Ovários imaturos

No experimento com ovários imaturos associado ao meio de cultura, foi avaliado o tamanho/região do ovário na indução de calos. Para tanto, utilizaram-se ovários inteiros e seccionados ao meio transversalmente (da base para o ápice) e longitudinalmente, totalizando quatro tipos de explantes.

Além do tipo de explante, o efeito de diferentes estádios de desenvolvimento da inflorescência, caracterizado de acordo com o tamanho das espatas (40 - 120 cm) foi avaliado. Para tanto, as inflorescências foram classificadas em I1, I2 e I3, cujas espatas se encontraram com comprimento entre 40-55, 70-85, 100-115 cm de comprimento, respectivamente. Para cada categoria foram utilizadas duas inflorescências.

Em ambos os explantes utilizados e em todas as fases do cultivo, os meios de cultura tiveram o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do agente gelificante e autoclavados à 121°C e 1,5 atm durante 20 minutos. Os subcultivos foram realizados a cada 45 dias em placas de *Petri* (15 x 90 mm), com aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa, sendo os cultivos mantidos no escuro e em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.4 Análise histológica

Para a análise de microscopia de luz, as amostras foram fixadas em solução de FAA 70% (paraformaldeído, álcool 70% e ácido acético) por um período mínimo de 24 horas, sob

vácuo durante a primeira hora, seguida de desidratação em série alcoólica crescente (70 - 100%), e infiltradas em historesina (Leica®). Cortes seriados longitudinais e transversais (05 e 07 μm) foram obtidos em micrótomo rotatório manual, distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecedora a 40 °C. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina (O' Brien, 1964) e montados com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os resultados foram registrados em microscópio acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Software ImagePro 4.0).

2.5 Coleta de dados e análise estatística

2.5.1 Folhas imaturas

Nos experimentos com folhas imaturas, a avaliação da formação de calo primário foi realizada após 150 dias de cultivo em meio de indução e de calo embriogênico 30 dias após a transferência para meio de multiplicação.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado. Os dados de indução obtidos com o uso de auxinas e concentrações foram avaliados segundo um esquema fatorial 3 x 5 (auxinas x concentrações) totalizando 15 tratamentos. Cada tratamento esteve composto por pelo menos 5 repetições que contiveram 5 explantes cada. Para o efeito dos meios de cultura e região do palmito, os dados foram avaliados em esquema fatorial 2 x 2 (meios de cultura x regiões do palmito) totalizando 4 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições e continham 5 explantes cada.

2.5.2 Ovários imaturos

No experimento de indução de calos em ovários imaturos, a avaliação da formação de calos foi realizada após 8 meses de cultivo.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado. Os dados de indução obtidos com o uso de auxinas e concentrações foram avaliados em esquema fatorial 3 x 4 (auxinas x concentrações) totalizando 12 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições que continham 5 explantes. Para o efeito de meios de cultura e tamanho do explante, os dados foram avaliados em esquema fatorial 2 x 3 (meios de cultura x tamanho do explante), totalizando 6 tratamentos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições que abrangiam 5 explantes por parcela.

Em todos os experimentos realizados no referido estudo, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para as análises utilizou-se o programa de análises estatísticas Sisvar (Ferreira, 2011). Dados expressos em percentagem foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{0,5}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Folhas imaturas obtidas de plantas adultas

3.1.1 Efeitos de diferentes auxinas e concentrações na indução de calos

As primeiras alterações nos explantes foram observadas após uma semana em meio de cultura e envolveram: o intumescimento das folhas causando o aumento do tamanho do explante e a alteração da textura foliar de maleável para mais consistente ou quebradiça, além do início da oxidação dos explantes (Figura 1A). A oxidação dos explantes foi observada, a princípio, nas bordas seccionadas dos explantes (Figura 1B) e, em alguns tratamentos, evoluiu para todo o explante (Figura 1C). Os explantes avaliados como oxidados foram aqueles que apresentaram todo o tecido foliar escurecido. Desse modo, a maior percentagem de oxidação ocorreu nos tratamentos suplementados com dicamba, com média de 88%, seguida pelos tratamentos que continham 2,4-D (48%) e picloram (25%) (Tabela 1). Ressalta-se que, mesmo com a intensa oxidação, os explantes não foram eliminados inicialmente, pois apresentavam sinais de reação, como o intumescimento.

O controle da oxidação nos cultivos pelo uso do carvão ativado tem sido relatado para algumas palmeiras como *E. guineensis* (Silva *et al.*, 2012) e *Euterpe edulis* (Saldanha *et al.*, 2006). No presente trabalho, observou-se que o uso desse antioxidante combinado com concentrações elevadas de picloram foi eficiente no controle da oxidação, o que favoreceu a produção de calos. Em contraste, quando se utilizou o 2,4-D e dicamba o uso do carvão ativado não foi suficiente para reduzir a oxidação dos explantes com consequentemente diminuição nos índices de formação de calos.

Diversos fatores como, os explantes seccionados, o ambiente *in vitro*, assim como os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura são fatores que podem gerar estresses significativos nas células. O estresse oxidativo pode aumentar os níveis de auxina endógena, induzir a adaptação e promover a desdiferenciação celular (Pasternak *et al.*, 2002). Conquanto, se o nível de estresse fisiológico for superior ao tolerado pela célula (Lichtenthaler, 1998), ocorre intensa oxidação dos explantes que diminuem a competência dos tecidos em consequência da perda da totipotencialidade das células (Benson, 2000), seguindo para apoptose celular.

Em explantes não oxidados observou-se o início de formações calogênicas após quatro meses de cultivo. A formação de calos não obedeceu a um padrão de origem nos explantes,

mas de forma geral, foram visualizados nas bordas (Figura 1D), ou entre as folhas (Figura 1E). Os calos formados, em geral, apresentaram consistência compacta, coloração amarelo-clara e formato nodular, sendo denominados de calos primários (Figura 1F). Calos compactos de coloração amarelo-clara e formato alongado também foram observados com frequência (Figura 1 E).

A avaliação do percentual de calos primários formados foi realizada aos cinco meses de cultivo (Tabela 1). O resultado observado indicou que a resposta foi significativamente influenciada pela fonte de auxina e concentração utilizada.

A indução de calos em palmeiras a partir de explantes foliares tem sido obtida com sucesso utilizando a auxina 2,4-D, como observado para *Euterpe edulis* (Saldanha *et al.*, 2006), *Phoenix dactylifera* (Gueye *et al.*, 2009), *Elaeis guineenses* (Hapsoro, 2011) e *Euterpe edulis* (Saldanha *et al.*, 2006). No entanto, os resultados obtidos no supradito trabalho demonstram a superioridade da auxina picloram em relação ao uso do 2,4-D na indução de calos primários, com média de 26% e 2%, respectivamente. Nos tratamentos que contiveram dicamba não se observou a formação de calo, possivelmente em consequência da forte oxidação verificada nos explantes.

Em meio suplementado com picloram, as concentrações de 450, 675 e 900 μM proporcionaram formações calogênicas, sendo os melhores resultados (80%) obtidos em meio contendo 450 μM , o qual diferiu significativamente dos valores obtidos nas demais concentrações utilizadas. Em meio de cultura acrescido de 2,4-D, a formação de calos ocorreu somente na concentração de 675 μM , com 10% explantes com calos, enquanto que em meio com dicamba nenhuma concentração foi capaz de proporcionar a formação de calos (Tabela 1).

As diferenças observadas na resposta à essas auxinas pode ser resultado do tipo ou número de receptores presentes nas células para cada tipo de regulador de crescimento aplicado (Sauer *et al.* 2013). Adicionalmente, a ineficiência de algumas auxinas pode ser explicada pela inativação dessas auxinas, uma vez que, auxinas sintéticas também podem ser inativadas por conjugação enzimática com glicose (Klems *et al.*, 1998).

Tabela 1. Capacidade de formação de calos em explantes foliares de *Acrocomia aculeata* sob influência de diferentes concentrações de 2,4-D, Dicamba e Picloram.

Concentrações	Oxidação (%)			Calo primário (%)			Calo embriogênico (%)		
	2,4-D	Dicamba	Picloram	2,4-D	Dicamba	Picloram	2,4-D	Dicamba	Picloram
0	50 aA	25 bA	0 aA	0 aA	0 aA	0 cA	0 aA	0 aA	0 bA
225	25 aB	100 aA	0 aB	0 aA	0 aA	0 cA	0 aB	0 aB	0 bA
450	80 aA	100 aA	40 aB	0 aB	0 aB	80 aA	0 aB	0 aB	64 aA
675	25 aB	100 aA	25 aA	10 aB	0 aB	20 bA	0 aB	0 aB	10 bA
900	50 aA	100 aA	30 aA	0 aB	0 aB	20 bA	0 aA	0 aA	5 bA
Média	48 b	88 a	25 c	2 b	0 b	26 a	0 b	0 b	22 a

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal pertencem ao mesmo grupo de médias segundo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Após o isolamento dos calos e transferência para meio de multiplicação, observou-se a formação de novos calos tanto com formato nodular quanto alongado, ambos com características embriogênicas, apresentando consistência compacta e coloração amarelo-escura (Figura 1G). O calo embriogênico nodular (Figura 1H) apresentou constituição celular meristemática, com células formadas por núcleo volumoso e citoplasma denso evidenciados pela análise histológica (Figura 1I).

Já, o calo embriogênico do tipo alongado desenvolveu estruturas nodulares com superfície homogênea e brilhante (Figura 1J). A análise histológica dos calos alongados revelou que esses calos são formados, em maior parte, por células meristemáticas, visualizadas principalmente na porção interna do calo. Na periferia do calo, as células apresentaram-se maiores, vacuoladas, sem núcleo visível (Figura 1L), sugerindo estarem inviáveis, como observado também durante a embriogênese somática de *Phoenix dactylifera* (Gueye *et al.*, 2009). As estruturas nodulares formadas sob os calos alongados originaram-se da região central do calo e possuíram a mesma constituição celular da região de origem, ou seja, células meristemáticas (Figura 1M).

A avaliação da formação de calos embriogênicos foi realizada 60 dias após o isolamento dos calos e transferência para meio de multiplicação. Dos 80% de calos primários formados na presença de 450 μM de picloram, 64% foram capazes de se converter em calos embriogênicos (Tabela 1).

A permanência dos calos embriogênicos em meio de multiplicação permitiu o desenvolvimento de um calo com consistência mucilagínosa e coloração esbranquiçada típica

a partir de alguns calos embriogênicos já existentes, que se tornou um aglomerado amorfo com o passar do tempo.

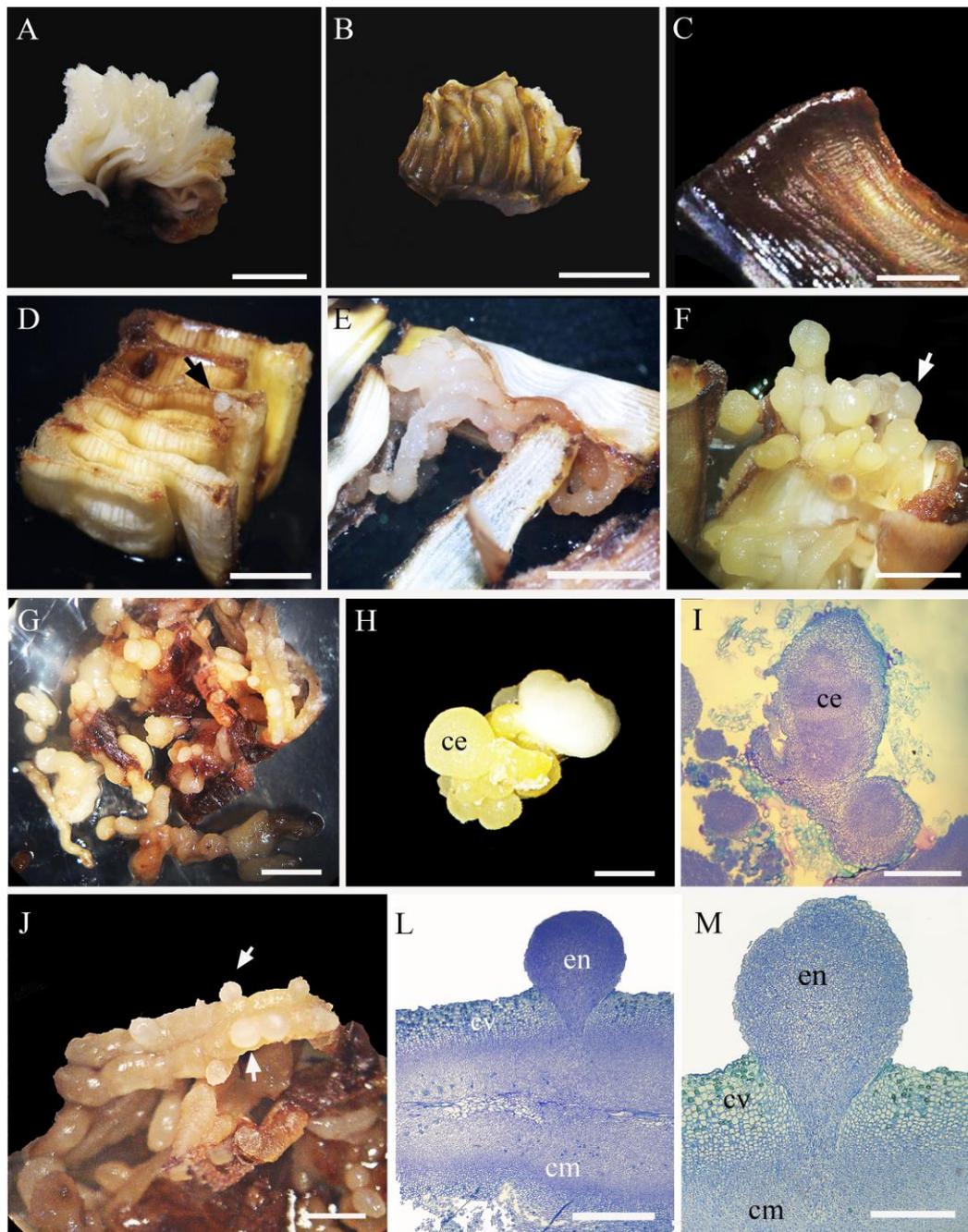


Figura 1: Aspecto dos calos obtidos a partir de folhas imaturas de plantas adultas de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Explante em início de cultivo apresentando intumescimento. B: Explante exibindo início de oxidação dos tecidos. C: Explante apresentando forte oxidação. D: Início de formação de calo primário na borda da folha (seta). E: Calo primário alongado entre as folhas. F: Calo primário nodular apresentando colocação amarelo-clara (seta). G: Calos isolados do explante em meio de multiplicação. H: Calo nodular embriogênico. I: Micrografia de luz evidenciando calo nodular embriogênico. J: Estruturas nodulares formadas a partir de calos alongados. L: Microscopia de luz mostrando o aspecto celular do calo alongado e estrutura nodular. M: Detalhe da estrutura nodular formada por células meristemáticas. Abreviações: (ce) calo embriogênico, (cm) células meristemáticas; (en) estrutura nodular, (cv) células vacuoladas. Barras = A, B, G e J: 0,5 cm; C: 0,2 cm; E: 0,8 cm; F: 1cm; H: 0,6 cm; I e L: 200 μ m; M: 100 μ m.

3.1.2 Influência do meio de cultura e da região do palmito na indução de calos

Após definir a auxina picloram e a concentração de 450 μM como mais adequadas para o estabelecimento da competência calogênica em células de folhas imaturas de macaúba, foi avaliado o efeito de duas soluções salinas, de MS e Y3 e duas regiões do palmito a fim de otimizar a formação de calos.

Com relação à influência da região do palmito na formação de calos primários, observou-se que os explantes oriundos da região apical apresentaram resultados superiores aos da região basal, principalmente, quando foram cultivados em meio Y3 com média de 93%, enquanto que em MS foi obtido 47% (Figura 2A). Segundo Stasolla e Yeung (2003), tecidos em diferentes fases de desenvolvimento apresentam diferentes respostas no cultivo *in vitro*. O nível de auxina endógena presentes em cada explante possivelmente seja outro fator que influencia a resposta *in vitro* (Wang *et al.*, 2011).

Os resultados mostraram que o meio Y3 foi significativamente superior ao de MS na indução de calos primários. Resultados semelhantes foram observados nos experimentos realizados com embriões zigóticos de macaúba descritos anteriormente (cf. capítulo 1).

Após a transferência para meio de multiplicação, apenas os calos primários formados a partir de explantes cultivados em Y3 progrediram para a formas embriogênicas. Entre as regiões testadas, nesse estágio, não ocorreu diferenças na formação de calo embriogênico (Figura 2B).

O meio de MS possui nível mais elevado de nitrogênio que o Y3. O nitrogênio é considerado um elemento chave na indução de calos e na embriogênese somática, uma vez que, níveis elevados sob a forma de composto orgânicos conduzem a melhor taxa de proliferação e diferenciação celular (Wetherell; Halperin, 1963). Dessa forma, os resultados obtidos no atual trabalho sugerem que na fase de indução de calos não é necessário concentrações elevadas desse componente no meio de cultura para macaúba.

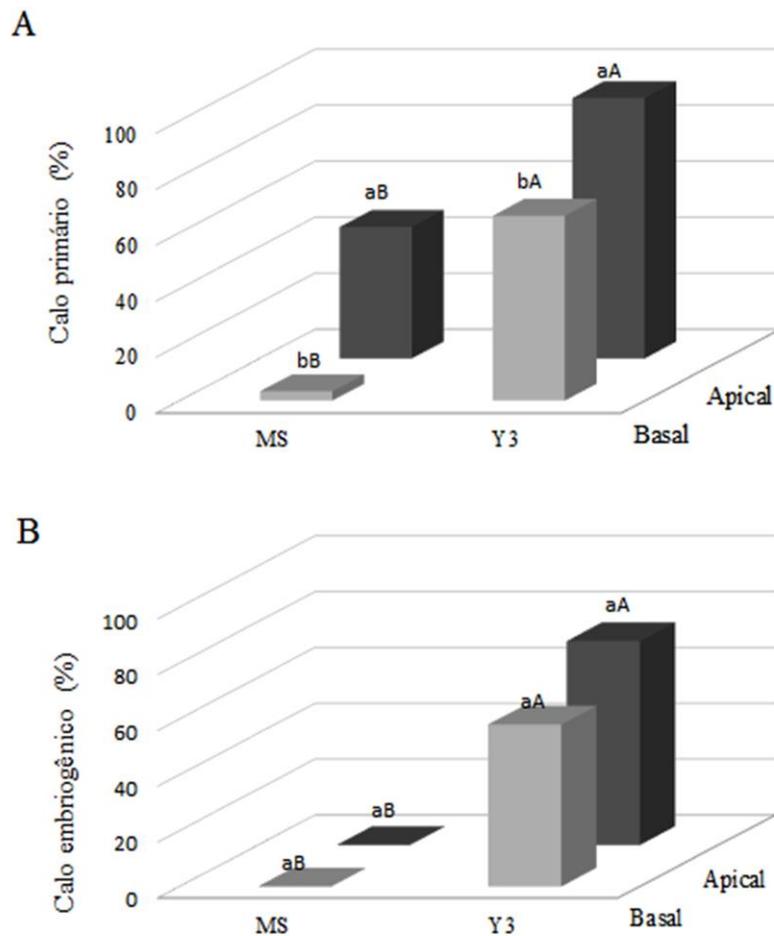


Figura 2. Efeito do meio de cultura e da região do palmito na formação de calos primários (A) e embriogênicos (B) em Macaúba (*Acrocomia aculeata*). Letras iguais, minúsculas na vertical (entre as regiões em cada meio) e maiúsculas na horizontal (entre os meios), pertencem ao mesmo grupo de médias segundo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. não mostram diferenças significativas segundo teste de Scott Knott, a 5% de significância.

3.2 Ovários imaturos

3.2.1 Efeitos de diferentes auxinas e concentrações na indução de calos

Nos primeiros 30 dias, todos os tratamentos apresentaram intensa oxidação dos tecidos com 100% de explantes oxidados (Tabela 2) e necrosaram rapidamente, com exceção dos tratamentos controles.

A oxidação geralmente ocorre em resposta a diversos fatores que podem induzir o estresse celular, tal situação se caracteriza pelo escurecimento das partes excisadas dos

explantes e do meio de cultivo, o que influencia na absorção dos constituintes do meio pelo explante em virtude da obstrução do tecido oxidado. Tal oxidação é resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado (Van Winkle *et al.*, 2003). Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação; como melanina, suberina, lignina, cutina e calose, em torno da superfície excisada, modificam a composição do meio de cultivo e, conseqüentemente, a absorção de metabólitos. Os compostos fenólicos sofrem oxidação pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas que normalmente inibem o crescimento dos explantes, e ocasiona, não raramente, a morte destes (Sato *et al.*, 2001).

A oxidação do explantes é comum em diversas espécies que são cultivadas em meio de cultura que contém concentrações elevadas de auxinas, incluindo as palmeiras (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010). Para diminuir os efeitos da oxidação utiliza-se, em geral, o carvão ativado adicionado ao meio de cultura que age como adsorvente tanto de compostos indesejáveis quanto de reguladores de crescimento, promovendo o desenvolvimento do cultivo *in vitro* (Zavattieri *et al.*, 2010).

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, Dicamba e Picloram na formação de calos em ovário de inflorescências imaturas de *Acrocomia aculeata*.

Concentrações	Oxidação (%)			Calo nodular (%)		
	2,4-D	Dicamba	Picloram	2,4-D	Dicamba	Picloram
0	50 aA	60 aA	80 aA	0 aA	0 aA	0 bA
225	100 aA	100 aA	100 aA	0 aA	0 aA	0 bA
450	100 aA	100 aA	100 aA	0 aB	0 aB	21 aA
675	100 aA	100 aA	100 aA	0 aA	0 aA	0 bA
900	100 aA	100 aA	100 aA	0 aA	0 aA	0 bA
Média	90 a	92 a	96 a	0 b	0 b	4,2 a

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal pertencem ao mesmo grupo de médias segundo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O desenvolvimento de calos a partir de ovários foi considerado lento, com o início da formação observada após sete meses em meio de cultivo em explantes oxidados (Figura 3A). Os calos formados apresentaram aspecto nodular e coloração amarelo-clara, desde o início do

desenvolvimento (Figura 3B). A permanência em meio de indução favoreceu o desenvolvimento dos calos (Figura 3C). A análise histológica mostrou que os calos nodulares apresentam formação meristemática, com poucas células parenquimáticas observadas na periferia do explante (Figura 3D).

Os calos nodulares se desprendiam com facilidade do explante de origem, principalmente durante a transferência de meio e, por isso, foram inoculados isolados do explante de origem em meio de indução. A permanência dos calos nodulares, após isolamento, em meio de indução promoveu a multiplicação dos mesmos formando agregados (Figura 3E). A análise histológica desses agregados evidenciou que os calos, em geral, se mantêm conectados entre si e são formados por células meristemáticas.

A avaliação dos calos formados a partir de ovários foi realizada após nove meses em meio de indução. A formação de calos foi obtida somente em meio suplementado com 450 μM de picloram, com 21% de explantes contendo calos (Tabela 2). Esses dados reforçam os observados anteriormente com o uso de tecidos foliares como fonte de explante. Na formação de calos em inflorescências de *Euterpe edulis*, o picloram também foi a auxina mais eficiente em comparação com dicamba e 2,4-D (Steinmacher *et al.*, 2007).

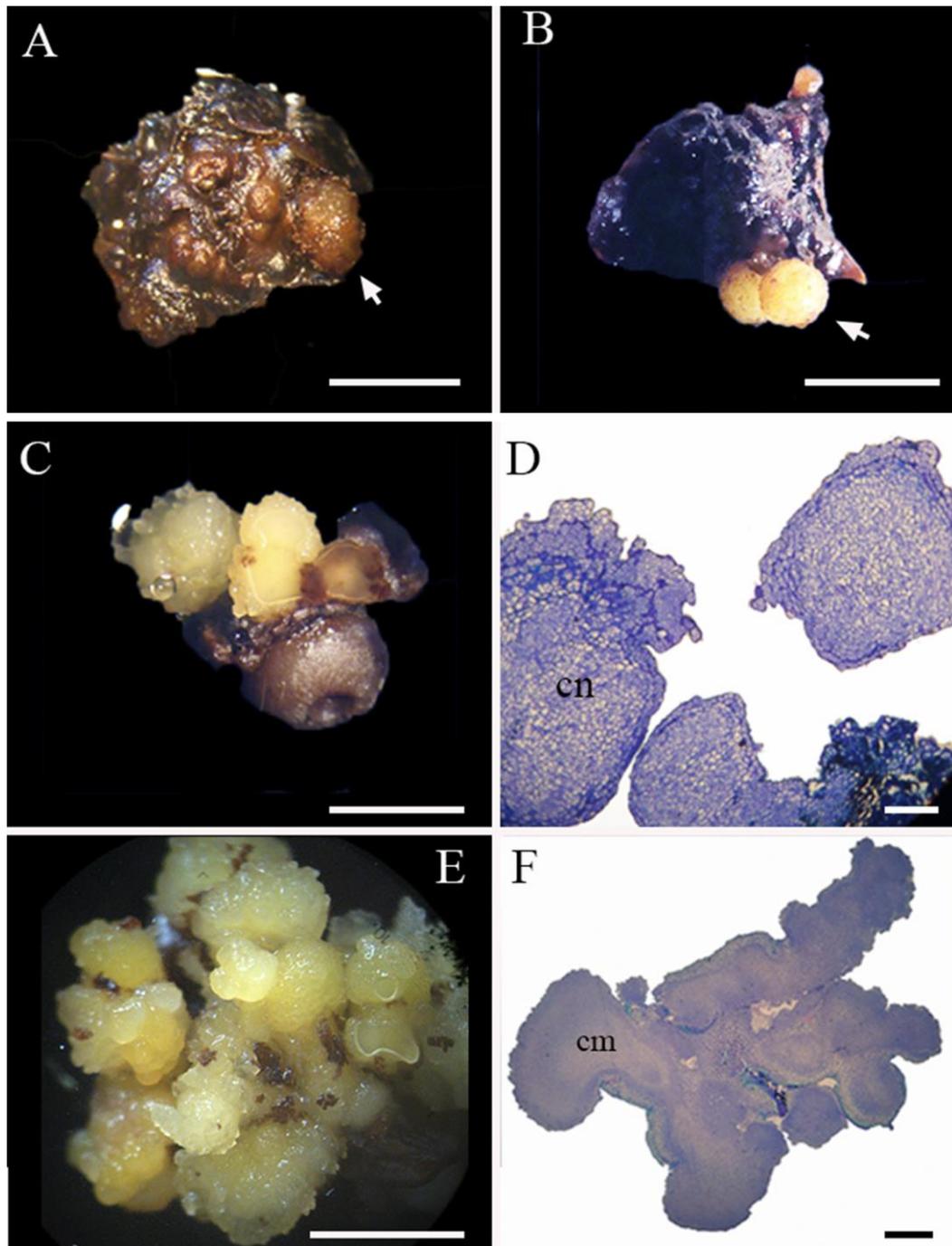


Figura 3: Aspecto dos calos obtidos a partir de ovários de inflorescências imaturas de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Explante apresentando oxidação e início de formação de calo (seta). B: Início de formação de calo nodular (seta). C: Calo nodular em fase mais avançada de desenvolvimento. D: Microscopia de luz evidenciando calo nodular constituído por células meristemáticas. E: Aglomerado formado por calo nodular após ser isolado do explante de origem. F: Microscopia de luz evidenciando o aglomerado formado por calos nodulares. Abreviações: (cm) células meristemáticas; (cn) calo nodular. Barras: A, B, C = 0,8 cm. D = 100 μ m. E = 1,0 cm, F = 200 μ m.

3.2.2 Influência do meio de cultura, tamanho e região do ovário e estágio de desenvolvimento da inflorescência na indução de calos

Após a definição da melhor concentração e auxina (450 μM de picloram) para indução de calos em ovários imaturos de macaúba, os meios de cultura Y3 e de MS foram avaliados, associando-os ao tipo de explante, quanto ao tamanho e região do ovário, e ao estágio de desenvolvimento da inflorescência na indução de calos.

Com relação ao efeito do tipo de explante na formação de calos, verificou-se que os melhores resultados foram obtidos quando a parte basal do ovário foi utilizada, com resultados significativos em meio de MS (37%) comparativamente ao Y3 (22%) (Figura 4). A menor percentagem de indução de calos foi verificada com o uso da região apical do ovário, com 4% em meio de MS e 5,5% em Y3.

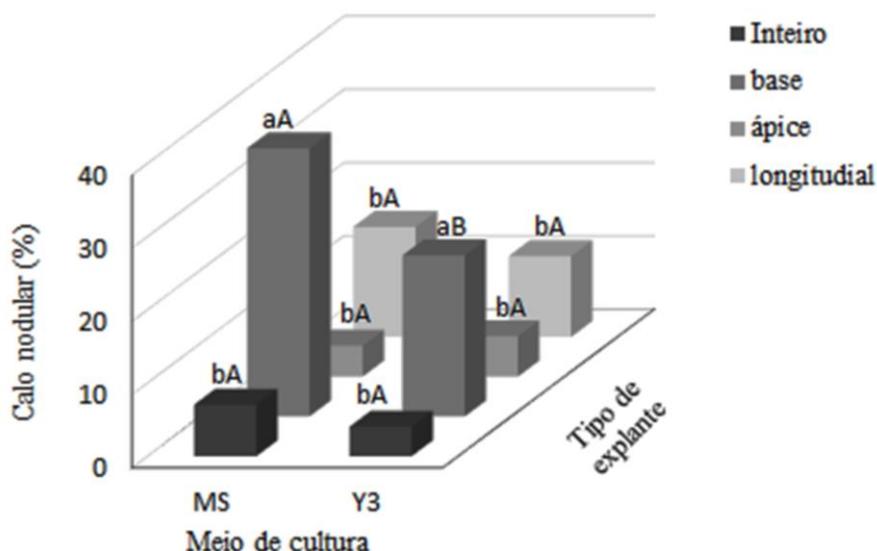


Figura 4. Efeito de meios de cultura e de tipos de explantes na formação de calos nodulares em ovário de Macaúba (*Acrocomia aculeata*). Letras iguais, minúsculas na vertical (entre os tipos de explante) e maiúsculas na horizontal (entre os meios), pertencem ao mesmo grupo de médias segundo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Diferente do observado no experimento realizado anteriormente com o uso de explantes foliares, o meio de MS apresentou resultados superiores ao de Y3 em todos tipos de explantes de ovário, exceto para o uso da região apical do ovário (Figura 4). Guedes *et al.* (2011) ao compararem o efeito dos meios de cultura de MS e Y3 em explantes de

inflorescências da palmeira *Elaeis guineenses*, observaram valores superiores de indução de calos em meio de MS, corroborando os resultados obtidos anteriormente por Teixeira *et al.* (1994).

No experimento para avaliar o efeito do estágio de desenvolvimento da inflorescência, verificou-se que os explantes mais responsivos foram aqueles obtidos de inflorescências com comprimento entre 100 a 110 cm (I3), com 39% de formação de calos primários (Figura 5). As inflorescências de menor comprimento (I1), proporcionaram resultados significativamente inferiores, com 6% de explantes com calos. Tais resultados contrastam a teoria de que explantes mais jovens são mais sensíveis do que as derivados de tecidos adultos (Raemakers *et al.* 1995), fato também observado quando se testou diferentes regiões de folhas imaturas de plantas adultas (cf. § 3.1).

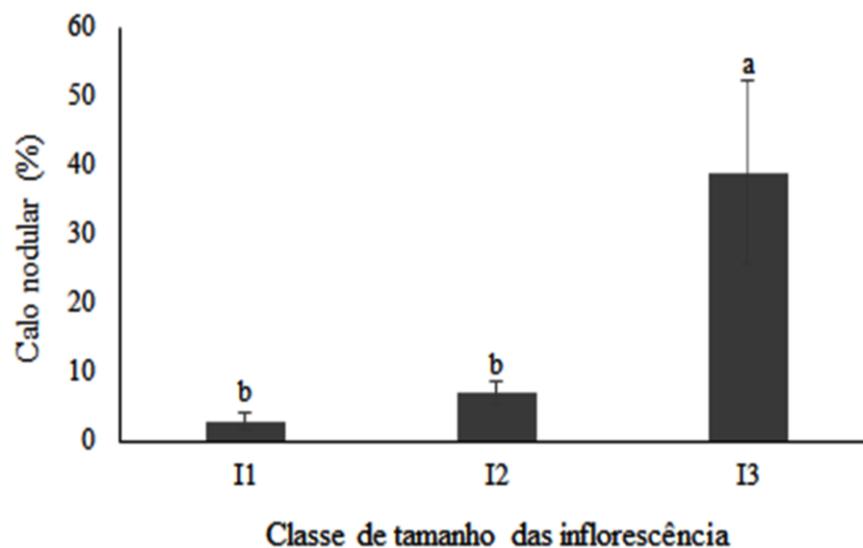


Figura 5. Influência do estágio de desenvolvimento de inflorescências sobre a formação de calos nodulares em ovário de Macaúba (*Acrocomia aculeata*). Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo segundo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4. CONCLUSÕES

- Os fatores determinantes na aquisição da competência para a formação de calos a partir de folhas e ovários imaturos de plantas adultas de macaúba são: região do palmito e do ovário utilizada como explante, fonte e concentração de auxina, e o meio de cultura;
- A eficiência na indução de calos é maior quando se utiliza tecidos foliares localizados aproximadamente entre 20 e 30 cm acima do meristema apical evidenciando que não há necessidade de coletar a região do meristema e eliminar a planta matriz;
- O uso 450 μM de picloram associado ao meio Y3 tem melhor efeito na formação de calos embriogênicos em explantes foliares;
- Em ovários, a resposta morfogênica é estimulada em condições de altas concentrações (450 μM) da auxina picloram associada ao meio de cultura de MS e região basal do ovário.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASEMOTA O, EKE C, EMOGHENE B. (2010) Investigation of Somatic Embryogenesis for *In Vitro* Cultures of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Acta Horticulturae*, 882: 225–232p.
- BALZON TA, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. (2013) New approaches to improve the efficiency of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from mature zygotic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(1): 41-50.
- BENSON EE. (2000) Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant* 36:163–170.
- EEUWENS CJ. (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissues explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera* L.) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 36(1): 23-28.
- FERREIRA DF. (2011) Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. *Ciência Agrotécnica*, 35(6):1039-1042.
- GAGLIARDI RF, PACHECO SP, COCULILO JFM, VALL, MANSUR E. (2000) *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). *Biodiversity and Conservation* 9:943-951.
- GUEDES RS, DA-SILVA TL, LUIS ZG, SCHERWINSKI-PEREIRA JE (2011) Initial requirements for embryogenic calluses initiation in thin cell layers explants from immature female oil palm inflorescences. *African Journal of Biotechnology*, 10(52):10774-10780.
- GUEYE, B, SAID-AHMED H, MORCILLO F., BORGEL A, D. SANÉ D, HILBERT JL, VERDEIL JL, BLERVACQ AS. (2009) Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98(1): 47–58.
- HAPSORO D. (2011) *In Vitro* callus induction and embryogenesis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from leaf explants. *HAYATI Journal of Biosciences*, 18(2): 1-5.
- KLEMS M, TRUKSA M, MACHACKOVA I, EDER J, PROCHAZKA S. (1998) Uptake, transport and metabolism of C¹⁴-2,4-dichlorophenoxyacetic acid (C¹⁴-2,4-D) in cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants. *Plant Growth Regulation* 26:195-202.
- LICHTENTHALER HK. (1998) The stress concept in plants: an introduction. Ann. NY Academic. Scienc. 851: 187–198.

- LORENZI GMAC. (2006) *Acrocomia aculeata* (lodd.) ex Mart. - *Arecaceae: Bases para o extrativismo sustentável*. Curitiba: Tese. Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, 172p,
- MOURA EF, MOTOIKE SY, MC VENTRELLA, SÁJÚNIOR AQ, FERREIRA MC, CARVALHO M. (2009) Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, 119: 447-454.
- MURASHIGE T, SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-49.
- PERERA PP, HOCHER P, VERDEIL JL, DOULBEAU S, YAKANDAWALA DMD, Weerakoom LK (2007). Unfertilized ovary: a novel explant for coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cellular Report* 26:21-28.
- PTAK A, TAHCHY A E, SKRZYPEK E, WÓJTOWICZ T, LAURAIN-MATTAR D. (2013) Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucosium aestivum* callus. *Central European Journal of Biology* 8(6):591-599.
- RAEMAKERS CJJ, JACOBSEN E, VISSER RGF. (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107.
- RIBEIRO LM, OLIVEIRA DMT, GARCIA QDS. (2011) Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, *Arecaceae*) during *in vitro* germination. *Trees* 26(3): 851–863.
- ROSCOE R, RICHETTI A, MARANHO E. (2007) Análise de viabilidade técnica de oleaginosas para produção de biodiesel em Mato Grosso do Sul. *Revista Política Agrícola*, 1:48-59.
- SALDANHA CW, MARTINS-CORDER1 MP, STEINMACHER DA, GUERRA MP. (2006) *In vitro* morphogenesis in zygotic embryos and leaf sheaths of *Euterpe edulis* M. (*Arecaceae*). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 6: 228-235.
- SANÉ D. (2006) Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Annals of Botany* 98: 301-308.
- SATO AY, DIAS HCT, ANDRADE LA, SOUZA VC. (2001) Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. *Cerne*, Lavras, 7(2): 117-123.
- SAUER M, ROBERT S, KLEINE-VEHN J. (2013) Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64(9): 2565-2577.
- SCHERWINSKI-PEREIRA JE, GUEDES RS, COSTA FHS. (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*. DOI 10.1007/s11627-010-9279-6

- SILVA RC, LUIS ZL, SCHERWINSKI-PEREIRA JE. (2012) Differential responses to somatic embryogenesis of different genotypes of Brazilian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Doi: 10.1007/s11240-012-0170-5.
- STASOLLA C, YEUNG EC (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 74:15–35
- STEINMACHER DA, CLEMENT CR, GUERRA MP. (2007) Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 89:15-22.
- TEIXEIRA JB, SONDAHL MR, KIRBY EG. (1994) Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports*, 13(5):247-250.
- VAN WINKLE SC, PULLMAN GS (2003) The combined impact of pH and activated carbon on the elemental composition of a liquid conifer embryogenic tissue initiation medium. *Plant Cell Reports*, 22:303–311.
- WANG X; NOLAN, KE; IRWANTO, R.R.; SHEAHAN, M.B; ROSE R.J. (2011) Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. *Annals of Botany*, 107: 599-609.
- WETHERELL DF, HALPERIN W. (1963) Embryos derived from callus tissue cultures of the wild carrot. *Nature*, 200:1336-1337.
- ZAVATTIERI M, FREDERICO A, LIMA M, SABINO R, ARNHOLDT-SCHMITT B. (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1).

CAPÍTULO IV

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.] A MÉDIO-LONGO PRAZO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS

**CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.
ex Mart.] A MÉDIO-LONGO PRAZO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS**

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a tolerância à dessecação e o armazenamento a médio-longo prazo de sementes de macaúba em temperaturas reduzidas por até 360 dias. Inicialmente, as sementes foram avaliadas quanto a tolerância à dessecação em sílica gel por até 168 horas. Para tanto, a cada 24 horas a umidade e a viabilidade das sementes foram determinadas. Uma vez determinada a melhor umidade para o armazenamento, as sementes foram armazenadas a -196 (nitrogênio líquido), -20, 6 e 25 °C por períodos de 0, 90, 180 e 360 dias. Para avaliar a viabilidade e germinação após cada período de armazenamento, as sementes foram desinfestadas e os embriões zigóticos excisados e cultivados *in vitro*. Os resultados indicaram que as sementes de macaúba podem ser dessecadas para valores de até 4,3% de umidade, sem perda da viabilidade e com germinabilidade superiores a 90%. As sementes armazenadas por até 360 dias apresentaram perda gradual da viabilidade ao longo dos períodos de avaliação em todas as temperaturas de conservação testadas. Ao final do experimento a germinação atingiu valores de 46, 43, 50 e 56,6% da germinabilidade nas temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C, respectivamente. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que as sementes de macaúba não atendem as definições de comportamento das sementes como sendo ortodoxas e a categoria subortodoxa pode ser a mais adequada para classificá-las.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*, conservação *ex situ*, dessecação, tolerância.

MEDIUM-LONG TERM CONSERVATION OF MACAÚBA SEEDS (*Acrocomia aculeata* (Jack.) Lodd. Mart.) UNDER DIFFERENT STORAGE TEMPERATURES

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the desiccation tolerance and medium-long term storage at reduced temperatures for up to 360 days, of the macaúba seed. Initially, seeds were evaluated for desiccation tolerance in silica gel for up to 168 hours. For this, every 24 hours the moisture and seed viability were determined. Once the best humidity for storage was determined, the seeds were stored at -196 (liquid nitrogen), -20, 6, and 25° C for periods of 0, 90, 180 and 360 days. To assess the viability and germination after each storage period, the seeds were disinfested and zygotic embryos excised and cultured *in vitro*. The results indicated that the macaúba seeds can be desiccated to values of up to 4.3% moisture, without viability loss and germinability above 90%. Seeds stored for 360 days showed gradual loss of viability over the evaluation periods at all storage temperatures tested. At the end of the experiment, germination reached values of 46, 43, 50 and 56.6% germinability at 25, 6, -20 and -196° C, respectively. Based on these results, we conclude that the macaúba seeds do not meet the behavioral definitions of seeds as orthodox and the sub-orthodox category could be more appropriate to classify the seeds of this species.

Keywords: *Acrocomia aculeata*, *ex situ* conservation, desiccation, tolerance.

1. INTRODUÇÃO

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira nativa das savanas, cerrados e florestas abertas do Brasil Central, ocorre em áreas antropizadas e, em algumas localidades pode-se observar populações densas caracterizando essa espécie como oligárquica (Abreu *et al.*, 2012). Várias utilizações são descritas para a macaúba, dentre as quais, se destacam o uso do palmito, frutos e sementes, que são tradicionalmente utilizados para diversos fins pelas populações locais no âmbito doméstico, como na alimentação e o óleo extraídos dos frutos também é utilizado na fabricação de sabões (Lorenzi; Negrelle, 2006).

Apesar do potencial de tal espécie, o aproveitamento atual da macaúba apresenta características basicamente extrativistas, que resulta na exploração de plantas de baixo rendimento e coloca em risco as populações naturais, em razão da coleta sem planejamento dos frutos (Scariot, 1998). Portanto, a conservação dos recursos genéticos da espécie torna-se fundamental para garantir que a diversidade genética seja mantida e para auxiliar o desenvolvimento de futuros programas de melhoramento dessa espécie.

A forma mais eficaz para preservar a diversidade genética de muitas espécies de plantas ocorre por meio da conservação das sementes (Linington; Pritchard, 2001; Jain 2011). No entanto, esse tipo de armazenamento somente é indicado para espécies que possuem sementes tolerantes à dessecação e a temperaturas reduzidas e suportem longos períodos de armazenamento (Rajanaidu; Ainul, 2013).

As sementes que toleram essas condições de armazenamento são classificadas como tendo comportamento ortodoxo. Entretanto, segundo Roberts *et al.* (1984), um dos problemas na categorização do comportamento das sementes é o risco de se classificar erroneamente, uma vez que, grande parte dos trabalhos inferem o comportamento fisiológico após o armazenamento de sementes a partir de dados limitados, o armazenamento por períodos curtos e com o uso de poucas unidades experimentais.

Recentemente, em um estudo limitado a 3 meses de observações, as semente de macaúba foram classificadas como ortodoxas (Ribeiro *et al.* 2012). No entanto, por se tratar de uma semente oleaginosa, é interessante que se realizem novos estudos de armazenamento, inclusive mais prolongado para se inferir o real comportamento fisiológico das sementes de macaúba ao armazenamento *ex situ*.

O objetivo desse estudo foi avaliar a tolerância à dessecação e o armazenamento a médio-longo prazo de sementes de macaúba e, assim, inferir sobre o real comportamento fisiológico das sementes desta espécie durante a conservação *ex situ*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal e extração das sementes

Os frutos de macaúba (*Acrocomia aculeata*) foram coletados de populações naturais localizadas próximas a Sobradinho, Distrito Federal, Brasil (Anexo 1), entre os meses de novembro e dezembro de 2011.

As sementes foram extraídas de frutos em estágio fisiológico maduro, caracterizado por epicarpo apresentando coloração amarronzada e mesocarpo com consistência macia e coloração amarelada.

Após a coleta, os frutos foram processados manualmente para a retirada do epicarpo e armazenados por 15 dias para secagem em estufa de circulação de ar a 35 °C. Em seguida, o endocarpo foi quebrado com o auxílio de um torno manual para retirada das sementes.

2.2 Tolerância à dessecação e determinação da umidade

Para determinar a tolerância à dessecação, as sementes foram submetidas à secagem artificial em compartimento de plástico contendo sílica gel previamente desidratada em estufa a 100 °C por 24 horas. As sementes foram distribuídas uniformemente sob uma placa vazada e o recipiente foi vedado com parafilme e armazenado em câmara com temperatura de 25 ± 2 °C por períodos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h. Após cada período de dessecação foi determinado o teor de umidade e avaliado a germinabilidade das sementes.

Para avaliar a influência da dessecação na germinabilidade, as sementes foram desinfestadas por imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto e imersas por 30 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo, v/v). Posteriormente, as sementes foram enxaguadas por duas vezes em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, os embriões foram extraídos das sementes e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo meio de cultura de germinação (MG). O MG foi composto por sais de Y3 (Eeuwens, 1976), suplementado com vitaminas e solução de Fe-EDTA do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 3% de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, sendo este gelificado com 2,2 g.L⁻¹ de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO), antes da autoclavagem por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão.

Nos primeiros 30 dias, os tubos de ensaio contendo os embriões zigóticos foram mantidos no escuro a 25 ± 2 °C. Após esse período, estes foram transferidos para condições de luminosidade de $38 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

O teor de umidade das sementes foi determinado após cada período de dessecação pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas (Brasil, 2009). A percentagem de umidade das sementes foi calculada com base no peso úmido, aplicando-se a seguinte fórmula: % de umidade (U) = $100 (P-p) / P - t$ onde, P = peso inicial da semente após o período de dessecação; p = peso final da semente após armazenamento em estufa e t = peso do recipiente utilizado para a pesagem.

2.3 Teste de descongelamento das sementes

Previamente ao armazenamento foi realizado um teste para avaliar o melhor método de descongelamento das sementes. Esse experimento foi realizado para avaliar o efeito de dois métodos de descongelamento na percentagem de germinação de sementes armazenadas em temperaturas subzero.

Para tanto, sementes de macaúba foram colocadas em embalagens do tipo envelope aluminizado trifoliolado (polietileno-alumínio-polietileno) e impermeável, lacrados em seladora elétrica e armazenados sob temperatura de -20 °C por 90 dias.

Decorrido o período de armazenando, as embalagens contendo as sementes foram retiradas da câmara de refrigeração e submetidas às técnicas de descongelamento. No descongelamento lento, as sementes foram imediatamente acondicionadas em caixa térmica (isopor) por 24 horas. No descongelamento rápido, as embalagens que continham as sementes foram imersas em banho-maria a 40 °C por 15 minutos.

Após o descongelamento, as sementes foram desinfestadas e os embriões extraídos e inoculados em MG para avaliar o efeito do descongelamento na geminação, conforme condições descritas anteriormente.

2.4 Armazenamento das sementes a médio-longo prazo

Após realizados os testes de tolerância à dessecação, determinação do teor de umidade e descongelamento, amostras de sementes foram individualizadas e dessecadas por 96 horas

(melhor tempo ajustado), de acordo com a metodologia de dessecação de semente descrita previamente. Em seguida, as sementes foram colocadas em embalagens do tipo envelope aluminizado, lacrados em seladora elétrica e armazenadas sob as temperaturas de 25, 6, -20 e -196 °C por períodos de 0, 90, 180 e 360 dias.

Para o armazenamento na temperatura de -196 °C, as embalagens, contendo as sementes, foram acondicionadas em tubos cilíndricos de alumínio (canisteres) e colocadas em botijões contendo nitrogênio líquido.

Após cada período de armazenamento, os envelopes com as sementes foram retirados das respectivas temperaturas de conservação. Para avaliar a viabilidade após cada período, as sementes foram desinfestadas e os embriões extraídos inoculados em meio MG conforme a metodologia já descrita.

As sementes conservadas nas temperaturas de -20 e -196 °C foram descongeladas em banho-maria a 40 °C por 15 minutos após cada período de conservação, previamente à desinfestação e extração dos embriões zigóticos.

2.5 Avaliação da viabilidade das sementes e análise estatística

A viabilidade das sementes após cada período de armazenamento em diferentes temperaturas foi verificada por meio da germinação dos embriões zigóticos *in vitro*. O critério utilizado para constatar a germinação foi a emissão da radícula, seguida do desenvolvimento da parte aérea.

Todos os experimentos realizados nesse estudo seguiram delineamento inteiramente casualizado. Os dados de descongelamento foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011). No experimento de armazenamento a médio-longo prazo, as variáveis foram avaliadas segundo esquema fatorial 4 x 4 (temperaturas de conservação x períodos de armazenamento), totalizando 16 tratamentos. Cada tratamento foi formado por 30 repetições composta por uma semente cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Em todos os experimentos, dados referentes à percentagem de germinação foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{1/2}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Coleta do material vegetal e extração das sementes

As sementes extraídas de frutos recém-coletados apresentaram umidade de 24% e apresentavam-se aderidas ao endocarpo do fruto, o que dificultou a extração das sementes intactas.

A retirada do epicarpo dos frutos e o armazenamento em estufa a 35 °C por 15 dias favoreceu à dessecação dos frutos e possibilitou a extração das sementes inteiras. Esse método de dessecação em estufa proporcionou a extração de mais de 80% de sementes intactas que apresentaram 14% de umidade. Os embriões zigóticos excisados dessas sementes apresentaram 93% de germinabilidade *in vitro*.

O método utilizado nesse trabalho pode ser aplicado na dessecação de frutos de macaúba de forma eficiente e mais rápida que o método proposto por Ribeiro *et al.* (2012), o qual foi realizado pelo armazenamento dos frutos a 26 °C por 21 dias, com cerca de 50% de sementes intactas e 94% de embriões germinados.

3.2 Tolerância das sementes à dessecação e determinação de umidade

A dessecação das sementes de macaúba em sílica gel permitiu a redução do teor de umidade de 10% (tratamento controle) para 4,3%, após 168 horas (Figura 1A). A redução da umidade das sementes não afetou a viabilidade, visto ter sido observado 93% de germinabilidade para os embriões zigóticos extraídos das sementes do tratamento controle (0 horas de dessecação) e 91% para as dessecadas por 168 horas (Figura 1B). Esses resultados são semelhantes aos relatados por Ribeiro *et al.* (2012), que também verificaram que a viabilidade dos embriões de macaúba foi mantida após 168 horas de dessecação das sementes, independentemente do método de dessecação ter sido realizado em estufa ou sílica gel. Bicalho (2011) relata que as sementes de macaúba apresentam naturalmente baixo teor de umidade, e isso se deve à reserva majoritária das sementes ser de composição lipídica.

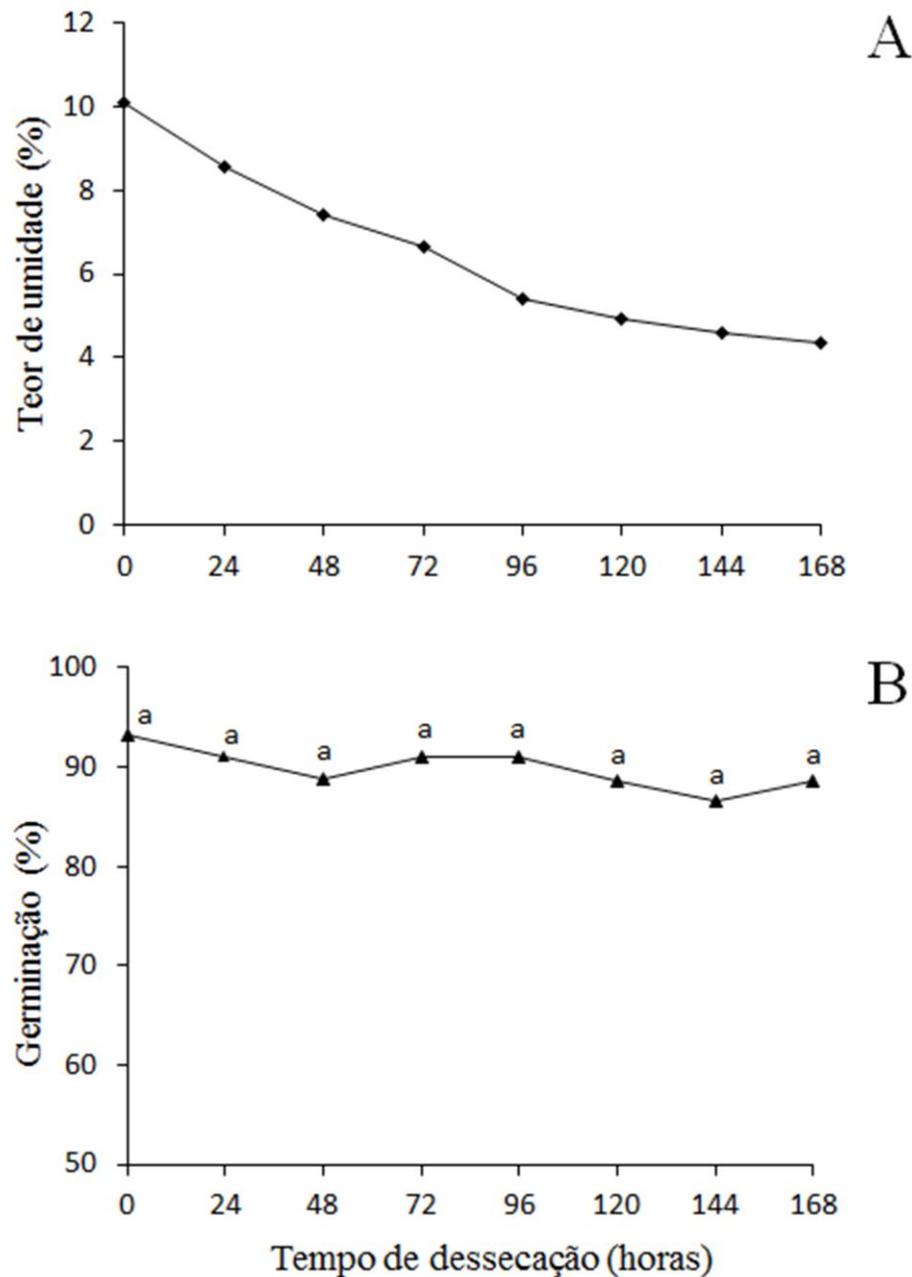


Figura 1. Teor de umidade das sementes e germinabilidade de embriões zigóticos extraídos de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*) submetidas à dessecação. A: Teor de umidade das sementes em função do período de dessecação por até 168 horas. B: Germinabilidade de embriões zigóticos extraídos de sementes dessecadas por até 168 horas. Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo segundo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.3 Teste de descongelamento das sementes

A exposição de sementes a baixas temperaturas pode induzir a cristalização lipídica de sementes de várias espécies (Walters *et al.*, 2004). O dano provocado pela cristalização dos

lipídeos é, em geral, expresso durante a embebição das sementes oleaginosas e pode ser completamente reversível se realizado o descongelamento rápido das sementes (Crane *et al.*, 2003).

As análises do efeito dos dois tipos de descongelamento testados para a germinação dos embriões zigóticos não apresentaram diferenças significativas. No entanto, observou-se valores superiores quando as sementes foram submetidas ao descongelamento rápido (80% de germinação) em comparação ao descongelamento lento (53% de germinação) (Figura 2). Em *Cuphea* sp, o descongelamento rápido foi necessário após o resfriamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ e antes da embebição para fundir os lipídios e permitir que as sementes germinassem normalmente (Crane *et al.*, 2003)

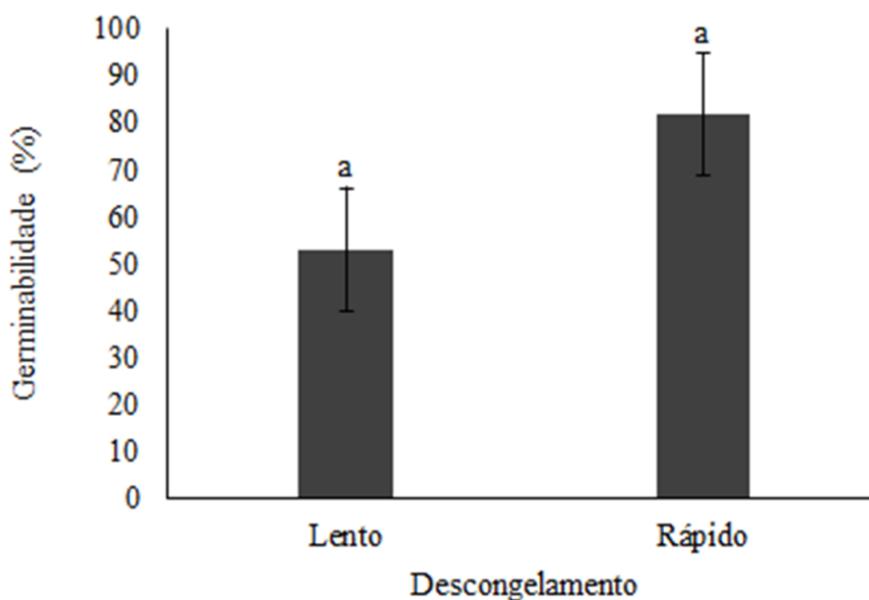


Figura 2. Germinabilidade de embriões zigóticos extraídos de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*) submetidas a dois métodos de descongelamento, lento e rápido, após armazenamento por 90 dias em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo grupo segundo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.4 Armazenamento das sementes a médio-longo prazo

Após determinar o tempo de dessecação necessário para obtenção do teor de umidade e o método de descongelamento, após armazenamento em temperatura subzero, as sementes foram conservadas em quatro temperaturas, 25, 6, -10 e -196 °C, por períodos de 0 (tratamento controle), 90, 180 e 360 dias de armazenamento.

Em todas as temperaturas de armazenamento observou-se a diminuição significativa da porcentagem de germinação ao longo dos períodos de conservação e, entre as temperaturas, não foi verificada diferenças ao longo dos períodos de armazenamento (Figura 3).

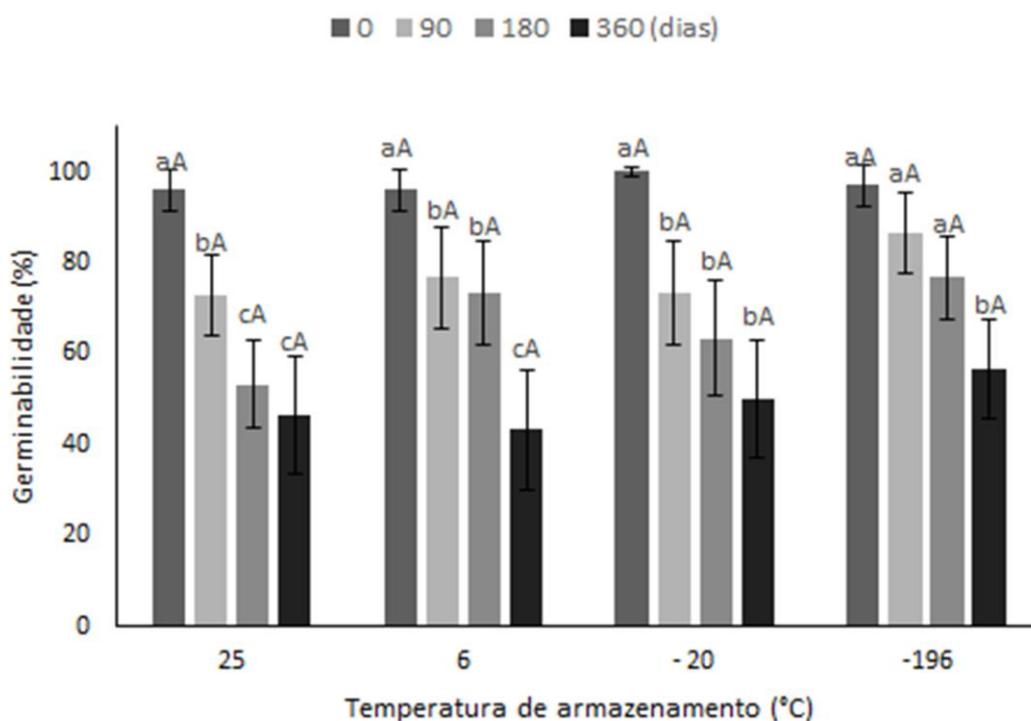


Figura 3. Influência do tempo de armazenamento (0, 90, 180 e 360 dias) e diferentes temperaturas (25, 6, -20 e -196 °C) na porcentagem de germinação de sementes de macaúba (*Acrocomia aculeata*). Letras minúsculas iguais entre os períodos de armazenamento, dentro de cada temperatura e maiúsculas iguais entre as temperaturas, dentro de cada período de armazenamento, pertencem a um mesmo grupo e não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As sementes mantidas na temperatura de 25 °C apresentaram diminuição significativa da germinabilidade já aos 90 dias de armazenamento e, posteriormente, aos 180 dias de conservação, com redução de 96% (tratamento controle) para 73 e 53%, respectivamente. Sendo que a partir de então não foram mais observadas diferenças significativas nos resultados referentes à germinação. Segundo pesquisas realizadas por Joker e Jepsen (2003), as sementes de algumas espécies de oleaginosas podem permanecer viáveis por determinados períodos em temperatura ambiente, porém, não por períodos prolongados devido ao elevado conteúdo de óleo, uma vez que, geralmente, sementes oleaginosas são mais suscetíveis ao ataque de patógenos. Adicionalmente, a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo constituem um dos principais fatores para a deterioração das sementes oleaginosas armazenadas em temperatura ambiente, o que diminui a viabilidade em várias espécies (José *et al.*, 2010).

Quando as sementes foram armazenadas a 6 °C observou-se redução significativa da germinabilidade (76%) aos 90 dias de armazenamento em comparação com o tratamento controle (96%). Aos 180 dias a germinação das sementes atingiu 73% não apresentando diferenças estatísticas em relação ao período anterior de armazenamento. Entretanto, aos 360 dias, verificou-se nova diminuição significativa da germinabilidade dos embriões apresentando valores médios de 43%. A tolerância de sementes a baixos teores de umidade e a perda da viabilidade, após longos períodos de armazenamento, também foi observada em sementes de *Arachis* por Gagliardi *et al.* (2000). Segundo os autores, as sementes toleram às mesmas condições de armazenamento que as verdadeiramente ortodoxas, mas, por curtos períodos de tempo, possivelmente devido à presença de altos teores de lipídios nas sementes, sendo assim classificadas como subortodoxas.

Sementes conservadas em -20 °C apresentaram comportamento de armazenamento semelhante ao observado às temperaturas de 25 e 6 °C nos primeiros 90 dias de armazenamento com redução significativa da capacidade de germinação para 73%. Após esse período, notou-se a diminuição gradual da germinabilidade ao longo dos períodos de armazenamento, com percentagem média de 63 e 50% nos períodos de 180 e 360 dias, na devida ordem. Contudo, ressalta-se que mesmo não ocorrendo diferenças na germinabilidade nos períodos superiores a 90 dias de armazenamento, verificou-se redução de 50% da percentagem média de germinação ao final do experimento, em comparação com o tratamento testemunha.

A diminuição da viabilidade das sementes de macaúba armazenadas a -20 °C por 360 dias são expressivas se comparadas às sementes de outras oleaginosas conservadas em temperaturas subzero, como as sementes de girassol (4-8% de umidade) que apresentaram

perda de 50% da viabilidade após 50 anos de armazenamento a temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Walters *et al.*, 2005).

As sementes armazenadas na temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (criopreservação) não exibiram diminuição significativa da germinabilidade até 180 dias de armazenamento (76%) quando comparadas ao tratamento controle (97%), indicando, que a criopreservação poderia ser a melhor estratégia para a conservação de sementes de macaúba. No entanto, após 360 dias, as sementes apresentaram diminuição significativa da viabilidade germinativa para 56%. Em teoria, na criopreservação os processos metabólicos diminuem drasticamente e as amostras podem sobreviver indefinidamente. No entanto, na temperatura ultra-baixa, as moléculas podem permanecer fracamente móveis, o suficiente para permitir que as reações de envelhecimento possam ocorrer lentamente. Além disso, o tempo de vida útil prologando pelo armazenamento em baixas temperaturas depende das propriedades intrínsecas de cada semente (Walters *et al.*, 2004).

Os resultados apresentados nesse trabalho diferem dos relatados por Ribeiro *et al.* (2012) em estudos com macaúba. Esses autores relataram que as sementes de macaúba não apresentaram perdas significativas da viabilidade após 90 dias de conservação em diferentes temperaturas. No presente estudo, exceto a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, em todas as demais temperaturas de armazenamento testadas ocorreu diminuição significativa da germinabilidade já a partir de 90 dias de armazenamento, com perdas superiores a pelo menos 20% da viabilidade das sementes.

As diferenças observadas entre os trabalhos podem estar relacionadas a diversos fatores como época de coleta dos frutos, tratamento pós-colheita, genótipo e aos critérios utilizados para avaliação adotado em cada estudo. Ribeiro *et al.* (2012) consideraram o intumescimento dos embriões como critério germinativo, enquanto na presente pesquisa a germinação foi constatada somente após a emissão da radícula seguida da bainha foliar, em razão de estudos preliminares terem mostrado que nem todos os embriões zigóticos que apenas intumescem *in vitro* são capazes de regenerar uma planta completa. Esse resultado evidencia que a emergência da plântula é o método mais seguro para avaliar a eficácia de métodos de conservação de sementes de macaúba.

Os resultados de germinabilidade obtidos neste trabalho, após a dessecação e o armazenamento das sementes de macaúba, não satisfazem plenamente a definição de semente ortodoxa, intermediária ou recalcitrante. As sementes não atendem à condição de recalcitrante por sobreviverem à dessecação até teores baixos de umidade (4,3%) e apresentarem altos

índices de germinabilidade (91%) e ortodoxas, pois a viabilidade das sementes com 5% de umidade se reduz significativamente após o armazenamento em temperaturas subzero.

Dessa forma, nas condições experimentais realizadas, os resultados indicam que a definição de sementes subortodoxas parece ser a mais adequada para classificar as sementes de macaúba, pois, essas sementes podem ser armazenadas sob as mesmas condições que as sementes classificadas como verdadeiras ortodoxas, porém, por períodos inferiores (Bonner, 1991, 2008).

4. CONCLUSÕES

- Sementes de macaúba são tolerantes à dessecação e mantêm sua viabilidade mesmo com teores umidade reduzido abaixo de valores críticos;
- Sementes de macaúba apresentam redução da viabilidade ao longo dos períodos de armazenamento, mesmo sob temperatura subzero e criogênica;
- As sementes de macaúba possuem comportamento fisiológico subortodoxo, pois toleram dessecação e curtos períodos de armazenamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU AG, PRIOLLI RHG, AZEVEDO-FILHO JÁ, NUCCI SM, ZUCCHI MI, COELHO RM, COLOMBO CA. (2012) The genetic structure and mating system of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 35(1): 119-121.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (2009) *Regras para análise de sementes/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 399 p.
- BICALHO EM. (2011) *Germinação e mobilização de reservas de macaúba (Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Martius)*. Dissertação de mestrado, Viçosa.
- BONNER F. (1990). Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. *Forest Ecology and Management*, 35:35-43.
- BONNER FT. (2008) Storage of seeds. 85-95p. In: *The woody plant seed manual*. Bonner FT, Karrfalt RP (eds.). USDA Forest Service, Agriculture Handbook. 727p.
- CRANE J, MILLER A, VAN ROEKEL JW, WALTERS C. (2003) Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. *Planta*, 217:699-708.
- EEUWENS CJ. (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissues explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera* L.) and date palm (*Phoenix dactylifera*) palms cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 36(1): 23-28.
- FERREIRA DF. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6):1039-1042
- GAGLIARDI RF, PACHECO GP, COCULILO SP, VALLS JFM, MANSU E. (2000) *In vitro* plant regeneration from seed explants of wild groundnut species (Genus *Arachis*, Section *Extranervosae*). *Biodiversity and Conservation* 9: 943–951.
- JAIN SM (2011) Prospects of *in vitro* conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. *Emirate Journal Food Agriculture*, 23(2):110-119.
- JOKER D, JEPSEN J. (2003) *Jatropha curcas* L. seed leaflet. *Humbleback*, 83(2):1-2.
- JOSÉ SCBR, SALOMÃO AN, COSTA TSA, DA-SILVA JTTT, CURI CCS. (2010) Armazenamento de sementes de girassol em temperaturas subzero: aspectos fisiológicos e bioquímicos. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(4): 029-038.
- LORENZI GMAC; NEGRELLE RRB. (2006) *Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd.ex mart.: aspectos ecológicos, usos e potencialidades. *Sistema Eletrônico de Revistas* 7(1).
- LININGTON SH, PRITCHARD HW (2001) *Gene banks*. 165-181p In: Levin SA (ed.) *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press, New York, vol. 3.

- MURASHIGE T, SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- RAJANAIDU N, AINUL MM. (2013) *Advanced biotechnology and breeding centre, malaysian palm oil board* In: Normah MN, Chin HF, Reed BM. (Eds.) Conservation of Tropical Plant Species. Springer, New York.
- RIBEIRO LM, OLIVEIRA TGS, CARVALHO VS, SILVA PO, NEVES SC, GARCIA QS. (2012) The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. *Seed Scienc & Technology*, 40:344-353.
- ROBERTS EH, KING, MW, ELLIS RH. (1984). *Recalcitrant seeds: their recognition and storage*. In: Holden *et al.* (Eds.) Crop genetic resources: conservation and evaluation, London, 38-52p.
- SCARIOT, A. Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. *Principes* 42: 5-8, 1998.
- WALTERS C, WHEELER L, STANWOOD PC. (2004) Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*, 48:229-244.
- WALTERS C, WHEELER LM, GROTENHULS JM. (2005) Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 15(1): 1-20.

CAPÍTULO V

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

RESUMO

A criopreservação de embriões zigóticos apresenta como uma das vantagens, o fato do embrião se desenvolver diretamente em plântula, um fator importante quando se pretende conservar recursos genéticos vegetais. Neste trabalho, um eficiente e simplificado protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de macaúba, uma espécie de palmeira com potencial para a produção de biodiesel, foi desenvolvido. Embriões foram extraídos de sementes e reidratados por 15 horas em meio contendo 3% de sacarose. Em seguida, os embriões zigóticos foram submetidos a tratamentos de dessecação em câmara de fluxo laminar por períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 horas. Em cada período, parte dos embriões foi inoculada em meio de germinação e parte foi colocada em criotubos estéreis e imersos diretamente em nitrogênio líquido por até 360 dias. No descongelamento, os criotubos foram mergulhados em banho-maria a 40 °C por 90 segundos (descongelamento rápido). Ao avaliar a influência da dessecação na germinabilidade, observou-se que há diminuição da germinabilidade com o aumento do tempo de dessecação, com médias de 97 e 75% para 0 h e 8 horas de dessecação, respectivamente. Para os embriões zigóticos criopreservados, a maior percentagem de germinação (81%) foi obtida após 6 horas de dessecação, quando os embriões apresentavam 11% de umidade. Embriões criopreservados com 11% de teor de umidade por até 360 dias apresentaram 75% sobrevivência.

Palavras-chave: criopreservação, embrião zigótico, desidratação, tempo de conservação

CRYOPRESERVATION OF ZYGOTIC EMBRYOS OF MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]

ABSTRACT

Cryopreservation of zygotic embryos has as an advantage, the fact that the embryo develops directly on the plantlet, an important factor when conservation of plant genetic resources is desired. In this work, an efficient and simplified protocol for cryopreservation of zygotic embryos of macaúba, a kind of palm tree with potential for biodiesel production, was developed. Embryos were extracted from seeds and rehydrated for 15 hrs on medium containing 3% sucrose. The zygotic embryos were then subjected to desiccation treatments in a laminar flow cabinet for 0, 2, 4, 6 and 8 hours. For each period, a portion of the embryos was inoculated onto germination medium and a portion was placed in sterile vials and immersed directly into liquid nitrogen for up to 360 days. For thawing, the vials were immersed in a water bath at 40 °C for 90 seconds (quick thawing). When evaluating the influence of drying on germination, it was observed that the germination ability decreases with increasing drying time, with averages of 97 and 75% for 0 and 8 hours of drying, respectively. For cryopreserved zygotic embryos, the highest germination percentage (81%) was obtained after 6 hours of drying, when the embryos had 11% moisture. Embryos, cryopreserved with 11% moisture content for up to 360 days, showed 75% survival.

Keywords: cryopreservation, zygotic embryo, dehydration, storage time.

1. INTRODUÇÃO

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira considerada pioneira e sua ocorrência está associada a ambientes abertos antropizados e solos eutróficos, geralmente utilizados como pastagens (Motta *et al.* 2002). É uma espécie alógama e sua propagação ocorre exclusivamente por sementes. Contudo, suas sementes apresentam dormência (Ribeiro 2011), com percentagem de germinação baixa, lenta e irregular e, em condições naturais, as sementes podem levar de um a dois anos para germinar (Lorenzi 2006).

Os frutos são comestíveis, apresentando mesocarpo fibroso e sabor adocicado (Silva 1994; Henderson *et al.* 1995). Os frutos apresentam altos teores de óleo, tanto no mesocarpo (16%) quanto na semente (51,7%), o que a torna uma espécie com potencial para produção de biodiesel. O óleo da polpa também pode ser empregado na fabricação de sabões e o da semente na indústria de cosméticos (Hiane 2005). Além da utilização de óleo dos frutos, destaca-se também o aproveitamento da polpa para fabricação caseira de licores, doces e tortas para ração animal, e do endocarpo pode ser obtido um carvão de excelentes propriedades (Silva 1986; Silva e Andrade 2013).

Apesar do potencial desta palmeira, o aproveitamento atual apresenta características basicamente extrativistas, o que pode levar a erosão genética (Scariot, 1998). Diante do exposto, a conservação desta espécie torna-se fundamental, tanto para o desenvolvimento de futuros programas de melhoramento, quanto para garantir que a diversidade genética dessa espécie seja mantida. Atualmente, plantas de macaúba têm sido conservadas *ex situ* (Conceição, 2010). Porém, a manutenção de um banco no campo é propensa a risco, devido à exposição a doenças e fatores climáticos (Withers; Engels, 1990).

A conservação de sementes é a técnica convencional de conservar de recursos genéticos em longo prazo (Hamilton *et al.*, 2013). No entanto, como citado anteriormente, as sementes de macaúba possuem alto teor de óleos, o que pode diminuir a eficiência deste método. O armazenamento de sementes oleaginosas é dificultada em função de mecanismos associados ao processo de deterioração, como a peroxidação lipídica (Sattler *et al.*, 2004). Segundo Hamilton *et al.*, (2009), a criopreservação é a técnica mais segura para evitar a deterioração de sementes oleaginosas durante o armazenamento a longo prazo.

Dessa forma, a criopreservação de embriões zigóticos apresenta-se como a opção viável para a conservação desta espécie. O uso de embriões zigóticos na criopreservação é, por vezes, uma técnica necessária para facilitar a determinação de umidade, quebrar a

dormência imposta pelas estruturas de cobertura da semente e um método rápido para avaliar a viabilidade (Wen e Wang, 2010).

Uma das condições mais importantes para se alcançar sucesso na criopreservação é a determinação do teor de umidade ideal, para evitar danos provocados pela formação de cristais de gelo durante o congelamento e descongelamento, e manter a viabilidade do explante utilizado (Gonzalez-Arno et al., 2007). Vários trabalhos descrevem protocolos complexos para criopreservação de embriões zigóticos aliando métodos químicos e físicos de dessecação e o uso de crioprotetores (Sajini *et al.*, 2006; Sershen e Pammenter 2010; Sisunandar *et al.*, 2010). Entretanto, as soluções crioprotetoras podem ser tóxicas e causar danos às células (Fabián *et al.*, 2008). Outra técnica utilizada é a de dessecação dos explantes por métodos físicos. Essa técnica consiste em desidratar os explantes por exposição ao ar contínuo da câmara de fluxo ou em sílica gel, seguido de imersão rápida em nitrogênio líquido (Engelmann, 2004).

Até o momento, a criopreservação de várias espécies de palmeiras já foi descrita utilizando-se diferentes metodologias (Wen e Wang, 2010; N'Nan *et al.*, 2012; Heringer *et al.*, 2013; Hemanthakumar *et al.* 2013). No entanto, até o momento, nenhum relato é citado na literatura acerca da criopreservação de macaúba a partir de embriões zigóticos.

No presente trabalho, um simplificado e eficiente protocolo para a criopreservação de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata*) é apresentado. Inicialmente, a tolerância de embriões zigóticos à dessecação e ao congelamento rápido em nitrogênio líquido (-196°C) é ajustada para um período mínimo de 1 hora. Posteriormente, a aplicabilidade do protocolo é demonstrada por um período de até 360 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e desinfestação do material vegetal

O material vegetal consistiu de embriões extraídos de frutos maduros, apresentando mesocarpo de coloração amarelada, coletados de populações naturais próximas a Sobradinho (Anexo 1), Distrito Federal, Brasil, entre os meses de novembro e dezembro dos anos de 2010 e 2011.

Após a coleta, os frutos foram processados manualmente para a retirada do epicarpo e armazenados para secagem por 15 dias em estufa de circulação de ar a 35 °C. Após a secagem, o endocarpo foi quebrado com o auxílio de um torno de bancada para a extração das sementes.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas por imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por um minuto, seguida da imersão por 30 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo, v/v). Posteriormente, as sementes foram enxaguadas por duas vezes em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, os embriões zigóticos foram extraídos das sementes com auxílio de bisturi, alicate e pinça de ponta fina, e inoculados em placas de *Petri* (15 x 90 mm) contendo meio de cultura agar-água, acrescido de 3% de sacarose. O meio teve o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de Agar (Sigma, St. Louis, MO) e foi esterilizado por autoclavagem à 121 °C e 1,1 atm de pressão durante 20 min.

Uma vez inoculados, os embriões foram acondicionados no escuro sob temperatura de 25 ± 2 °C por um período de 15 horas a fim de uniformizar o conteúdo de água inicial dos embriões.

O teor de umidade (TU) dos embriões foi determinado antes e depois da hidratação por 15 horas e após cada período de dessecação, por meio do teste de estufa a 105 °C por 24 horas. A percentagem de umidade dos embriões foi calculada com base no peso úmido, aplicando-se a seguinte fórmula: % de umidade (U) = $100 (P-p) / P$ onde, P = peso inicial embrião úmido; p = peso final do embrião seco.

2.2 Protocolo de Criopreservação

Após o período de hidratação, os embriões zigóticos foram submetidos ao teste de tolerância à perda de umidade durante cinco períodos: 0, 2, 4, 6 e 8 horas. Para tanto, os

embriões foram distribuídos em placas de petri estéreis (15 x 90 mm) e submetidos a tratamentos de dessecação em câmara de fluxo laminar, antes da imersão em nitrogênio líquido (NL). Após cada período, os embriões foram transferidos imediatamente para tubos de criopreservação (criotubos) estéreis, os quais foram acondicionados em tubos de alumínio (canister) e imersos em NL por um período mínimo de 1 hora.

Os tratamentos controles consistiram da inoculação dos embriões, após cada período de dessecação, em meio de germinação (MG) contendo sais de Y3 (Eeuwens, 1976), com solução de Fe-EDTA e vitaminas do meio de MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 3% de sacarose, 0,5 g.L⁻¹ de glutamina, 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado e gelificado com 2,2 g.L⁻¹ de *Phytigel* (Sigma, St. Louis, MO).

Para o descongelamento, os canisteres foram retirados do NL e os criotubos com os embriões criopreservados foram mergulhados em banho-maria a 40 °C por 90 segundos (descongelamento rápido). Em seguida, os embriões foram retirados dos criotubos e inoculados assepticamente em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de MG. Nos primeiros 30 dias, os tubos de ensaio contendo os embriões zigóticos foram mantidos à 25±2 °C no escuro. Após esse período, os tubos de ensaio foram transferidos para condições de luminosidade de 38 μm.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

2.3 Criopreservação a médio-longo prazo

Após a determinação do protocolo de criopreservação de embriões zigóticos por 1 hora, um segundo experimento foi realizado para avaliar a viabilidade do protocolo ajustado anteriormente sobre a criopreservação de embriões zigóticos a médio-longo prazo.

Para tanto, os procedimentos para a extração e desinfestação de sementes, extração e hidratação de embriões zigóticos foram os mesmos descritos anteriormente (cf.§ 1.1). Os embriões hidratados foram dessecados em câmara de fluxo laminar por 6 horas e, em seguida, colocados em criotubos e armazenados em NL por períodos de 0, 0,04, 2, 30, 90, 180 e 360 dias. Passados os períodos de armazenamento, os criotubos contendo os embriões foram descongelados (descongelamento rápido), e os embriões inoculados em condições assépticas em MG. As condições para germinação dos embriões e crescimento das plantas foram as mesmas descritas anteriormente.

2.4 Caracterização da germinação

Os aspectos morfológicos da germinação *in vitro* de embriões zigóticos e desenvolvimento das plântulas de macaúba foram caracterizados semanalmente por um período de até 12 semanas após a inoculação dos embriões zigóticos em meio de germinação.

2.5 Análise histológica

Análise histológica foi realizada em embriões após início da germinação para verificar possíveis alterações em consequência da imersão em NL. Para isso, embriões foram fixados em FAA 50% (Johansen, 1940) por 24 horas, sob vácuo, desidratados em série alcoólica crescente, infiltradas e incluídas em historresina (Leica, Heidelberg, Germany). Cortes seriados longitudinais (7 e 10 μm) foram obtidos em micrótomo rotatório, corados com azul de Toluidina e montados com Entellan.

2.6 Coleta de dados e análise estatística

As avaliações do processo germinativo e do desenvolvimento das plântulas foram realizadas semanalmente por um período de 12 semanas após a inoculação dos embriões zigóticos. O critério utilizado para determinar a germinação foi a protrusão da radícula seguida da bainha foliar.

Os experimentos foram montados seguindo um delineamento inteiramente casualizado. Os dados referentes ao tempo de dessecação e períodos de criopreservação foram analisados por meio de regressão polinomial com auxílio do programa de análises estatísticas Sisvar (Ferreira 2011). As demais variáveis foram avaliadas segundo um esquema fatorial 5 x 2 (períodos de dessecação x criopreservação) totalizando 10 tratamentos. Cada tratamento foi formado por 4 repetições constituídas por 8 embriões. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados de percentagem de germinação e anormalidade foram previamente transformados segundo arco-seno $(x/100)^{1/2}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Protocolo de Criopreservação

Durante o processo de dessecação dos embriões zigóticos, o teor de umidade diminuiu acentuadamente nas duas primeiras horas, de 60% para 31% (Figura 1). Nos períodos seguintes, de 2 a 6 horas, a perda de umidade foi gradual, aproximadamente 10% de perda de umidade a cada 2 horas de dessecação. A partir de 6 horas de dessecação a perda de umidade foi mínima observando-se uma tendência a estabilização (Figura 1).

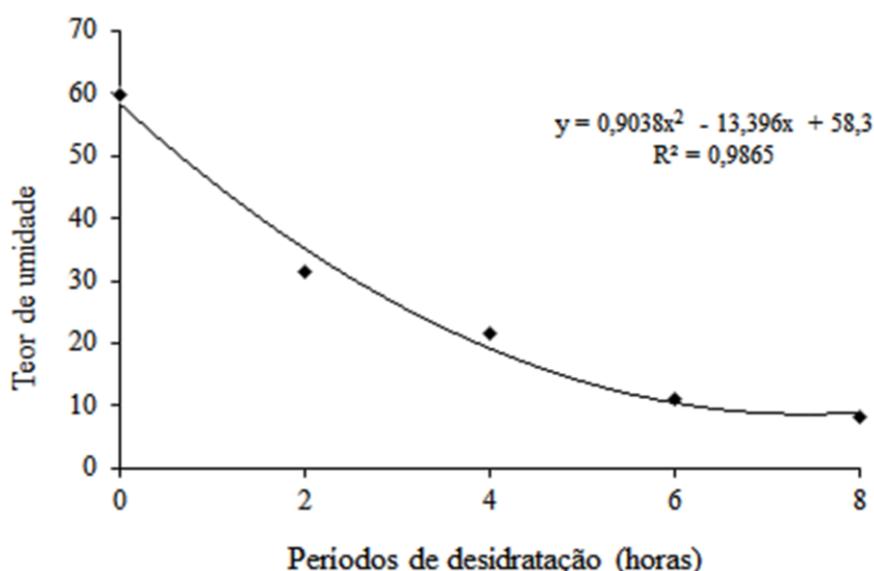


Figura 1. Teor de umidade dos embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata*) em função do período de dessecação em câmara de fluxo de ar contínuo.

Os embriões zigóticos não criopreservados contendo 60% de umidade (0 horas de dessecação) apresentaram índices de 96,8% de germinação, não diferindo dos embriões zigóticos com 8,3% de umidade (8 horas de dessecação) e percentagem de germinação de 75% (Figura 2).

Em contraste, para os embriões zigóticos criopreservados, o teor de umidade inicial de 60% foi prejudicial, com 100% de mortalidade. A dessecação por 2 horas (31,3%) proporcionou a germinação de 37,5% dos embriões zigóticos criopreservados (Figura 2). O resultado obtido nesse período de dessecação evidencia a necessidade de maior retirada de

umidade dos embriões e, que a dessecação é necessária para diminuir os danos celulares causados pelo congelamento e permitir a sobrevivência dos embriões.

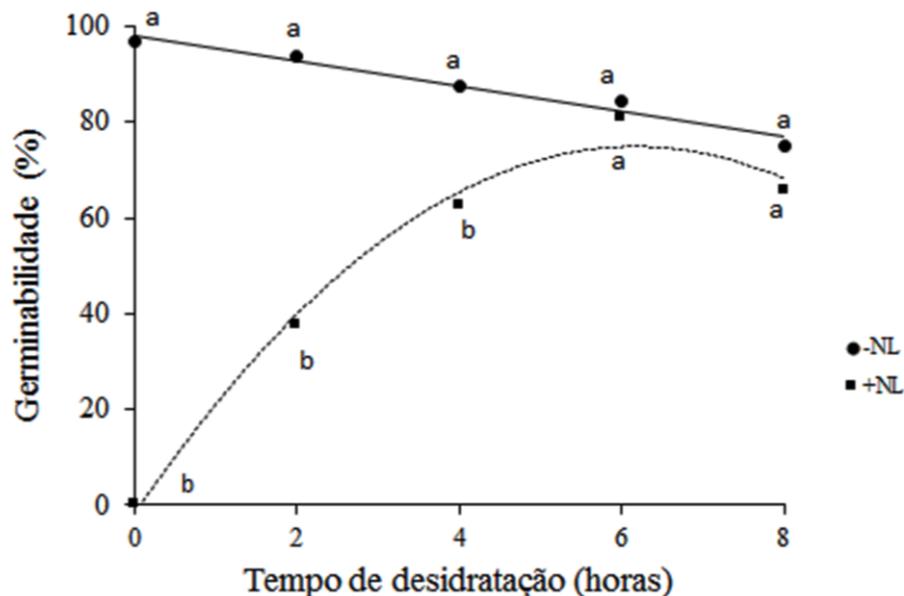


Figura 2. Percentagem de germinação de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata*) em função do tempo de dessecação e da criopreservação. As letras iguais não diferem estatisticamente entre o fator criopreservação (+NL) e não criopreservação (-NL) em cada período de dessecação pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Regressão: $y(-NL) = -2,656x + 98,122$ ($R^2 = 0,9634$, $p=0,2578$); $y(+NL) = -2,0054x^2 + 24,778x - 1,6629$ ($R^2 = 0,9846$, $p = 0,0001$).

A maior percentagem de germinação de embriões zigóticos criopreservados (81%) foi obtida após 6 horas de dessecação, quando os embriões apresentaram 11% de teor de umidade, e após esse período observou-se diminuição da germinabilidade (Figura 2). O percentual de conversão de embriões zigóticos criopreservados em plantas, obtido no presente trabalho foi superior aos encontrados para outras palmeiras como *Bactris gasipaes* Kunth (Steinmacher *et al.*, 2007), *Elaeis guineenses* L. (Engelmann *et al.*, 1995) e *Cocos nucifera* L. (N'Nan *et al.*, 2012), onde as taxas de regeneração, após os tratamentos de criopreservação, foram de 12, 65 e 74,7%, respectivamente.

No período de 8 horas de dessecação (8,32% de umidade), não foram observadas diferenças significativas na germinabilidade entre os embriões zigóticos criopreservados (65,6%) e não criopreservados (75%) (Figura 2). Esses resultados demonstram que os danos que causaram a redução da germinabilidade dos embriões criopreservados, possivelmente não

estejam relacionados com os efeitos do crio congelamento, mas com o excesso de dessecação. A dessecação é considerada uma etapa crítica para a manutenção da viabilidade e integridade celular, de forma que as células adquiram tolerância ao congelamento e não formem cristais de gelo (Engelmann, 2004). Adicionalmente, para cada material conservado existem limites de dessecação que devem ser respeitados para evitar danos celulares (Buitink *et al.* 2000).

Apesar do período de dessecação por 8 horas (8,3 % de TU) ter proporcionado a redução na taxa de sobrevivência (65%), os resultados foram superiores aos melhores obtidos por Sisunandar *et al.* (2010) na criopreservação de embriões zigóticos de *Cocos nucifera* L., com a regeneração de 20% de plantas após 8 horas de dessecação.

De acordo com a avaliação do desenvolvimento das plantas regeneradas, observou-se que a dessecação por até 8 horas não afetou o desenvolvimento das raízes (Figura 3) e da parte aérea (Figura 4) de plantas obtidas de embriões zigóticos não criopreservados. Entretanto, em relação àquelas regeneradas de embriões zigóticos criopreservados verificaram-se diferenças significativas no desenvolvimento de raízes e da parte aérea.

As plantas regeneradas de embriões criopreservados apresentaram os melhores resultados de desenvolvimento de raiz e parte aérea quando os embriões foram dessecados por 4 e 6 horas, com médias de 2,0 e 2,6 cm e 1,8 e 2,5 cm, respectivamente. Nesses períodos de dessecação, não foram observadas diferenças significativas no crescimento da raiz e parte aérea entre as plantas oriundas dos embriões criopreservados e não criopreservados (Figura 3 e 4).

As avaliações do desenvolvimento das plantas regeneradas de material criopreservado são importantes, pois, segundo resultados obtidos por Engelmann *et al.* (1995) na criopreservação de embriões zigóticos de *Elaeis guineensis*, embora a sobrevivência dos embriões zigóticos tenha sido elevada, a percentagem de embriões que desenvolveram plantas foi menor. Segundo Maxwell e Johnson (2000), danos permanentes podem ocorrer em consequência do estresse sofrido pelas células e tecidos do material vegetal imerso em NL reduzindo o vigor das plantas.

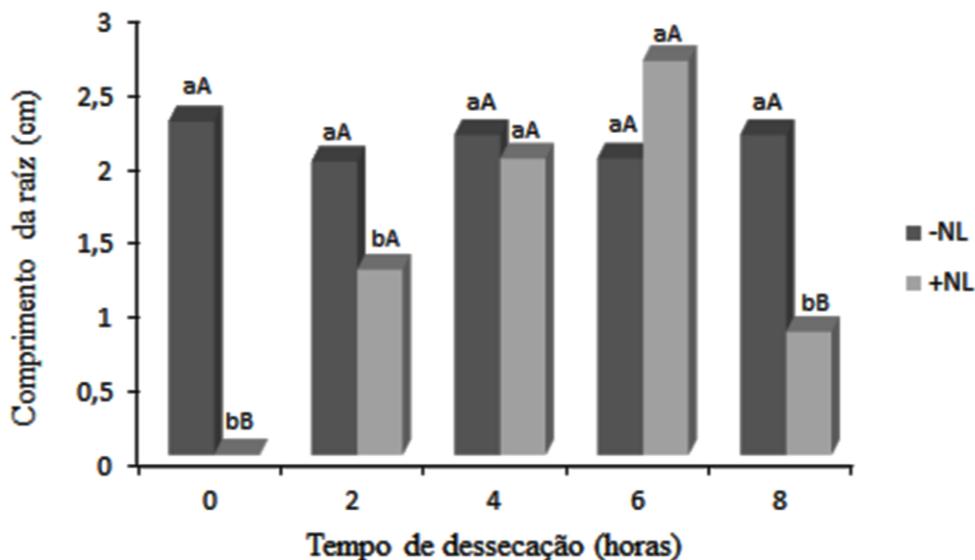


Figura 3. Efeito do tempo de dessecação (-NL) e da criopreservação (+NL) no comprimento da raiz principal de plantas de macaúba (*A. aculeata*). *Letras minúsculas iguais entre os tratamentos +NL e -NL, dentro de cada tempo de dessecação e maiúsculas iguais entre os tempos de dessecação, dentro de cada tratamento (+NL ou -NL) pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

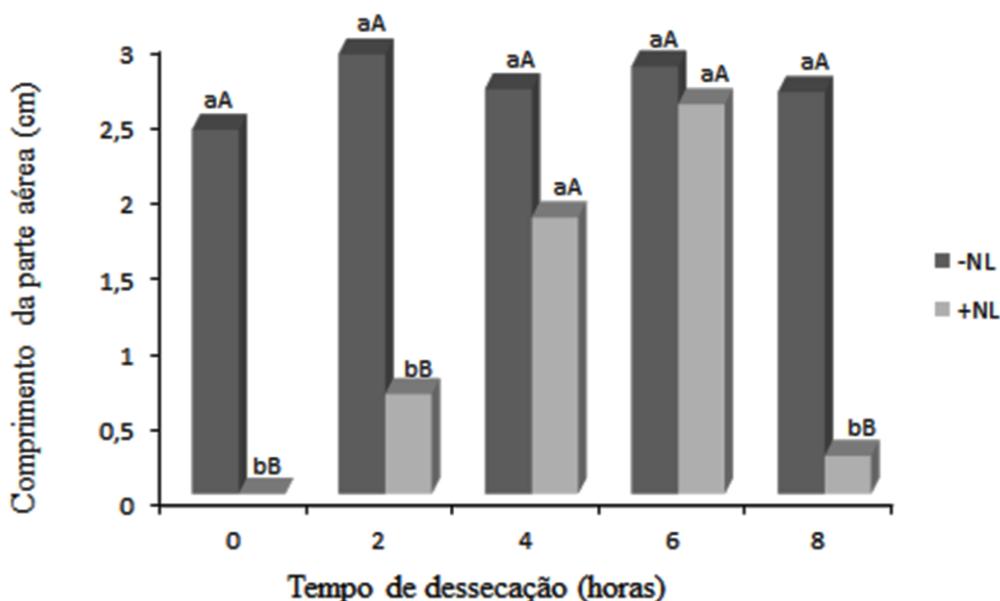


Figura 4. Efeito do tempo de dessecação (-NL) e da criopreservação (+NL) no comprimento da parte aérea plantas de macaúba (*A. aculeata*). *Letras minúsculas iguais entre os tratamentos +NL e -NL, dentro de cada tempo de dessecação e maiúsculas iguais entre os tempos de dessecação, dentro de cada tratamento (+NL ou -NL) pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2 Criopreservação à médio-longo prazo

Verificou-se que a criopreservação por até 360 dias não afetou significativamente a germinabilidade dos embriões zigóticos, com média de 93,7% para o tratamento controle (0 horas) e 75% de germinação de embriões armazenados por 360 dias (Figura 5). Esses resultados confirmam a longevidade obtida com essa técnica de conservação, sem alteração na sobrevivência do material criopreservado a médio-longo prazo (Engelmann, 2013).

Em função do tempo de conservação e dos resultados obtidos no experimento anterior, a anormalidade dos embriões zigóticos armazenados por até 360 dias foi verificada após cada período de conservação. A percentagem de anormalidade dos embriões progrediu com o aumento do tempo de armazenamento, porém, não foram observadas diferenças significativas entre os períodos de armazenamento e o tratamento controle (Figura 5). Ressalta-se que, os embriões que apresentaram anormalidade dificilmente germinaram, e quando isso ocorreu, a plântula apresentou anormalidade nos órgãos radiculares e foliares, não sobrevivendo por mais de 120 dias de cultivo.

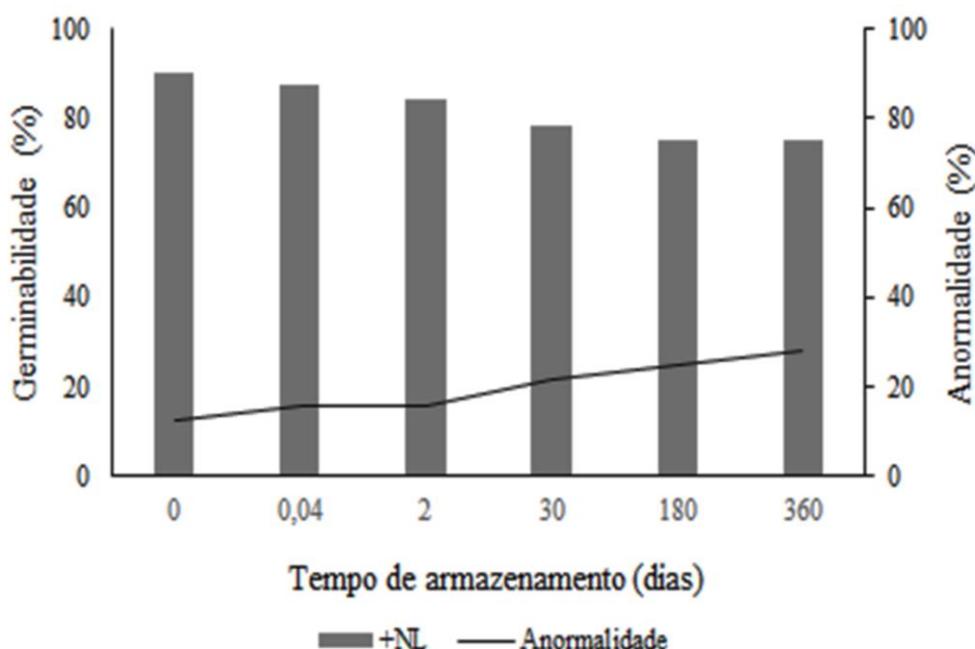


Figura 5. Germinabilidade e anormalidade de embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata*) em função do tempo criopreservação. Os dados foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. (Barras e linha: $p \geq 0,05$).

3.3 Caracterização da germinação

A Figura 6 apresenta as fases da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de macaúba criopreservados.

Os embriões zigóticos de macaúba apresentaram formato claviforme, com a região proximal mais estreita que a distal (cotilédone); medindo aproximadamente 6 mm de comprimento e 1 mm de largura (Figura 6A). Após o terceiro dia de cultivo foi observado o intumescimento dos embriões zigóticos. O intumescimento dos embriões zigóticos é caracterizado pelo alongamento do cotilédone (haustório), que após atingir aproximadamente 1 cm de comprimento apresenta uma curvatura característica (Figura 6B). O cotilédone da macaúba, assim como nas demais palmeiras, é também denominado haustório, pois, com o início da germinação ele assume a função de absorver e conduzir substâncias de reserva a partir do endosperma para a plântula (Neto *et al.* 2010).

Por volta do 15º dia, observou-se a expansão perpendicular da região proximal, onde se localiza o eixo embrionário, em relação ao haustório. Com a expansão da região proximal, o alongamento do haustório é interrompido, iniciando-se a germinação, caracterizada nesse estudo pela protrusão da radícula (Figura 6C), seguida da bainha foliar (Figura 6D). Ressalta-se que, o parâmetro utilizado nesse estudo para caracterizar a germinação foi escolhido diante de resultados obtidos em ensaios preliminares, onde se constatou que, mesmo após a protrusão da radícula alguns embriões não desenvolviam a parte aérea.

Com o desenvolvimento da segunda bainha foliar observa-se o início da atrofia do haustório (Figura 6E). O alongamento do haustório observado em palmeiras auxilia na manutenção do embrião em contato com o endosperma para condução de nutrientes na germinação de sementes, porém, *in vitro*, o haustório deixa de ser condutor de nutrientes resultando na atrofia progressiva (Magalhães *et al.* 2012). Além disso, verificou-se nesse estudo que, mesmo em condições ideais, algumas plântulas desenvolvidas apresentaram início de senescência após a atrofia completa do haustório, sugerindo que os embriões e as plântulas podem se utilizar de reservas do haustório causando a sua degeneração.

Aproximadamente aos 35 dias notou-se a emissão do eofilo (Figura 6F), seguido do desenvolvimento da plântula (Figura 6G) com folhas e raízes secundárias. O tempo de germinação foi desuniforme em todos os tratamentos, a qual foi observada do 10º ao 30º dia. Gentil & Ferreira (2005) também encontraram variação na germinação de *Astrocaryum aculeatum* Meyer, e segundo esses autores, parte dessa variação esteja, provavelmente, relacionada à origem do lote de sementes, formado a partir da mistura de progênes.

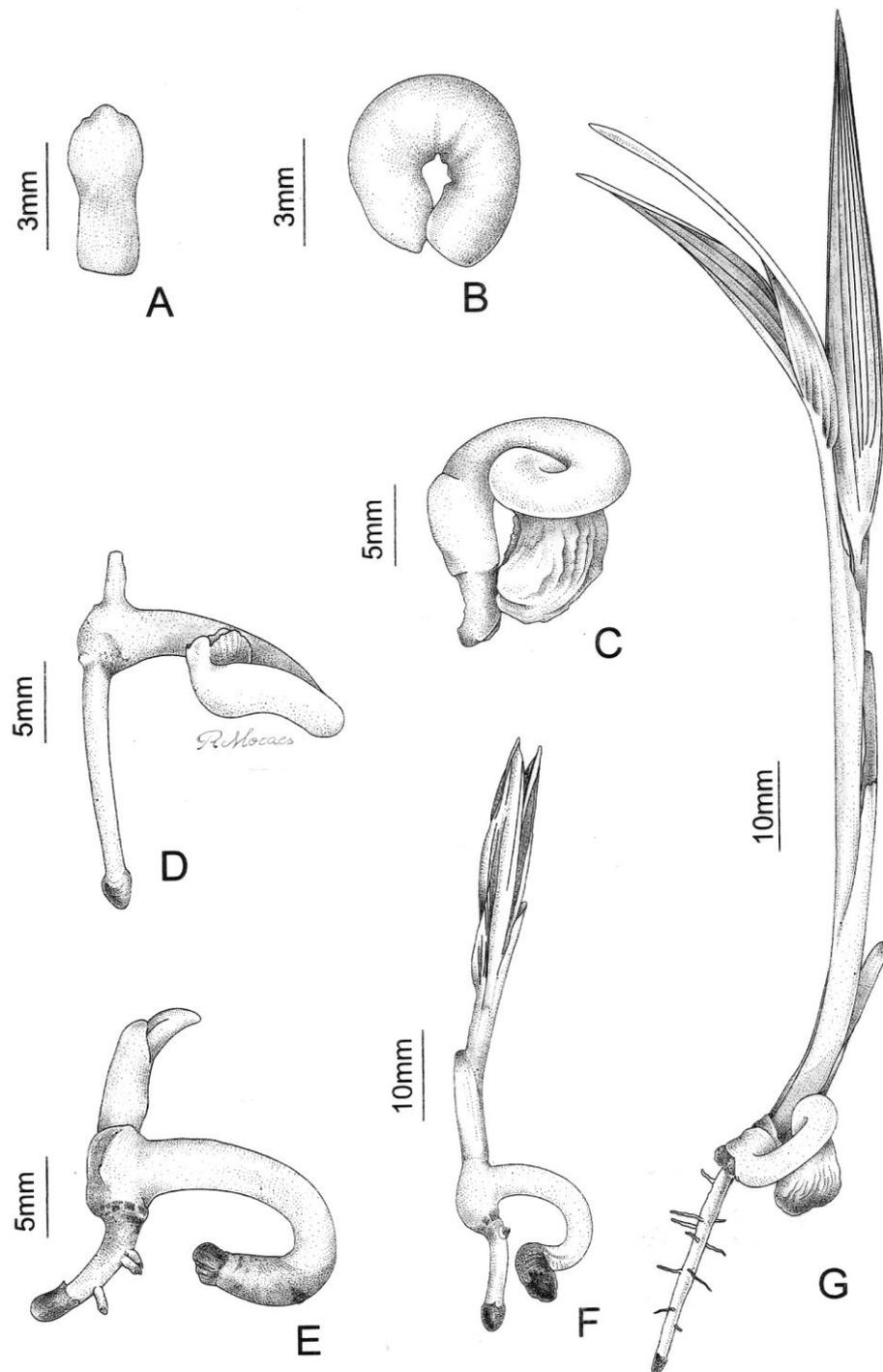


Figura 6. Aspectos do embrião e da germinação *in vitro* de macaúba (*Acrocomia aculeata*). A: Embrião zigótico apresentando região proximal e distal. B: Alongamento e curvatura do cotilédone após sete dias de cultivo. C: expansão do eixo embrionário, protrusão da radícula e início da ruptura da fenda cotiledonar após o 15º dia de cultivo. D: Emissão da primeira bainha e início de atrofia do cotilédone. E: Emissão da segunda bainha foliar e radícula visível, apresentando raiz lateral e a coifa (c). F: Plântula com primeiro eofilo, aos 35 dias de cultivo. G: Plântula desenvolvida com expansão do segundo eofilo aos 50 dias de cultivo. Abreviações: (rp) região proximal; (rd) região distal; (r) radícula; (fc) fenda cotiledonar; (b1) primeira bainha foliar; (b2) segunda bainha foliar; (c) cotilédone; (ac) atrofia do cotilédone; (e1) primeiro eofilo; (e2) segundo eofilo; (rl) raiz lateral.

3.4 Análise histológica

A análise histológica evidenciou que no início da germinação, o embrião apresenta desenvolvimento da radícula, início da emissão da bainha foliar e cotilédone (haustório) (Figura 7A-D). A parte aérea é constituída pela plúmula (Figura 7C) e pela primeira e segunda bainhas foliares que se expandem e rompem a fenda cotiledonar (Figura 7A).

O eixo embrionário está conectado ao cotilédone pelos feixes vasculares (Figura 7B). A radícula é cilíndrica e na base pode-se visualizar o início da raiz secundária. Idioblastos contendo ráfides foram encontrados nas bainhas foliares e radícula das plântulas de embriões criopreservados (Figura 7D). Esses resultados corroboram os obtidos por Ribeiro *et al.* (2011), onde esses autores verificaram que embrião zigótico da macaúba não apresenta ráfides e os cristais são depositados somente após o início da germinação.

Além da germinação e desenvolvimento das plantas, observou-se que após o período inicial de intumescimento dos embriões, alguns embriões apresentaram desenvolvimento anormal do cotilédone, com a formação de estruturas semelhante a calos. A análise histológica dos embriões zigóticos com desenvolvimento anormal mostrou a desorganização dos tecidos (Figura 7E, F). Nesses embriões, não foi possível distinguir as regiões do eixo embrionário e cotilédone, sendo visíveis apenas a protoderme e feixes vasculares. A anormalidade observada não pareceu estar relacionado com o processo de criopreservação, visto que, também foi verificado nos embriões não criopreservados. O desenvolvimento anormal pode ser consequência de danos ou injúria física sofrida pelo embrião durante a extração da semente ou isolamento do embrião. A maior parte dos embriões que apresentou anormalidade no cotilédone teve o seu desenvolvimento comprometido, não completando a germinação.

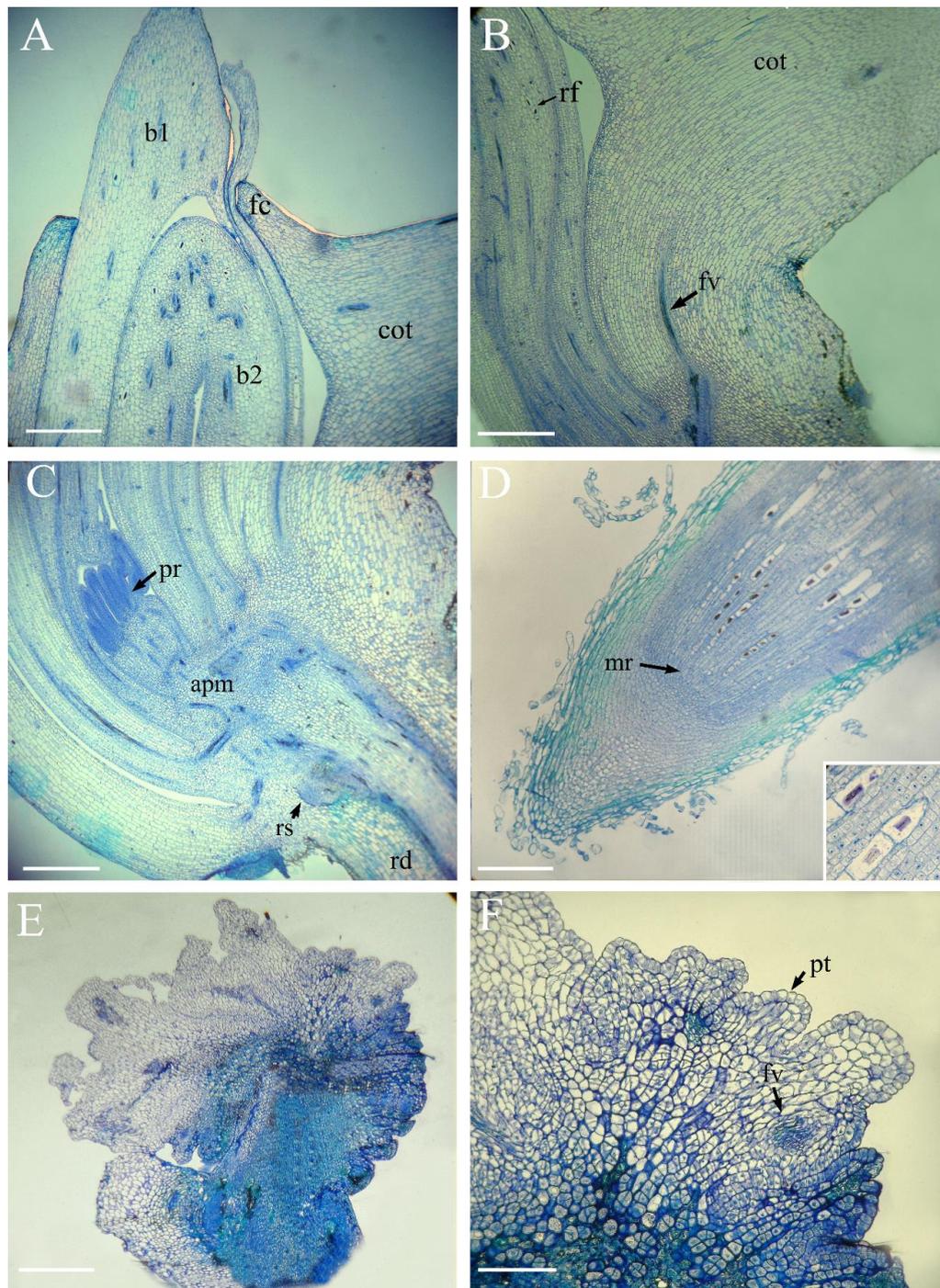


Figura 7. Análise anatômica dos embriões zigóticos de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jack.) Lodd. ex Mart.) submetidos à dessecação e à criopreservação. A: Secção evidenciando a emissão da primeira e segunda bainhas foliares. B: Secção evidenciando a conexão do eixo embrionário com o cotilédone. C: Corte evidenciando o ápice meristemático caulinar, primórdios foliares e base da radícula com início de desenvolvimento de raiz secundária. D: Ápice da radícula com meristema apical da raiz e idioblastos contendo ráfides (detalhe). E: Secção da germinação anormal do embrião zigótico contendo os tecidos desorganizados. F: Detalhe do embrião anormal com protoderme e feixes vasculares. Abreviações: (apm) meristema apical do caule; (b1) primeira bainha foliar; (b2) segunda bainha foliar; (rs) raiz lateral; (rd) radícula; (cot) cotilédone; (fv) feixes vasculares; (mr) meristema apical da raiz; (pr) primórdio foliar; (pt) protoderme. Barras: A, C e E: 150 μ m. B: 100 μ m. D e F: 50 μ m. E: 200 μ m.

4. CONCLUSÕES

- Os embriões zigóticos toleram a dessecação até 8,3% de umidade sem reduzir a capacidade de germinação;
- Embriões zigóticos criopreservados com 11% de umidade apresentam 81% de regeneração *in vitro*;
- O teor de umidade limite recomendado para criopreservação de embriões zigóticos de macaúba é de aproximadamente 11%.
- O protocolo de criopreservação estabelecido permite a conservação de embriões zigóticos de macaúba por até 360 dias sem perda significativa da viabilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUITINK J, LEPRINCE O, HEMMINGA MA, HOEKSTRA FA. (2000) Molecular mobility in the cytoplasm: an approach to describe and predict lifespan of dry germplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 2385-2390.
- EEUWENS CJ, BLAKE J. (1977) Culture of coconut and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta Horticulturae*. 78: 277–286.
- ENGELMANN F, CHABRILLANGE N, DUSSERT S, DUVAL Y. (1995) Cryopreservation of zygotic embryos and kernels of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Seed Science Research 5:81-86.
- ENGELMANN F. (2004) Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol - Plant*, 40: 427-433.
- ENGELMANN F, DUSSERT S. (2013) Cryopreservation. In: Normah MN *et al.* (eds.), *Conservation of Tropical Plant Species*, Springer, New York, 107-119p.
- FÁBIÁN A, JAGER K, DARKÓ É, BARNABÁS B (2008) Cryopreservation of wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cells by vitrification. *Acta Physiology Plant* 30:737–744.
- FERREIRA DF. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6):1039-1042
- GENTIL DFO, FERREIRA SAN. (2005) Morfologia da plântula em desenvolvimento de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae). *Acta Amazonica* 35(3): 337-342.
- GONZALEZ-ARNAO MT, PANTA A, ROCA WM, ESCOBAR RH, ENGELMANN F. (2008) Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(1): 1-13.
- Grout BWW, Shelton K, Pritchard HW. (1983) Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Annals of Botany* 52:381-384.
- HAMILTON KN, ASHMORE SE, PRITCHARD HW. (2009) Thermal analysis and cryopreservation of seeds of Australian wild *Citrus* species (Rutaceae): *Citrus australasica*, *C. inodora* and *C. garrawayi*. *CryoLetters* 30:268-279.

- HAMILTON KN, OFFORD CA, CUNEO P, DESEO MA. (2013) A comparative study of seed morphology in relation to desiccation tolerance and other physiological responses in 71 Eastern Australian rainforest species. *Plant Species Biology*, 28: 51-62.
- HEMANTHAKUMAR AS, PREETHA TS, KRISHNAN PN, SEENI S. (2013) Utilization of zygotic embryos of an economic rattan palm *Calamus thwaitesii* Becc. (Arecaceae) for somaplant regeneration and cryobanking. *3 Biotech* 3:195-203.
- HENDERSON A. GALEANO G. BERNAL R. (1995) *Field Guide to the Palms of the Americas*. New Jersey: Princeton University, 166-167p.
- HERINGER AS, STEINMACHER DA, SCHMIDT EC, BOUZON ZL, GUERRA MP. (2013) Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. *Protoplasma*. doi: 10.1007/s00709-013-0500-4
- HIANE PA. FILHO MMR. RAMOS MIL. MACEDO MLR. (2005) Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (jacq.) Lodd. Caracterização e composição em ácido graxos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8(3): 256-259.
- HIANE PA, BALDASSO PA, MARANGONI S, MACEDO MLR. (2006) Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26(3): 683-689.
- JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118: 153-166, 2001.
- JOHANSEN DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- LORENZI, GMAC. (2006) *Acrocomia aculeata* (Lodd.) ex Mart. – Arecaceae: Bases para o extrativismo sustentável. Curitiba: Tese. Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, 172p.
- MAGALHÃES HM, LOPES PSN, RIBEIRO LM. SANT'ANNA-SANTOS BF, OLIVEIRA DMT. (2012) Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia capitata* (Arecaceae). *Trees* (2013) 27:273-283.
- MAZUR P (2004) *Principles of cryobiology*. In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE (eds) *Life in the Frozen State*. CRC Press, 5–55p.

- MAXWELL K, JOHNSON GN. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659–668.
- MOTTA PEF, CURI N, OLIVEIRA FILHO AT, GOMES JBV. (2002) Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedagógicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(7): 1023-1031.
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- N'NAN O, BORGES M, KONAN KONAN JL, HOCHER V, VERDEIL JL, TREGEAR J, N'GUETTA ASP, ENGELMANN F, MALAURIE B. (2012) A simple protocol for cryopreservation of zygotic embryos of ten accessions of coconut (*Cocos nucifera* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 48 (2): 160-166.
- NETO MAM, LOBATO AKS, ALVES JD, GOULART PFP, LAUGHINGHOUSE HD. (2010) Seed and seedling anatomy in *Euterpe oleracea* Mart. during the germination process. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8(2): 1147-1152.
- REED BM, DUMET D, DENOMA JM, BENSON EE. (2001) Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. *Biodiversity and Conservation* 10: 939–949.
- RIBEIRO LM, OLIVEIRA TGS, CARVALHO VS, SILVA PO, NEVES SC, GARCIA QS. (2012) The behaviour of macaw palm (*Acrocomia aculeata*) seeds during storage. *Seed Scienc & Technology*, 40, 344-353.
- RIBEIRO LM, OLIVEIRA DMT, GARCIA QS. (2011) Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during in vitro germination. *Trees* 26(3):851–63.
- BIN W, RULING W. (2010) Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of *Sabal* embryo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102:237-243.
- SAJINI KK, KARUN A, KUMARAN PM (2006) Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos after pre-growth desiccation. *Journal Plantation Crops* 34:576–581.

- SATTLER SE, GILLILAND LU, MAGALLANES-LUNDBACK M, POLLARD M, DELLAPENNA D. (2004) Vitamin e is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germinatio. *The Plant Cell* 16: 1419-1432.
- SCARIOT AO. (1987) *Biologia Reprodutiva de Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Palmae) no Distrito Federal*. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília. Dissertação de mestrado. 135p.
- SERSHEN PB, PAMMENTER NW. (2010) Effects of cryopreservation of recalcitrant *Amaryllis belladonna* zygotic embryos on vigor of recovered seedlings: a case of stress ‘hangover’? *Physiologia Plantarum* 139: 205–219.
- SILVA JC. (1994) *Macaúba: fonte de matéria prima para os setores alimentício, energético e industrial*. Viçosa: CEDAF/DEF/UFV, 41 p.
- SILVA JC, BARRICHELO LEG, BRITO JO. (1986) Endocarpos de babaçu e macaúba comparados à madeira de *Eucalyptus grandis* para produção de carvão vegetal. *Revista do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais-IPEF*, 34: 31-34.
- SILVA GCR, ANDRADE MHC. (2013) Development and simulation of a new oil extraction process from fruit of Macauba Palm tree. *Journal of Food Process Engineering* 36(1): 134–145
- SISUNANDAR, SOPADE P, SAMOSIR YMS, RIVAL A, ADKINS SW. (2010) Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Cryobiology*, 6(3): 289-296.
- STEINMACHER DA, SALDANHA CW, CLEMENT CR, GUERRA MP (2007). Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. *Cryoletters*, 28: 13-22.
- TOWILL, LE. (2002) Cryopreservation of Plant Germplasm. In: TOWILL LE, BAJAJ YPS (eds) *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Biotechnology in Agriculture and Forestry Springer, Berlin, 50:151-163p.
- WITHERS LA, ENGELS JMM (1990) The test tube genebank- a safe alternative to field conservation. *IPGRI The Pacific and Oceania*, 3:1-2.
- WEN B, WANG R. (2010) Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of Sabal embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(2): 237-243.

ANEXOS

ANEXO 1

Mapa dos pontos de coleta do material vegetal utilizado (inflorescência, frutos e palmito) de macaúba (*Acrocomia aculeata*) em todos os experimentos deste estudo.

